

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y MOLECULAR DE *Trueperella*  
(*Arcanobacterium*) *pyogenes* CAUSANTE DE ABSCESOS EN CERDOS.**

**VICTORIA EUGENIA RODRIGUEZ GUTIERREZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Magister en Ciencias Pecuarias**

**Director**

**NOEL VERJAN GARCIA, PhD**

**Doctor En Bioquímica y Genética Bacteriana**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA  
FACULTAD MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS PECUARIAS  
IBAGUÉ – TOLIMA**

**2018**

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	15
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	17
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>REFERENCIAS</b>	20
<b>3. OBJETIVOS</b>	26
3.1 OBJETIVO GENERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>4. CAPÍTULO 1: <i>Trueperella pyogenes</i> (<i>Arcanobacterium pyogenes</i>), UN PATÓGENO OPORTUNISTA: UNA REVISIÓN.</b>	27
4.1 RESUMEN	27
4.2 ABSTRACT	28
4.3 INTRODUCCIÓN	28
4.4 <i>Trueperella pyogenes</i>	30
4.5 MORFOLOGIA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	31
4.6 ESTRUCTURA COMPOSICION Y CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS	32
4.7 RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	33
4.8 FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENESIS	34
4.9 HOSPEDEROS Y ENFERMEDAD	37
4.10 DIAGNOSTICO E IDENTIFICACION MOLECULAR	39
4.11 CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	41

<b>5. CAPITULO 2: ANALISIS INMUNOPROTEÓMICO DE ANTÍGENOS DE <i>T. pyogenes</i> MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE), WESTERN BLOT Y ELECTROFORESIS EN DOS DIMENSIONES (2D-PAGE)</b>	<b>50</b>
<b>5.1 RESUMEN</b>	<b>50</b>
<b>5.2 ABSTRACT</b>	<b>51</b>
<b>5.3 INTRODUCCIÓN</b>	<b>52</b>
<b>5.4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
<b>5.4.1</b> Caracterización bioquímica y molecular de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001), condiciones de crecimiento y extracción de proteínas.	<b>55</b>
<b>5.4.2</b> Producción y purificación de IgG policlonal de conejo anti - <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001).	<b>56</b>
<b>5.4.3</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y western blotting.	<b>57</b>
<b>5.4.4</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE) y western blotting.	<b>57</b>
<b>5.5 RESULTADOS</b>	<b>58</b>
<b>5.5.1</b> Caracterización bioquímica y molecular de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001).	<b>58</b>
<b>5.5.2</b> Perfiles proteicos de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001) observados mediante SDS-PAGE e inmunoreactividad por western blot.	<b>60</b>
<b>5.5.3</b> Perfiles proteicos de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001) observados mediante 2D-PAGE e inmunoreactividad por western blot.	<b>62</b>
<b>5.6 DISCUSION</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>

**RECOMENDACIONES**

77

**ANEXOS**

78

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Protocolo Para Establecer Las Características Bioquímicas De <i>T. Pyogenes</i> Mediante Pruebas Bioquímicas Convencionales Y Miniaturizadas	79
<b>Anexo B.</b> Protocolo Para Generar Un Anticuerpo Policlonal Igg De Conejo Contra <i>T. Pyogenes</i> .	81
<b>Anexo C.</b> Tabla 1. Calendario De Inoculaciones Conejas Con <i>T.Pyogenes</i> . Noviembre (2014), Diciembre (2014), Enero (2015)	83
<b>Anexo D.</b> Protocolo Para La Caracterización De Proteínas Antigénicas De <i>T. Pyogenes</i> Mediante Las Técnicas De Sds-Page Y Western Blot	84
<b>Anexo E.</b> Protocolo Para La Caracterización De Proteínas De <i>T. Pyogenes</i> Mediante La Técnica De Electroforesis En Dos Dimensiones (2-D)	92
<b>Anexo F.</b> Resultados Obtenidos Por Cromatografía De Afinidad	98

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características bioquímicas de <i>Trueperella pyogenes</i> (UT-Tp-12-001)	32
<b>Tabla 2.</b> Reacciones de identificación para <i>Arcanobacterium pyogenes</i> mediante el Sistema de Identificación BBL Crystal ID (Becton Dickinson®)	59
<b>Tabla 3.</b> Masa molecular y punto Isoeléctrico de proteínas totales de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001) detectados por 2D-PAGE	63
<b>Tabla 4.</b> Calendario de inoculación de conejas con <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001) inactivada con formalina. Noviembre -Diciembre (2014), Enero (2015)	83
<b>Tabla 5.</b> Reactivos empleados para la preparación de geles de poliacrilamida al 12%	85
<b>Tabla 6.</b> Reactivos empleados para la preparación del gel de poliacrilamida al 8%	85

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Colonias de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001) en agar sangre con una amplia zona de $\beta$ -hemolisis.	32
<b>Figura 2.</b> Absceso causado por <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001) en cerdos de raza Duroc - Jersey. A, B: Absceso subcutáneo por <i>T. pyogenes</i> . C: Fotomicrografía de piogranuloma dérmico teñido con la técnica Hematoxilina-Eosina. Magnificación 10X.	39
<b>Figura 3.</b> Amplificación por PCR de un fragmento de 150 pb del gen PLO (Piolisina) de <i>Trueperella pyogenes</i> . M: Marcador de peso molecular 100 pb, líneas 1 a 4: muestras de ADNg de <i>Trueperella pyogenes</i> . (UT-Tp-12-001).	60
<b>Figura 4.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) de proteínas totales de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001). M: Marcador de peso, Línea 1: Proteína total, Línea 2: Fracción insoluble 1 (Pellet), Línea 3: Fracción insoluble 2 (Pellet), Línea 4: Fracción soluble (Sobrenadante).	61
<b>Figura 5.</b> Western Blot de proteínas totales de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001). M: Marcador de peso, Línea 1: Proteína total, Línea 2: Fracción insoluble 1 (Pellet), Línea 3: Fracción insoluble 2 (Pellet), Línea 4: Fracción soluble (Sobrenadante).	62
<b>Figura 6.</b> Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) de proteínas totales de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001).	63
<b>Figura 7.</b> Western blot de proteínas totales de <i>T. pyogenes</i> (UT-Tp-12-001) separadas por electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE)	64
<b>Figura 8.</b> Procedimiento para la remoción de la tapa de seguridad y el conjunto de cátodo de acero inoxidable.	87
<b>Figura 9.</b> Procedimiento para la remoción de las burbujas de aire.	88

<b>Figura 10.</b> Procedimiento para colocar la Tapa de seguridad de la unidad. Fuente BIO-RAD. Trans-Blot SD Semy-Dry Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual. Catalog Number 170-3940.	89
<b>Figura 11.</b> Procedimiento de rehidratación. A. Desprendimiento del soporte plástico de la tira IPG. B. Aplicación de la muestra y ubicación de la tira IPG en el tray de rehidratación. Fuente: BIO-RAD. ReadyPrep 2-D Starter Kit. Manual de Instrucciones. Catalogo 163-2105.	94
<b>Figura 12.</b> Ubicación del papel filtro sobre los canales de los electrodos. Fuente: BIO-RAD. ReadyPrep 2-D Starter Kit. Manual de Instrucciones. Catalogo 163-2105.	95
<b>Figura 13.</b> Montaje empleado para realizar la separación de proteínas por punto isoeléctrico. A. Drenaje del aceite de la tira IPG. B. Ubicación de la tira IPG dentro del Tray de isoelectroenfoque. Fuente: BIO-RAD. ReadyPrep 2-D Starter Kit. Manual de Instrucciones. Catálogo 163-2105.	95
<b>Figura 14.</b> Montaje empleado para realizar la separación por peso molecular. A. Lavado de la tira IPG en buffer de corrido. B. Ubicación de la tira para realizar la separación por SDS-PAGE. Fuente: BIO-RAD. ReadyPrep 2-D Starter Kit. Manual de Instrucciones. Catalogo 163-2105.	97