

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03072

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

03072

CARACTERIZACION DEL GENE PARA LA PROTEINA DE MEMBRANA EXTERNA *OmpC* DE
Salmonella typhi

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
PRESENTA EL ALUMNO

JOSE LUIS PUENTE GARCIA

Cuernavaca, Mor., septiembre 1970

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1970



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

-INTRODUCCION.....	1
-ANTECEDENTES.....	3
-APENDICE I (3).....	4
-MATERIALES Y METODOS.....	15
-RESULTADOS.....	16
-APENDICE II (37).....	16
-RESULTADOS.....	28
-DISCUSION Y CONCLUSION.....	40
I.- Importancia de la presencia constitutiva de OmpC.....	41
II.- Importancia en la epidemiologia molecular.....	43
III.- Implicaciones del grado de conservaci3n entre los genes.....	49
IV.- Diagn3stico por hibridizaci3n con DNA.....	52
V.- Utilizaci3n de la proteina como presentadora de epitopes heter3logos.....	57
-BIBLIOGRAFIA.....	63

INTRODUCCION

Sin duda, en la actualidad muchas líneas de investigación científica están enfocadas en la generación de información que ayude a la resolución de algún problema de salud. En especial, las enfermedades infecciosas son las que han levantado un gran interés en el desarrollo de sistemas adecuados de prevención y diagnóstico. Estos enfoques han tenido un gran desarrollo gracias a la aparición de tecnologías modernas de la biología molecular, la cual ha tenido avances sin paralelo en la última década. El surgimiento de las metodologías de DNA recombinante ha permitido obtener adelantos en el estudio de determinantes esenciales de virulencia e inmunidad de microorganismos infecciosos. Asimismo, ha abierto la posibilidad de que estos determinantes puedan ser útiles, a través de la manipulación del gene que codifica para ellos o del producto mismo, en la generación de sistemas de detección y vacunación.

Nuestro laboratorio ha tenido el interés de generar este tipo de conocimientos, para atacar uno de los principales problemas de salud que prevalecen en este país, la fiebre tifoidea (FT). Salmonella typhi es el agente causal de esta enfermedad entérica de carácter invasivo.

Las generalidades sobre esta enterobacteria y los aspectos más relevantes acerca del campo, como su importancia y los principales avances y conocimientos obtenidos a la fecha, son revisados en el apéndice I que se presenta a continuación (3). Aquí, se abarca la descripción del agente causal, la descripción clínica de la FT, la epidemiología, la patogénesis, el desarrollo de vacunas y sistemas de diagnóstico, y la perspectiva en biología molecular.

Uno de los objetivos generales de nuestro laboratorio es el iniciar la caracterización de antígenos de superficie de S.typhi. Ello, partiendo de la base que proteínas expuestas en la superficie son antígenos candidatos para detección o vacunación. Los objetivos particulares de este proyecto fueron la clonación del gene para la proteína de membrana externa (PME) OmpC, la caracterización inicial de este gene y su producto, y el inicio de la determinación y análisis de la secuencia nucleotídica.

Esta información preliminar deberá servir de fundamento para evaluar, con estudios posteriores, la utilidad de esta proteína, o de su gene a nivel clínico en la detección, diagnóstico, control y prevención de la FT.

Introducciones generales a las características de la membrana externa (ME) de las enterobacterias, en especial a la de E.coli y S.typhimurium, así como a las del gene ompC de E.coli y a la proteína Omp C en E.coli y S.typhimurium, han sido realizadas por nosotros (11,35) y por otros (29,30).

ANTECEDENTES

Hasta ahora, los antecedentes producidos por nuestro grupo de investigación en el estudio de la biología molecular de S.typhi, son:

-La clonación de los genes para las proteínas de membrana externa (PMEs) OmpF y PhoE (35,36).

-La clonación del gene para la enterotoxina SE (10).

-La caracterización preliminar de las PMEs como inmunógenos durante la infección (A. Verdugo, comunicación personal).

-La clonación y caracterización del gene para la PME OmpC (11,37). Parte de este trabajo es presentado en esta tesis.

A P E N D I C E I

Research Opportunities in Typhoid Fever: Epidemiology and Molecular Biology

Edmundo Calva, Jose Luis Puente and Juan José Calva

Summary

*It is estimated that typhoid fever (TF) annually affects more than 12 million persons, worldwide. TF is the result of a generalized infection by the enterobacterium *Salmonella typhi*. Patients with TF, most of whom live in developing countries have impaired activity for several weeks resulting in an important loss in productivity and welfare. Death may occur, with the single most frequent cause being intestinal perforation. While the first priority must be to develop better methods of disease prevention, there is also an urgent need to devise easy, accurate, and inexpensive diagnostic assays that will allow early routine distinction of TF from other febrile illnesses. Research on TF offers the opportunity to explore many aspects of pathogenesis and the host immune response, as well as to contribute toward the development of new vaccines and diagnostic laboratory tests.*

/a

Causal Agent and Clinical Description of Typhoid Fever

The term typhoid derives from *typhus* and from the suffix 'oid', and means simply 'like-typhus'. *Typhus* is a Greek word and signifies 'smoke' or 'mist'; it was probably first used for describing febrile illnesses that cause mental aberrations. It is now known that typhoid fever (TF) in man is the clinical manifestation of a generalized (systemic) infection by *Salmonella typhi*, a gram-negative enterobacterium that enters the body via the gastrointestinal tract, usually via ingestion of food or water contaminated by human feces.

S. typhi belongs to the serotype 9,12,d, Vi. It is defined by the sugar repeat units (9,12) of the O antigen, located in the outer membrane lipopolysaccharide (LPS); the H antigen (d) constituted by the flagellar protein (flagellin); and the K capsular polysaccharide antigen (Vi). (The *Salmonella* genus was described first by T. Smith, working in the laboratory headed by D. E. Salmon.)

The incubation period of TF, although variable according to the infecting dose, is usually around 10-14 days. During certain stages of the disease, *S. typhi* circulates in the blood (bacteremia), from where it can be isolated for diagnostic purposes. Fever is the main clinical manifestation of TF, and can produce temperatures of 39-40 °C during the first 3-8 days after onset. Commonly, accompanying fever there is intense headache, general weakness, and diarrhea, as well as nausea, vomiting, loss of appetite, abdominal pain, chills, cough, and muscular ache. The most frequent complications are intestinal hemorrhage, severe bleeding disorders, and inflammatory changes in the liver. Although less frequent, intestinal perforation may also occur, contributing to the approximately 25% of deaths associated with the illness. General weakness, abdominal pain, and liver and spleen enlargement are usually detected upon physical examination.¹⁻⁷

Without specific antimicrobial treatment the disease follows a prolonged course, of 3-4 weeks after onset, and symptoms slowly recede if there are no complications. Sustained fever is common during the second and third week of disease, decreasing slowly afterwards. Fortunately, nowadays various effective antimicrobial agents are available. The treatment of first choice is chloramphenicol, administered at 50 mg/kg/day in four doses for a minimum of two weeks. Ampicillin (100 mg/kg/day in four doses) or cotrimoxazole

(320 mg trimethoprim/600 mg sulphamethoxazole/day in 2 doses) are also used. More recently, other antibiotics such as third generation cephalosporins or new generation quinolones have proved to be useful.⁸ Even with antibiotics, convalescence without complications produces impaired activity in patients for at least three weeks, with a substantial loss in productivity and increase in medical bills.

Other *Salmonella* cause gastroenteritis ('food poisoning') and paratyphoid in man, with headache, chills, abdominal pain, nausea, vomiting, and diarrhea; the symptoms appear 8-48 hours after infection and last for 1-4 days. In contrast to TF, blood cultures are rarely positive and diagnosis is made by isolating the microorganism from stools. *S. typhimurium* is a leading cause of such gastroenteritis, and produces in mice an invasive enteric fever that resembles TF in man.

Epidemiology

It is estimated that there are 12.5 million cases of TF annually (excluding China). This represents an incidence of 365 per 100,000 of the total population, and of 540 per 100,000 inhabitants of the developing world (0.5%). The worldwide case-fatality rate is around 1%.⁹ Persons shedding *S. typhi* are the main source of contamination. Chronic carriers can excrete as many as 10¹⁰ organisms per gram of feces. It has been estimated, for instance, that there are 694 carriers per 100,000 inhabitants in Santiago, Chile.¹⁰

Epidemiological data from Mexico (1980-7) show an annual incidence rate ranging from 0.01 to 0.02%. The data was obtained from the general open population that seeks medical care at government-supported clinics and hospitals¹⁰ and from the population affiliated to the Mexican Institute for Social Security, which is more than one third of the total population.¹¹ Nevertheless, these figures probably represent a lower

estimate, due to underreporting. Some cases are probably not diagnosed properly and others are treated at home without medical care or by private physicians who uncommonly report them to the national health offices.

In Mexico the case-fatality rate is similar to that which is found worldwide. Furthermore, most cases appear during the rainy months of April through October.¹⁰

It is thought that in very poor sanitary conditions it is primarily small children who are mostly affected,¹ although it appears that children less than two years old have benign infections.¹² In Mexico, reported affected children under five years of age represent only around 5% of the cases; 50% correspond to individuals in the age bracket of 15 to 44 years old.^{10,11} In 1979, Mexicans in these age-brackets represented 18 and 41% of the population, respectively. Other reports indicate that typhoid patients in developing countries have a mean age of 16 years,⁶ and are mostly in the age range of 5-19 years old.¹³ For cases involving intestinal perforation, the mean age is 22 years.⁴

Studies with volunteers in the U.S. showed that the attack rate and the mean incubation period are dependent on the infective dose. With an infective dose of 10^9 microorganisms, the attack rate was 38% and the mean incubation period was 13 days, while with 10^8 organisms the respective figures were 90% and 6 days.

Pathogenesis

No experimental animal model has been found for the study of *S. typhi* pathogenesis. This fact poses a challenge and some extrapolations have to be made from investigations on mice infected with *S. typhimurium*.

It has been shown that *S. typhimurium* goes across the intestinal epithelial cell layer through M ('Membranous') cells,¹⁴ invading Peyer's patches, from ~~the~~ ^{the} reaches the reticuloendothelial sys-

tem, proliferating inside the macrophages and invading the mesenteric lymph nodes, the spleen and the liver.¹⁵ The mechanisms involved in *Salmonella* adherence to intestinal cells, penetration, resistance to phagocytosis by macrophages, and multiplication within macrophages, are largely unknown.

Genetic determinants of virulence, particularly some of those required to produce systemic infection, such as serum resistance, cell adherence, cell invasion, and proliferation within cells, are present in *S. typhimurium* large plasmids.¹⁶ There appears to be heterogeneity among the plasmids and their host strains and in one instance it was observed that the plasmid was integrated into the chromosome.

A gene that confers serum resistance, from a large plasmid, has been isolated. It complements serum-sensitive rough *S. typhimurium* and *E. coli* strains that lack full-length LPS. This gene codes for an 11 kDa protein that becomes incorporated into the outer membrane, without restoring the length of the LPS.¹⁶

It must be pointed out, however, that most *S. typhi* strains lack plasmids⁹ (our unpublished observations); when present, plasmids have been associated with antibiotic resistance.¹⁷

An interesting effort has been made to isolate *S. typhimurium* mutants that are unable to survive within the host macrophage, by selection after Tn10-transposon mutagenesis.¹⁸ Diverse phenotypes were identified among the mutants. These included auxotrophs that might reflect the low availability of purines and p-aminoabenzic acid within the macrophages, mutants that are hypersensitive to serum complement, mutants with an altered response to oxidative stress, strains altered in the LPS, motility mutants, mutants with altered colony morphology and finally, strains that showed Tn insertion in a resident plasmid (the other insertions were in the chromosome). Interestingly,

none of the mutants appeared to be affected in their iron-uptake system, which is thought to provide iron to the bacteria from that tightly bound to transferrin and lactoferrin.

In addition, it has been found that *S. typhimurium* transposon Tn 10-induced mutants that are devoid of adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein (CRP) are avirulent.¹⁹ Such mutants were sought because cyclic AMP (cAMP) is present at low concentrations inside mammalian cells - and cell invasion occurs during a systemic infection. cAMP and CRP are necessary for the transcription of genes involved in the transport and breakdown of catabolites. Furthermore, cAMP exerts a positive control on the transport of fuel and carbon sources, as well as amino acids, and the concentration of cAMP exerts an effect on lysogenization, and on the synthesis of pili, fimbriae, flagella, and an outer membrane protein. Thus, several functions were found to be impaired in these pleiotropic mutants. Since they are immunogenic, they constitute candidate strains for live vaccines.

An important factor in pathogenesis is the host immune status. In humans, it probably depends on several environmental factors such as previous exposure to antigen, nutrition, and on the prior or simultaneous occurrence of other infections. A spectrum of innate resistance to *S. typhimurium* infection is found amongst mouse strains.⁹ Alleles of various mouse genetic loci influence such resistance, including some of the alleles of the major histocompatibility complex and *Ity*.^{20,21} For instance, the *ItyS* allele confers sensitivity and *ItyR* resistance. Highly virulent bacteria can better infect *ItyS* strains than *ItyR* strains, whereas infection by a low virulent strain is the same in both host genetic backgrounds.²¹ Whether an analogous situation occurs in humans remains to be proved.

The *S. typhi* LPS is an endotoxin

which causes fever (is pyrogenic), bleeding disorders, and septic shock. It is highly immunogenic, although its role in pathogenesis is not clear.^{1,2} It appears that the flagella either protect *S. typhi* from intracellular killing by macrophages or increase its ability to replicate inside these cells.⁹

Evidently, much more work and new ideas are needed in order to better understand the pathogenicity of *S. typhi*.

Vaccines

There is a need for vaccines, cellular (live or killed) or acellular (based on isolated bacterial products), that do not cause adverse effects and that fully protect individuals from different geographical areas, ages, and socio-economic backgrounds.

Presently used parenteral vaccines belong to a first generation set tested since the 1960s. They consist of killed-whole cells, and include either a dried acetone-inactivated (K) or a heat-phenol-inactivated (L) preparation. They range in effectiveness between 66% and 88.4% protection, when two doses are given (corresponding each to c. 10⁸-10⁹ organisms), as determined over a seven-year surveillance. The L vaccine has been shown to be slightly less effective. Nevertheless, in Mexico and other developing countries the L vaccine is mostly used, due to its lower cost. Mass annual systematic immunization with a single dose of the L vaccine has been shown to lower the incidence of TF significantly. An important constraint on the use of these vaccines is that both present undesirable side-effects, specially with the first dose, such as pain and swelling at the site of application, and fever of more than 38°C. For instance, in a survey in Thailand more than 60% of the vaccinees had pain and swelling, and more than 38% had fever, as side-effects from the vaccination.^{18,22}

More recently, the Vi antigen has

been used as a parenteral vaccine. Single dose was applied in a field trial; no adverse effects were reported, and protection was similar to that found with the K and L vaccines. Therefore, vaccination with Vi might well come into wider use.²³

The development of attenuated strains for use as orally administered live vaccines, able to elicit a more effective and longer immunity without causing symptoms, had been a matter of great interest and effort. Furthermore, such strains could also carry heterologous antigens, to immunize against other infectious diseases prevalent in a particular geographical region.

For instance, a non-virulent live vaccine strain has been developed consisting of a UDP-galactose-4-epimeraseless mutant (strain Ty21A), derived from Ty2, a reference strain. This mutant is sensitive to galactose-induced lysis *in vitro*. Its effectiveness using three doses of $1-3 \times 10^9$ viable organisms has been reported to be highly variable. For instance, in Santiago, Chile, it was 67% and in Alexandria, Egypt, it was 95%. This variability in efficacy appears to depend, at least in part, on the number of applications, the storage conditions, the correct formulation and dosage, and on whether it is given to people from endemic or non-endemic areas. It is interesting that in the study done in Santiago, Chile, an enteric-coated formulation was more effective; as opposed to the gelatin capsule presentation, which is taken after ingestion of bicarbonate to neutralize gastric acidity.²³ Presently, it is not clear yet how the epimerase mutation contributes to the abolition of virulence in Ty21a.²⁴

In addition, autotrophs of *S. typhimurium* and *S. typhi* for aromatic metabolites (*aroA*) and adenine (*purA*) have been developed as candidates for live oral vaccines. Such strains are non-virulent, presumably because the required metabolites are not available in

host tissues. The *S. typhimurium* strains have been shown to fully protect mice and calves. The *S. typhi aroA-purA* double mutants cause a significant stimulation of human cellular immunity in volunteers, although protection against challenge with virulent bacteria has not been proved. At the present time it is of utmost interest to assess their protective efficacy in humans, by conducting community based randomized trials.²⁵

Diagnosis

It has become evident that, particularly in developing countries, there is a great need for new, rapid, highly sensitive and specific, as well as easy-to-perform, diagnostic tests for TF that allow it to be distinguished readily from other febrile illnesses. Because many people in areas where TF is endemic have high levels of serum antibodies to *S. typhi*,²⁶ secondary to a continuous exposure to the microorganism, serologic tests performed in these areas are of low specificity for diagnosing TF. Moreover, a significant rise in the antibody titers against the O antigen is usually not detected until the second to third week after the onset of fever, therefore it seems that new diagnostic tests to detect circulating antigens or DNA sequences from bacteria present in blood of TF patients are needed.

Presently, the most accurate diagnostic test for TF is to isolate *S. typhi* from bone-marrow aspirate, which, however, is an aggressive and impractical procedure. Blood cultures are more commonly used and easy to perform, yet their sensitivity is not higher than 90% when a set of three consecutive blood cultures are taken. Important constraints related to this method are that *S. typhi* isolation and identification takes at least 48 hours and also that blood cultures may not be highly sensitive because of the low concentration of *S. typhi* circulating in blood, 20 cells/ml or less,⁹ especially when patients

have taken antibiotics before the culture.

Research Opportunities

Well-designed epidemiological studies in different parts of the world, together with more extensive investigations on *S. typhi* virulence factors and host immune response to the bacteria, would certainly aid understanding of the pathogenesis of TF and improve its detection, management, and prevention. It is evident that this is necessarily a multidisciplinary effort that will require bringing together specialists from various fields. These should include molecular biologists, who may provide fundamental knowledge about the structure and function of macromolecules involved in mechanisms of disease and host defence, and epidemiologists, who may provide rigorous methodology to conduct clinical research. Fig. 1 illustrates some of the areas of knowledge where much more information is needed.

Some areas of research that offer new opportunities and challenges are the following:

(1) Concerning epidemiologic research, there is a need to validate, through case-control studies, the diagnostic efficacy of rapid and more practical laboratory tests to identify TF patients early in the onset of the disease. Also, it is important to assess the impact, through randomized field trials, of new vaccines that will be better accepted by the community and which provide highly effective and long-term protection among individuals at high risk for TF.

(2) An interesting area with respect to studies in molecular biology is that concerning outer membrane proteins (OMPs), which are surface-exposed abundant proteins ($> 10^5$ per cell). It has been proposed that *S. typhi* OMPs, including the pore-forming porins, could serve as antigens for a diagnostic test. There is a significant rise in the OMP antibody levels in sera from TF patients in acute-phase and conva-

lescent-phase as compared with control serum, which is not the case for the O or the H antigens.²² Furthermore, studies in mice have indicated that the *S. typhimurium* OMPs, and not the LPS, from rough or smooth strains, elicit a relatively long-lasting protective response to infective doses equivalent to 50 times the half-lethal dose.²³ By analogy, the *S. typhi* OMPs could have a similar role in the immunity against TF, and thus serve as components of an acellular vaccine.

The gene for one of the major *S. typhi* OMPs, *ompC*, has been isolated.²⁴ This offers the opportunity to probe into its structure, function, and immunogenicity. It should be interesting to determine the variability of the *S. typhi* OMPs with respect to other bacteria, and to assess whether the variable regions are in putatively exposed sequences (see Fig. 2). Furthermore, finding out if there is intraspecies heterogeneity is of crucial relevance to determining the role of the OMPs as diagnostic reagents, or as components of a vaccine. There could be heterogeneous exposed regions, varying between isolates from different geographical origins or from patients with diverse clinical symptoms. If indeed this were the case, and if the OMPs turn out to be important in immunodiagnosis and immunoprotection, it might be necessary to have several diagnostic kits and vaccines, based on different strains. Alternatively, the definition of universally shared epitopes, specific for *S. typhi*, could allow the design of diagnostic assays and vaccines for general use.

(3) It is not clear yet how many factors are involved in the production of diarrhea during TF. Some authors have dismissed the role of a heat-stable enterotoxin, similar to *Escherichia coli* ST, or that of a heat-labile cholera-like enterotoxin, similar to *E. coli* LT.⁶ However, others have described the isolation of an *S. typhimurium* cholera-

like enterotoxin gene.³⁰ and of an LT-like enterotoxin gene from *S. typhi*³¹ (manuscript in preparation). The latter shares some homology at the DNA level with the LT gene, although it lacks a coding region for a proposed binding site to ganglioside GM1, a postulated LT and cholera enterotoxin cell receptor. It will be interesting to see how widely distributed this gene is in different clinical isolates, to measure its level of expression, and to determine if it has any role in pathogenesis. It could function at a low level and exert its effects on as yet unknown cellular targets.

(4) Isolated *S. typhi* genes can be used as labelled probes in the study of molecular population genetics, making use of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) that might allow the classification of different strains according to geographical origin or to the clinical symptoms that they induce. This type of analysis is based on the occurrence of genetic polymorphisms, which can be reflected in the absence or presence of specific cutting sites for restriction enzymes. DNA from various clinical isolates is cut with a restriction enzyme, the resulting fragments are then separated by gel electrophoresis, and are then blotted on to nitrocellulose paper. On these Southern blots, particular bands can be visualized by using labeled, e.g. radioactive, genes as hybridizing probes. A change in the band pattern is indicative of polymorphism. It is possible that particular banding patterns can serve as 'fingerprints' for specific strains.

(5) Besides immunodiagnosis, modern diagnostic approaches could include the design of DNA specific probes for *S. typhi*. Eventually these probes could be used on blood or stool samples, when linked to an efficient non-radioactive detection system.

For instance, determining the nucleotide sequence of the *S. typhi ompC*

and enterotoxin genes will allow the definition, by nucleotide sequence comparison to published data from other enterobacteria, of regions specific for the *S. typhi* reference strain from which the gene was isolated.

Oligonucleotides complementary to such specific regions can be constructed and hybridized very stringently to different *S. typhi* clinical isolates; such that only completely homologous sequences can hybridize. Lack of hybridization with DNA from a particular strain, on a Southern blot, would indicate variability with respect to the reference gene. In this manner, it should be possible to assess how common are the putatively species-specific sequences (Fig. 2).

Alternatively, the hybridizing oligonucleotides could correspond to regions that code for amino acids that form part of putatively exposed epitopes.

(6) Finally, we cannot but stress again the need for novel ideas and approaches to the study of TF; some of the unknown areas have been mentioned throughout the text. A definite attraction is the opportunity to explore a myriad of problems, ranging from basic studies on cell-to-cell interaction to practical applications in health biotechnology. The information obtained could provide relevant insights to the pathogenesis and immunity phenomena of other bacterial infections.

EDMUNDO CALVA and JOSE
LUIS PUENTE are at the
Department of Molecular Biology of
the Centro de Investigación sobre
Ingeniería Genética y
Biotecnología, Universidad
Nacional Autónoma de México
(CEIINGEBI-UNAM), Apartado
Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos
62271, México. JUAN JOSE
CALVA is at the Department of
Infectious Diseases of the Instituto
Nacional de la Nutrición 'Salvador
Zubirán' (INNSZ), Vasco de

/ Biotecnología

Quiroga 15. México DF 14000.
México.

REFERENCES

- 1 HORNICK, R. B. (1985) Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world XX. Typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 7, 536-546.
- 2 SURVY (1978-84) Infectious Disease Department, National Institute for Nutrition 'Salvador Zubiran', Mexico City, Mexico.
- 3 HOFFMAN, T. A., RUIZ, C. J., COUNTS, G. W., SACHS, J. M. & NITZKIN, J. L. (1975) Waterborne typhoid fever in Dade County, Florida. Clinical and therapeutic evaluation of 105 bacteremic patients. *Am. J. Med.* 59, 481-487.
- 4 BUTLER, T., KNIGHT, J., NATH, S. K., SPEELMAN, P., ROY, S. K. & AZAD, M. A. K. (1985) Typhoid fever complicated by intestinal perforation: a persisting fatal disease requiring surgical management. *Rev. Infect. Dis.* 7, 244-256.
- 5 BITAR, R., & TARPLEY, J. (1985) Intestinal perforation in typhoid fever. A historical and state-of-the-art review. *Rev. Infect. Dis.* 7, 257-271.
- 6 ROY, S. K., SPEELMAN, P., BUTLER, T., NATH, S., RAHMAN, H. & STOLL, B. J. (1985) Diarrhea associated with typhoid fever. *J. Infect. Dis.* 151, 1138-1143.
- 7 CALVA, J. J. & RUIZ-PALACIOS, G. M. (1986) *Salmonella* hepatitis: detection of salmonella antigens in the liver of patients with typhoid fever. *J. Infect. Dis.* 154, 373-374.
- 8 SOH, G. B. & OVERTURE, G. D. (1987) Treatment of typhoid fever and other systemic salmonellosis with cefotaxime, ceftriaxone, cefoperazone, and other newer cephalosporins. *Rev. Infect. Dis.* 9, 719-736.
- 9 EDELMAN, R. & LEVINE, M. M. (1986) Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 8, 329-349.
- 10 Boletín Mensual. *Epidemiología* (1986-7) Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud, México.
- 11 Boletín Epidemiológico Anual (1980-6). Jefatura de Servicios de Medicina Preventiva Subdirección General Médica. Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
- 12 FERRECCIO, C., LEVINE, M. M., MANTEROLA, A., RODRIGUEZ, G., RIVERA, I., PRENZEL, I., BLACK, R. E., MANCUSO, T. & BULAS, D. (1984) Benign bacteremia caused by *Salmonella typhi* and paratyphi in children younger than two years. *J. Pediatr.* 104, 899-901.
- 13 LEVINE, M. M., FERRECCIO, C., BLACK, R. E., GEMANTER, R. & Chilean Typhoid Committee. (1987) Large-scale field trial of Ty21A live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* i, 1049-1052.
- 14 STUEBEL, M. C. & STROBE, W. (1986) M cells and host defense. *J. Infect. Dis.* 154, 737-741.
- 15 GILLIG, P. A. & CURTIS, R. III (1987) Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 55, 2891-2901.
- 16 HARTNETT, J., WYN, P., REYELS, P. & MATHAN, V. (1987) Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *J. Infect. Dis.* 155, 546-549.
- 17 GOLDSTEIN, F. W., CHUMPIAZ, J. C., GUTVARA, J. M., PAPADOPOULOU, B., ACAR, J. F. & VIETU, J. F. (1986) Plasmid-mediated resistance to multiple antibiotics in *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.* 153, 261-266.
- 18 FIELDS, P. I., SWANSON, R. V., HAIDARIS, C. G. & HEFFRON, F. (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5189-5193.
- 19 CURTISS, R. III & KELLY, S. M. (1987) *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect. Immun.* 55, 3035-3043.
- 20 HORMAECHL, C. E., HARRINGTON, K. A. & JOYSEY, H. S. (1985) Natural resistance to salmonellae in mice: control by genes within the major histocompatibility complex. *J. Infect. Dis.* 152, 1050-1056.
- 21 BENJAMIN, W. H. JR., TURNBOUGH, C. L. JR., POSEY, B. S. & BRILES, D. E. (1986) *Salmonella typhimurium* virulence genes necessary to exploit the *Irs5/S* genotype of the mouse. *Infect. Immun.* 51, 872-878.
- 22 BODHIDATTA, L., TAYLOR, D. N., THISAKORN, U. & ECHVERRIA, P. (1987) Control of typhoid fever in Bangkok, Thailand, by annual immunization of schoolchildren with parenteral typhoid vaccine. *Rev. Infect. Dis.* 9, 841-845.
- 23 KLUGMAN, K. P., GILBERTSON, I. T., KOORNHOJ, H. J., ROBBINS, J. B., SCHNEIFRON, R., SHULZ, D., CADOS, M., ARMAND, J. & VACCINATION ADVISORY COMMITTEE. (1987) Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* ii, 1165-1169.
- 24 SILVA, B. A., GONZALEZ, C., MORA, G. C. & CABELLO, F. (1987) Genetic characteristics of the *Salmonella typhi* strain Ty21a vaccine. *J. Infect. Dis.* 155, 1077-1078.
- 25 LEVINE, M. M., HERRINGTON, D., MURPHY, J. R., MORRIS, J. G., LOSONSKY, G., TALL, B., LINDBERG, A. A., SVENSON, S., BAQAR, S., EDWARDS, M. F. & STOCKER, B. (1987) Safety, infectivity, immunogenicity, and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Tys and 543Tys, as live

- oral vaccines in humans *J Clin Invest* 79, 98A-90Z.
- 26 MURPHY, J. R., BAQAR, S., MUSIG, C., SCHLESINGER, L., FERRICCHI, C., LINDBERG, A. A., SVENSON, S., LEMONKY, G., KOSTER, F. & LEVINE, M. M. (1987) Characteristics of humoral and cellular immunity to *Salmonella typhi* in residents of typhoid-endemic and typhoid-free regions *J. Infect. Dis* 156, 1005-1009.
- 27 CALDERON, I., LOKOS, S. R., ROJAS, H. A., PALOMINO, C., RODRIGUEZ, L. H. & MORA, G. C. (1986) Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans *Infect. Immun* 52, 209-212.
- 28 UDHAYAKUMAR, V. & MUTHUKARUPPAN, V. R. (1987) Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice *Infect. Immun* 55, 816-821.
- 29 PUENTE, J. L., FLORES, V., FERNANDEZ, M., FUCHS, Y. & CALVA, E. (1987) Isolation of a *Salmonella typhi* *ompC*-like outer membrane protein gene *Gene* 61, 75-83.
- 30 CHOPRA, A. K., HOLSTON, C. W., PETERSON, J. W., PRASAD, R. & MEKALAND, J. J. (1987) Cloning and expression of the *Salmonella enterotoxin* gene. *J. Bacteriol.* 169, 5095-5100.
- 31 FERNANDEZ, M., SIERRA-MADERO, J., DE LA VEGA, H., VAZQUEZ, M., LOPEZ-VIDAL, Y., RUIZ-PALACIOS, G. M. & CALVA, E. (1987) Isolation of an LT-like enterotoxin gene from *S. typhi*. Twenty-Seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract no 1168.

Fig. 1. Illustration of unknown areas concerning research on typhoid fever (TF). The question marks indicate where not much information is available and ~~where~~ more knowledge is required. The asterisks indicate areas where some developments and advances have been made, but are still in need for much improvement. The mechanisms of pathogenesis used by *S. typhi*, the gram-negative bacterium that causes TF are, at the moment, not well documented. How much does the variability of clinical symptoms depend on the genetic make-up of the microorganism or on the host immune status is an open area for research. Which factors play a role in the resistance of the bacteria to host immunity, or in invasion and adhesion processes, is largely unknown. There is a need to define targets and mechanisms involved in humoral or cellular host immune response; this will help in the design of improved diagnostic methods and vaccines. An important point is the need for an experimental model system, that allows addressing some of the unanswered questions. (Mabs = monoclonal antibodies; Pabs = polyclonal antibodies).

where
A

for
A

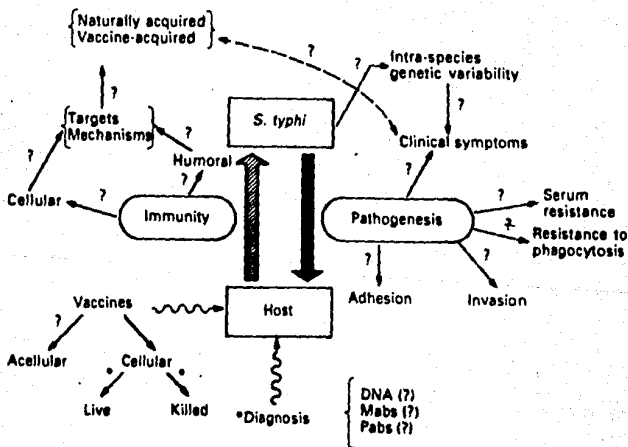
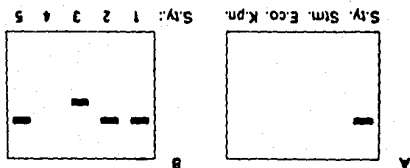
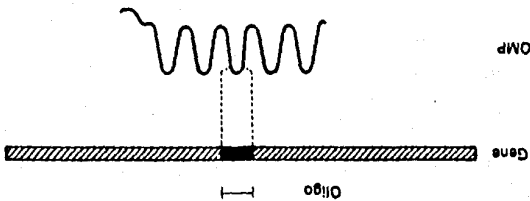
Fig. 2. Schematic represent of the use of oligonucleotides for determining inter- and intra-species variation of defined gene regions. The lower part of the figure shows a folded hypothetical outer membrane protein (OMP). The location of a possible exposed epitope of interest is marked on the protein; the corresponding coding region in the gene is marked by a black bar. A radioactively labelled oligonucleotide, complementary to this coding region, can be used in hybridization experiments to Southern blots, under stringent conditions so that only homologous sequences can form hybrids. The A and B panels represent the autoradiograms of Southern blots containing either DNA from different species of enterobacteria (*S. ty.* = *Salmonella typhi*; *S. tm.* = *Salmonella typhimurium*; *E. coli.* = *Escherichia coli*; *K. pn.* = *Klebsiella pneumoniae*); or different *S. typhi* clinical isolates. Panel A shows that the oligonucleotide does not hybridize to DNA from other enterobacteria, thus there is inter-species variation of the epitope of interest. Similarly, panel B shows

intra-species variation; there is restriction fragment length polymorphism in isolate number 3, and sequence heterogeneity in number 4.

H.15.126
G + A/W +
TEXOP'S
10-6-88

60

OMP



80/20

MATERIALES Y METODOS

-Los materiales y métodos utilizados en la primera etapa de este trabajo están descritos en el apéndice II (37).

SECUENCIACION DEL GENE gnc

Basados en el mapa de restricción del plásmido pVF27, diferentes fragmentos de restricción fueron aislados de geles de agarosa utilizando el estuche para purificación de DNA "GeneClean" (Bio 101, La Jolla, CA.), para subclonarlos en M13mp18 o M13mp19 y secuenciarlos por el método descrito por Sanger (40), utilizando el estuche de "sequenase" (United States Biochemical Corporation, USB, Cleveland, Ohio).

ANALISIS DE LOS PERFILES HIDROPATICOS DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS.

La generación de los perfiles de hidrofiliidad e hidrofobicidad de la secuencia peptídica de los fragmentos secuenciados, se realizó conforme al método reportado por Hopp y Woods (17).

EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZACION CON LA REGION 5' REGULATORIA

Los nuevos experimentos de hibridización se realizaron básicamente como se describe en el apéndice II (37), figuras 1 y 6.

A P E N D I C E II

GEN 02223

Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*

(Recombinant DNA; phage λ vector; pBR322 plasmid; *E. coli* probe; porin; osmolarity; minicell analysis)

José Luis Puente, Valia Flores, Marcos Fernández, Yolanda Fuchs and Edmundo Calva

Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271 (México)

Received 30 June 1987
Revised 13 August 1987
Accepted 24 August 1987

SUMMARY

We have isolated the structural gene for an outer membrane protein of *Salmonella typhi*, from a genomic library constructed in bacteriophage λ 1059, using the *Escherichia coli ompC* gene as a heterologous probe. *E. coli ompC* codes for an outer membrane pore protein (porin) that is induced preferentially at high osmolarity and high temperature. The *S. typhi ompC*-like gene was subcloned in pBR322 and introduced into *E. coli* HB101 and into P678-54, a minicell-producing strain. In both strains it expressed a 38.5-kDa protein, which was incorporated into the outer membrane envelope and comigrated with an *S. typhi* outer membrane protein which was expressed both at low and high osmolarity in vivo.

INTRODUCTION

The epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, bacteriology, pathogenesis, pharmacology and immunology of typhoid fever in man have been

Correspondence to: Dr. E. Calva, CEIINGEBI/UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271 (México) Tel. (52)(73)17-27-99.

Abbreviations: bp, base pair(s); kb, 1000 bp; *ompA*, gene coding for OmpA, outer membrane structure protein; *ompC*, gene coding for OmpC; OmpC, outer membrane pore protein (porin); *ompF*, gene coding for OmpF; OmpF, outer membrane pore protein (porin); PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; *phoE*, gene coding for PhoE; PhoE, outer membrane pore protein (porin); SM, stabilizing medium, see MATERIALS AND METHODS, section d; SSC, 0.15 M NaCl-0.015 M Na-citrate pH 7.6. TAE, Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer.

the subject of a recent review (Edelman and Levine, 1986). Due to its significant incidence in developing countries and to the invasive character of *S. typhi*, the causal agent of typhoid fever, it is important to develop a vaccine to protect against this disease. It also would be of value to have a very specific and sensitive test for the detection of antigen in body fluids. Currently available killed whole-cell vaccines afford only limited protection and cause adverse side effects (Tapa and Cvjetanović, 1975). An attenuated live cell vaccine, consisting of strain Ty21a, although without side effects, provides variable protection. Also, present diagnostic methods are not sufficiently fast and reliable (Edelman and Levine, 1986).

It has been shown that outer membrane protein preparations from *S. typhimurium* protect mice against salmonellosis (Kuusi et al., 1981; Udhayakumar and Muthukkarupan, 1987a); also a purified

porin elicits delayed-type hypersensitivity (Udhayakumar and Muthukkaruppan, 1987b). In addition, patients with typhoid fever generate antibodies that recognize *S. typhi* outer membrane proteins (Calderón et al., 1986). Thus, outer membrane proteins could serve as protein antigens in a cellular or acellular vaccine, or in a rapid diagnostic assay.

E. coli outer membrane proteins have been well characterized. Genes for the major porin proteins OmpC, OmpF and PhoE, which allow membrane permeability, have been cloned and sequenced. These porins are very abundant, form diffusion pores for small solutes (less than 400 to 600 Da), and serve as receptors for phages and colicins. OmpF and OmpC are regulated by the osmolarity and temperature of the growth medium. OmpC is preferentially expressed at high osmolarity (100–300 mM NaCl), where OmpF levels are very low. PhoE is induced at low phosphate concentrations; it shows selectivity for anions over cations and is proposed to participate in the scavenging and passage of phosphorylated compounds across the outer membrane. In contrast, OmpF is cation-selective; the permeability properties of OmpC are similar to those of OmpF, except that it forms the smallest pores of all three proteins. In addition to an OmpD protein, *S. typhimurium* contains OmpF, OmpC, and PhoE proteins similar to those found in *E. coli*; although their corresponding pore sizes appear to be larger (reviewed by Nakae, 1986). So far, the gene for the *S. typhimurium* structural (non-porin) outer membrane protein, OmpA, has been the only *omp* gene characterized from the *Salmonella* genus (Freudl and Cole, 1983).

No characterization of the physiological transport properties of the *S. typhi* outer membrane proteins has been reported so far. A purification scheme, some physicochemical properties, and a hemolytic effect have been described (Calderón et al., 1984).

Based on the fact that Gram-negative bacteria contain porins with similar characteristics to those found in *E. coli* (Nikaido and Vaara, 1985), we have undertaken the task of identifying, isolating and characterizing the genes for *S. typhi* outer membrane proteins using *E. coli* porin genes as heterologous probes. In this paper we describe the isolation and initial characterization of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *S. typhi*.

MATERIALS AND METHODS

(a) Strains and plasmids

S. typhi IMSS-1, a 9, 12, d, Vi serotype clinical strain isolated from a patient with typhoid fever, was kindly provided by Dr. J. Kumate and coworkers from the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City. *S. typhi* strains Ty2 and Rawlings (both of serotype 9, 12, d, Vi), and *S. typhimurium* strains NCTC74 (Mutton) and CDC6516-60 were all obtained from the American Type Culture Collection (Nos. 19430, 167, 13311 and 14028, respectively). Seventeen *S. typhi* clinical isolates of the MK series were kindly provided by Dr. G.M. Ruiz-Palacios and coworkers from the Instituto Nacional de la Nutrición, Mexico City. *E. coli* HB101, Q358, Q359, P678-54 and bacteriophage cloning vector λ 1059 have been described (Bolívar and Backman, 1979; Karn et al., 1980; Dougan and Kehoe, 1984). Plasmid pMY111 (Mizuno et al., 1983), carrying *E. coli ompC* was kindly supplied by Dr. M. Inouye; plasmid pBR322 (Bolívar et al., 1977; Balbás et al., 1986) was a gift from Dr. F. Bolívar.

(b) Construction of a *Salmonella typhi* gene library

S. typhi total DNA from strain IMSS-1 was isolated as described by Betlach et al. (1976). Fragments of 10–20 kb from a partial *Sau*3A digest were introduced into the *Bam*HI sites of bacteriophage λ 1059 as described by Karn et al. (1980). Recombinant phages were generated by in vitro encapsulation, using commercially available packaging extracts (Packagene, Promega Biotec, Madison, WI) and plated onto *E. coli* Q359.

(c) DNA hybridization

Plasmid pMY111 was used as a heterologous probe. It was purified following standard procedures (Bolívar and Backman, 1979), and labeled with [α - 32 P]dCTP (> 3000 Ci/mmol; Amersham International, Amersham, U.K.) to 10^8 cpm/ μ g using a commercially available nick-translation kit (Amersham International, Amersham, U.K.). Total genomic *S. typhi* or recombinant bacteriophage λ DNA was digested using restriction endonucleases (Promega Biotec; Madison, WI). The resulting fragments

were separated by agarose gel electrophoresis and Southern-blotted onto nitrocellulose filters (Schleicher & Schuell, Keene, NH) (Southern, 1975). Unless otherwise stated, the filters were pre-hybridized for 1 h at 42°C in 6 × SSC, 10 × Denhardt's solution (0.2% each of Ficoll, polyvinyl pyrrolidone and bovine serum albumin), 0.1 mg/ml of sonicated calf thymus DNA and 40% formamide. They were hybridized with 1 ml/lane of the same solution plus 0.1% SDS, 1.0 mM EDTA and 10⁶ cpm/ml of labeled plasmid at 42°C for 18 h. Subsequently, the filters were washed four times, 15 min each, with 1 × SSC at 65°C, dried, and exposed for autoradiography to Kodak X-OmatK film using enhancing screens.

(d) Screening of the bacteriophage gene library

Two thousand recombinant bacteriophage plaques were seeded onto lawns of *E. coli* Q359. Per petri dish 24 phages were inoculated; this was done in duplicate. One copy of each pool of 24 phages was eluted with SM (0.1 M Tris · HCl pH 7.9, 0.15 M NaCl, 0.01 M MgCl₂, and 0.1% gelatin). Aliquots from six pools were used for infecting 200 ml cultures by the preabsorption-dilution-shaking method described by Blattner et al. (1977). Bacteriophage DNA was prepared from these cultures, restricted with *Bgl*III, Southern-blotted, and hybridized with a ³²P-labeled pMY111 fragment carrying only the *E. coli ompC* gene. One group of bacteriophages, containing the appropriate hybridization signal, was further analyzed in the same manner by preparing, successively, DNA from individual pools and from individual bacteriophage.

This screening strategy allowed for the adequate representation of slow-growing bacteriophages and the probing of *S. typhi* cloned DNA without interference from hybridizing *E. coli* DNA. As control, the bacteriophage Southern blots were probed with ³²P-labeled pBR322, to discard any false-positive signals from rearranged λ1059 DNA (Schoenberg, 1984).

(e) Plasmid subcloning and minicell analysis

Standard procedures (Maniatis et al., 1982) were followed for subcloning DNA fragments from recombinant bacteriophage λ1059 into pBR322; and for subsequent transformation into *E. coli* HB101 or

the minicell-producing *E. coli* P678-54. Minicells were purified, pulse-chased with [³⁵S]methionine, and analyzed by 0.1% SDS-15% PAGE as described (Dougan and Kehoe, 1984).

(f) Preparation of outer membrane envelopes

Cells were cultured in nutrient broth (Bactonutrient broth; Difco, Detroit, MI) according to Nara et al. (1984). Triton X-100 insoluble envelope fractions were obtained as described by Matsuyama et al. (1984).

RESULTS AND DISCUSSION

(a) Isolation of the *Salmonella typhi ompC*-like gene

Plasmid pMY111 hybridized to a 3.0-kb band of *S. typhi* genomic DNA cleaved with *Bgl*III (Fig. 1). This was not observed when pBR322 vector or other *E. coli* outer membrane protein genes (*ompF*, *ompA* and *phoE*), were used as probes (not shown).

Screening of the *S. typhi* genomic library gave two recombinant bacteriophages which carried the 3.0-kb *Bgl*III band (Fig. 1). They gave lower titers with respect to the bulk recombinant bacteriophage population; this could be due to a deleterious effect on the host *E. coli* cells caused by the overexpression of a cloned outer membrane protein gene (see below, section c).

One phage, λVFC1, was chosen for further analysis. The 3.0-kb band was subcloned into the *Bam*HI site of pBR322 to construct plasmid pVF27. This subclone has the structure shown in Fig. 2.

(b) Expression and mapping

Derivatives pVF271, pVF274 and pVF275, containing smaller fragments of the insert as shown in Fig. 3A, were used to transform an *E. coli* minicell-producing strain. The proteins expressed by these plasmids in minicells were labeled with [³⁵S]methionine, subjected to SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography (Fig. 3B). Plasmids pVF27 and pVF271 produced a very intense 38.5-kDa protein and a less intense 39.5-kDa protein. The

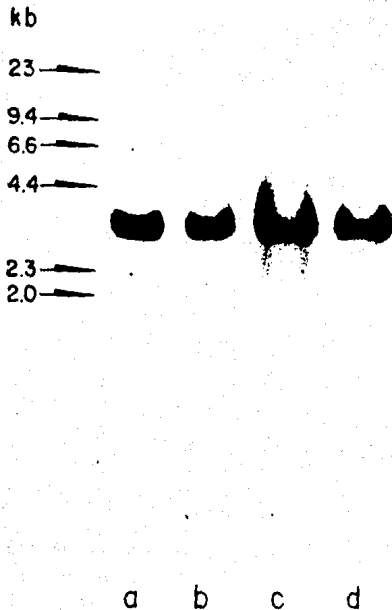


Fig. 1. Autoradiograph of the hybridization of (a, b) ^{32}P -labeled plasmid pMY111 (carrying *E. coli ompC*) to Southern blots of total genomic *S. typhi* DNA (3 μg) cut with *Bgl*II (lane a) or *Bgl*II + *Bam*HI (lane b); and (c, d) of the *Hind*III-*Sca*I ^{32}P -labeled fragment from pMY111 to purified recombinant phage λVFC1 (lane c) and λVFC2 (lane d) blotted DNA (1 μg) cut with *Bgl*II. DNA M_r markers are indicated in kb, and correspond to wild-type λ DNA digested with *Hind*III. Electrophoresis was done at 100 V for 2 h through 1% 1.5-mm thick agarose gels in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8). The DNA was transferred in $6 \times \text{SSC}$ to nitrocellulose membranes; and then hybridized as described in MATERIALS AND METHODS, section c. The radioactive probes had a specific activity of 10^8 cpm/ μg of DNA.

other two constructs, pVF274 and pVF275, did not express these proteins nor truncated forms. All the plasmids generated the β -lactamase (BL) vector gene product in its different forms of around 28 kDa.

To find a smaller fragment containing the whole *ompC*-like gene, Southern blots of different restriction fragments of the 3.0-kb *Bgl*II band were hybridized to the purified *Hind*III-*Sca*I fragment of pMY111 encompassing only *E. coli ompC* (Mizuno et al., 1983). Results of these experiments are shown

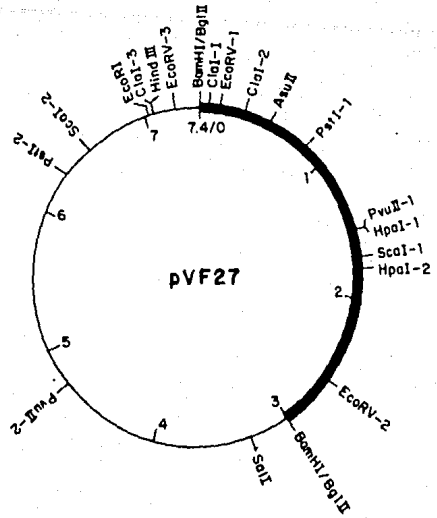


Fig. 2. Circular restriction map of plasmid pVF27, which carries the *S. typhi ompC*-like gene. The insert DNA is shown as a heavy line; the thin line represents pBR322 vector DNA. When the 3.0-kb *Bgl*II fragment from λVFC1 is ligated to the pBR322 digested with *Bam*HI, both restriction sites are lost in the recombinant plasmid pVF27. The scale is in kb.

in Fig. 4. It can be inferred that the 1.3-kb fragment that spans the region from the *Asu*II to the *Hpa*I-2 site contains the entire *ompC*-like gene since there were no hybridization signals observed in fragments pictured to the left of the *Asu*II site or to the right of the *Hpa*I-2 site. Therefore, considering that the *ompC*-like gene is located towards the left side of the 3.0-kb *Bgl*II fragment (Fig. 4), and since no protein is generated by pVF274 plasmid (Fig. 3), we deduce that the start of transcription lies to the right of the *Pvu*II site, possibly in the 0.25-kb *Hpa*I-*Hpa*I fragment. This implies that the direction of transcription proceeds to the left, from the *Hpa*I-2 to *Asu*II restriction sites. Based on the apparent M_r of the protein product, the structural gene should fit between these two sites.

Comparison of the *S. typhi ompC*-like gene with its counterpart in *E. coli* (Mizuno et al., 1983) reveals the conservation of the *Pst*I, *Pvu*II, and *Sca*I restriction sites in the structural gene. In contrast, there are two *Hpa*I sites in *S. typhi* that are absent in *E. coli*. Sites for *Eco*RI and *Bgl*II in *E. coli* are missing in *S. typhi*.

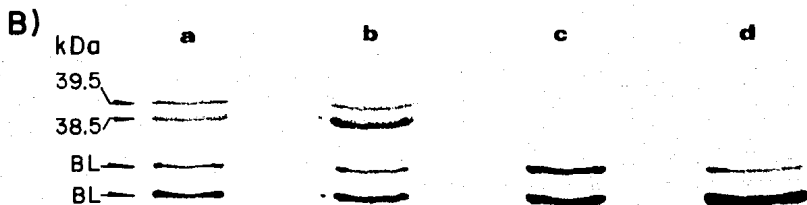
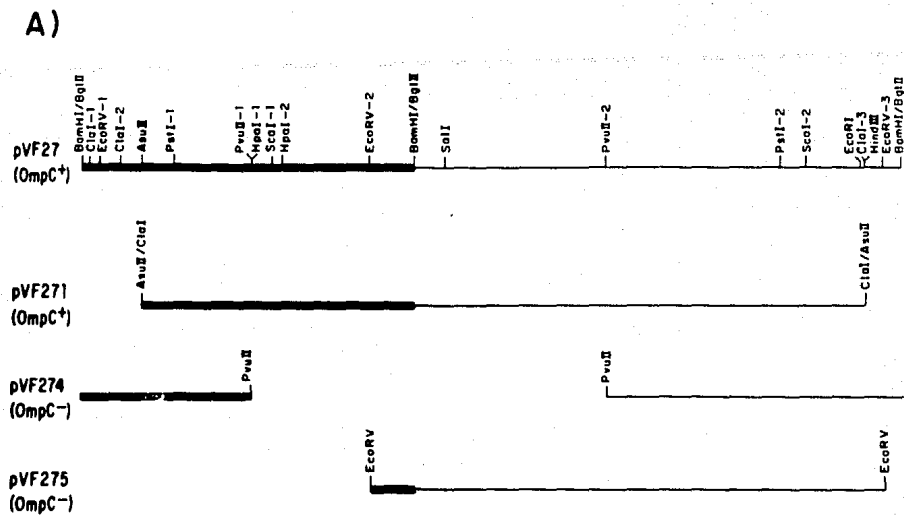


Fig. 3. Analysis of plasmid pVF27 and its products. (A) Diagrams of plasmids pVF27 and its derivatives, pVF271, pVF274, and pVF275. The *S. typhi* DNA inserts are shown as thick lines; thin lines represent pBR322 DNA. DNA that is missing in each plasmid is shown as gaps. Plasmids coding for the OmpC-like protein are indicated with an OmpC⁺ symbol. Deletion mutant plasmids of pVF27 were constructed digesting purified pVF27 DNA with *AsuII* + *ClaI*, *PvuII*, or *EcoRV*. After subsequent ligation of the largest purified fragment of each restriction pattern, the DNA preparations were transformed into strain HB101, selecting for ampicillin-resistant colonies. Plasmids pVF271, pVF274 and pVF275 were selected for further characterization in minicell-producing *E. coli* P678-54. Sites for *AsuII* and *ClaI* are lost in pVF271. *PvuII* and *EcoRV* sites are regenerated in pVF274 and pVF275, respectively. (B) Autoradiograph of ³⁵S-labeled proteins produced in minicells containing plasmids pVF27 (lane a), pVF271 (lane b), pVF274 (lane c), and pVF275 (lane d). The apparent protein *M_s* are indicated in kDa; BL represents the β-lactamase plasmid products. Experimental details were as described in MATERIALS AND METHODS, section e. Briefly, minicells carrying each plasmid were purified by centrifugation through 20% sucrose gradients; then, plasmid-specific products were pulse-labeled with 2.0 μCi of [³⁵S]methionine (> 800 Ci/mmol; Amersham International, Amersham, U.K.) for 30 min at 37°C, and resuspended in 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 3% SDS, 0.125 M Tris (pH 6.8), 0.1% bromophenol blue; boiled (95°–100°C) for 5 min and then analysed by 0.1% SDS–15% PAGE at 40 mA for 4 h; the gel was dried and exposed to x-ray film.

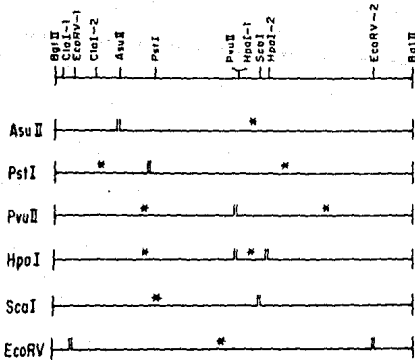


Fig. 4. Restriction map of the 3.0-kb *Bgl*II insert of *S. typhi* DNA contained in pVF27. The segments that hybridize with the *Hind*III-*Sca*I fragment of pMY111 (*E. coli ompC*) are indicated with asterisks.

(c) Analysis of outer membrane envelopes

Analyzing the proteins that constitute the outer membrane envelope of *S. typhi* (Fig. 5, lanes a and b), it can be observed that the *ompC*-like gene product (lane c) comigrates with a 38.5-kDa protein, which is expressed under low and high osmolarity conditions. This may indicate that regulation of the *OmpC*-like protein in *S. typhi* differs from that in *E. coli* since the latter is preferentially expressed at high osmolarity (Hancock, 1985). In contrast, the presence of a 37-kDa protein in the outer membrane of *S. typhi* is almost completely repressed at high osmolarity (Fig. 5, lane a), behaving in an *E. coli* *OmpF*-like manner.

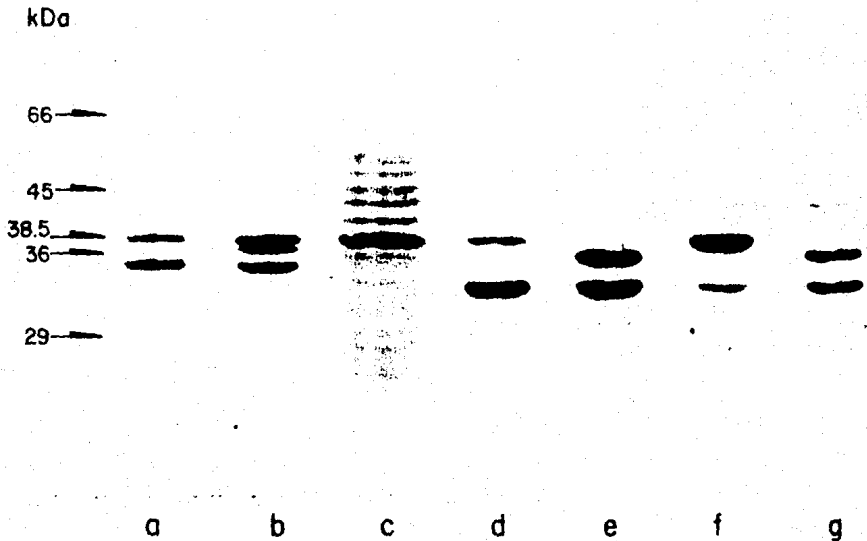


Fig. 5. Electrophoretic pattern of Coomassie brilliant blue-stained outer membrane protein preparations, separated by 0.1% SDS-15% PAGE, from: *S. typhi* IMSS-1 grown in nutrient medium in the presence (lane a) or absence (lane b) of 20% sucrose; *E. coli* HB101 (lanes d, e) and P678-54 (lanes f, g) grown in nutrient medium in the absence of sucrose carrying (lanes d, f) or not (lanes e, g) plasmid pVF27. Lane c corresponds to a total cell extract of *E. coli* P678-54 minicells harboring pVF27. The outer membrane protein preparations were obtained as follows: cells were grown to late logarithmic phase at 37°C in the appropriate culture medium. Cells were washed, resuspended in 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) and disrupted by sonication. The membrane fraction was recovered by centrifugation at 40000 rev./min in the Beckman T170 rotor for 30 min and then resuspended in 2% Triton X-100, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2). After incubation at 37°C for 15 min, the Triton X-100-insoluble fraction was recovered by centrifugation at 40000 rev./min for 30 min. This pellet was finally washed in 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) and resuspended in 1% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 10 M urea, and 0.005% bromophenol blue. It was boiled for 5 min and analysed by 0.1% SDS-15% PAGE at 40 mA for 4 h. Protein molecular weight markers are indicated in kDa; they correspond in descending order to plasma bovine albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), and carbonic anhydrase (29 kDa). The arrow at 38.5 kDa indicates the apparent *M_r* obtained for the *OmpC*-like protein.

SDS-PAGE analysis of the outer membrane proteins, purified from the two *E. coli* strains containing pVF27 (Fig. 5, lanes d and f), showed that the cloned 38.5-kDa OmpC-like protein is incorporated into the outer membrane of its host. The absence of the 39.5-kDa band (Fig. 3B) in outer membrane preparations suggests that it may correspond to an unprocessed precursor of the OmpC-like *S. typhi* protein, still carrying the uncleaved leader sequence. In *E. coli*, the *S. typhi* OmpC-like protein appears as one of the most abundant outer membrane proteins (Fig. 5, lanes d and f); interestingly, the presence of some endogenous proteins is lowered as compared with Fig. 5, lanes e and g. This might be due to the fact that the cloned gene is highly expressed, as evidenced by the predominant presence of its protein product in a total cell extract (Fig. 5, lane c). Thus, the multi-

copy gene and its product could possibly be competing favorably for expression or processing and membrane transport factors, respectively.

(d) Presence of the gene in different strains

The fact that the 38.5-kDa protein is expressed in *S. typhi* under both osmolarity conditions may be relevant to the bacteria in the environment provided by their natural host. We believe that this protein is a suitable candidate to be expressed in the serum of patients with typhoid fever, since the osmolarity of human serum is high (0.9%, or 150 mM, NaCl is nearly equivalent to 10% sucrose; Nikaïdo and Vaara, 1985). In this respect the *S. typhi ompC*-like gene is present in all 17 clinical isolates tested and also in *S. typhi* and *S. typhimurium* reference strains

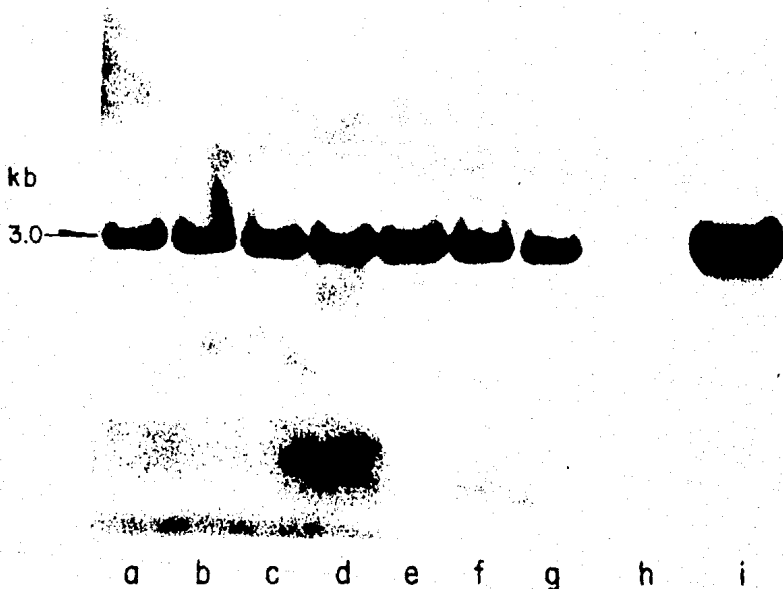


Fig. 6. Autoradiograph of the hybridization of the *S. typhi* ^{32}P -labeled *Scal*-*Aru*II fragment from pVF27 to Southern blots of *Bgl*II-cut DNA from: *S. typhimurium* strain CDC6516-60 (lane a); *S. typhi* clinical isolates MK20 (lane b), MK24 (lane c), MK27 (lane d), strains IMSS-1 (lane e), Ty2 (lanes f, i) and Rawlings (lane g); and *E. coli* Q359 (lane h). Lanes a-g contain 3 μg and lanes h-i 6 μg of DNA. Experimental details were as described in RESULTS AND DISCUSSION, section 4. Electrophoresis and transfer of the gel were done as described in the legend to Fig. 1. Hybridization was done with 5×10^5 cpm/lane in a solution containing 0.1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 7.5), $5 \times \text{SSC}$, $10 \times$ Denhardt's solution (see MATERIALS AND METHODS, section c) and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of sonicated calf thymus DNA, at 65°C for 18 h; then washed down to $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS at 65°C and exposed for autoradiography to Kodak X-OmatK film using enhancing screens.

(see MATERIALS AND METHODS, section a). Representative hybridizations, to illustrate this point, are shown in Fig. 6. Hybridization of the *S. typhi ompC*-like gene probe was done under stringent conditions (0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.5, 5 × SSC, 10 × Denhardt's solution, 100 µg/ml sonicated calf thymus DNA, 65°C, 18 h; with washes down to 0.1 × SSC, 0.1% SDS, at 65°C); interestingly, no signal is obtained with *E. coli* DNA (Fig. 6, lane h). It remains to be seen if the regions corresponding to exposed epitopes are conserved among the various *S. typhi* clinical isolates.

(e) Conclusions

Comparison of the N termini of the cloned OmpC-like protein and of the 38.5-kDa protein expressed by *S. typhi* in vivo should unequivocally establish their identity. Knowledge of the nucleotide sequence of the structural *ompC*-like gene should confirm the gene-product relationship.

Learning about outer membrane protein gene structure and function should allow the identification of exposed epitopes in the protein products (Freudl and Cole, 1983; Freudl et al., 1986), and in determining if any of them are species-specific. The possibility of overexpressing the outer membrane proteins, perhaps in a minicell system, should prove useful in protection experiments; large amounts of the protein of interest should aid in generating monoclonal antibodies that could be used in immunodiagnosis. Aside from possible biotechnological applications, we are interested in exploring the role of *S. typhi* OmpC protein in the humoral and cellular immunity events of typhoid fever.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Jesús Kumate and his collaborators, from the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, for introducing us into the area of research on typhoid fever. We thank Drs. Luis Servín and Baltazar Becerril for critically reviewing the manuscript. This work was partially supported by grant PCSABNA-030735 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

REFERENCES

- Balbás, P., Soberón, X., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N. and Bolívar, F.: Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives — a review. *Gene* 50 (1986) 3–40.
- Bellach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. and Boyer, H.W.: A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *EcoRI* restriction modification of DNA. *Fed. Proc.* 35 (1976) 2037–2043.
- Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.-A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L. and Smithies, O.: Charon phages: safer derivatives of bacteriophage λ for DNA cloning. *Science* 196 (1977) 161–169.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Bellach, M.C., Heyncker, H.L., Boyer, H.W., Crossa, J. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95–113.
- Bolívar, F. and Backman, K.: Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68 (1979) 245–267.
- Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H. and Mora, G.C.: Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. Immun.* 52 (1986) 209–212.
- Calderón, I., Lobos, S.R. and Mora, G.C.: The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty2 porins. *Eur. J. Biochem.* 141 (1984) 579–583.
- Dougan, G. and Kehoe, M.: The minicell system as a method for studying expression from plasmid DNA. *Methods Microbiol.* 17 (1984) 233–258.
- Edelman, R. and Levine, M.M.: Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 8 (1986) 329–349.
- Freudl, R. and Cole, S.T.: Cloning and molecular characterization of the *ompA* gene from *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* 134 (1983) 497–502.
- Freudl, R., MacIntyre, S., Degen, M. and Henning, U.: Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 491–494.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. and Cesareni, G.: Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5172–5176.
- Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H. and Mäkelä, P.H.: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34 (1981) 328–332.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Matsuyama, S.-I., Inokuchi, K. and Mizushima, S.: Promoter exchange between *ompF* and *ompC* genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 158 (1984) 1041–1047.
- Mizuno, T., Chou, M.-Y. and Inouye, M.: A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6932–6940.

- Nakac, T.: Outer membrane permeability of bacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13 (1986) 1-62.
- Nara, F., Inokuchi, K., Matsuyama, S.-J., and Mizushima, S.: Mutation causing reverse osmoregulation of synthesis of OmpF, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159 (1984) 688-692.
- Nikaido, H. and Vaara, M.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49 (1985) 1-32.
- Schoenberg, D.R.: Interference with the screening of genomic libraries by rearrangements of λ 1059. *Gene Anal. Technol.* 1 (1984) 8-12.
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503-517.
- Tapa, S. and Cvjetanović, B.: Controlled field trial on the effectiveness of one and two doses of acetone-inactivated and dried typhoid vaccine. *Bull. World Health Org.* 52 (1975) 75-80.
- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55 (1987a) 816-821.
- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R.: An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed-type hypersensitivity in murine salmonellosis. *Infect. Immun.* 55 (1987b) 822-824.

Communicated by F. Bolivar.

MOLECULAR CLONING OF SALMONELLA TYPHI OUTER MEMBRANE PROTEIN AND ENTEROTOXIN GENES. E.CALVA*, H.DE LA VEGA, M.FERNANDEZ, V.FLORES, Y.FUCHS, A. HERNANDEZ, J.L.PUENTE, AND M. VAZQUEZ. Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. Apdo Postal 70479, México DF 04510, México.

S. typhi outer membrane proteins (OMPs) could be important antigens in the development of rapid diagnostic tests or acellular vaccines for typhoid fever. We are interested in characterizing the OMP exposed epitopes from different clinical isolates. Also, we want to study the role of a cholera-like enterotoxin gene that we have detected in S. typhi.

We constructed a S. typhi total genomic library in coliphage lambda 1059. DNA from recombinant phage pools was screened with radioactive E. coli genes: ompC, ompF, and phoE, which code for pore-forming OMPs (porins) that are expressed preferentially at high osmolarity, low osmolarity, and low phosphate, respectively; and with LT-B, which codes for the B subunit of the heat-labile enterotoxin. Phages were isolated with each probe and mapped with restriction endonucleases. Lambda VFC1 carries the S. typhi ompC-like gene, which was subcloned to form pVF27. This plasmid codes for a 38.5 kd app.mol.wt. protein that is processed and incorporated into the outer membrane of E.coli. It comigrates with a S. typhi OMP that is expressed in vivo at low and high osmolarity. Lambda FDC1 carries the S. typhi LT-like gene; it does not hybridize with an oligonucleotide that defines a putative GM-1 binding site of cholera toxin. This phage codes for an enterotoxin that is active in rabbit ileal loops and does not bind to GM-1 (G.M. Ruiz-Palacios et al., pers. comm.). Both genes are present in all 17 different clinical isolates tested so far.

B 8

VIRULENCE DETERMINANTS AND TRANSPOSON CONTENT OF F1me PLASMIDS FROM SALMONELLA WIEN.

Bianca COLONNA* and Maria BERNARDINI.
Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma "La Sapienza", 00185 ROME (Italy).

F1me plasmids are R plasmids found in many pathogenic species of Enterobacteria. All the F1me plasmids isolated so far have a large size (100-180 kb), contain several resistance genes and are conjugative or defective conjugative. The emergence and the diffusion of some epidemic strains of human Salmonella have been correlated to the acquisition of F1me plasmids. F1me plasmids isolated over several years from different bacterial strains and in different countries share a high degree of DNA homology as well as a characteristic restriction enzyme pattern. F1me plasmids contain a composite element which carries the genes for an aerobactin-mediated iron uptake system and is flanked by two IS1 inverted repeats. Moreover the TraT protein seem to be involved in a plasmid-mediated resistance to the killing activity of serum complement. To investigate on the origin of their complex R determinant we tested the transposon content of pZM3, an F1me plasmid isolated during the first epidemic caused by this serotype in Algeria. Our data strengthen the view that the acquisition of multiple drug transposons by virulence plasmids might be highly relevant to the recent dramatic spreading of pathogenic enterobacterial strains.

- 716 Comparative Lytic Activity of Cefixime with That of Cefaclor, Cephalixin and Cefadroxil. N.X. CHIN* and H.C. NEU. Columbia University, New York, N.Y.

Cefixime is a broad spectrum of 3rd generation cephen which can be administered orally. It has high affinity for PBP 1a, 1b and PBP3. We wished to see if an agent with greater affinity for PBP 1b would cause more rapid lysis than do agents binding primarily to PBP3. The lytic activity of cefixime was determined by optical density change and CFUs in comparison with cefaclor, cephalixin and cefadroxil against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *S. aureus*. Concentrations used were those achievable in urine in the first 2h after standard doses. Cefixime produced rapid lysis after 2h exposure. By 6h there was a 4 to 5 log₁₀ reduction in CFU for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*. There was a similar decrease in O.D. Cefixime had superior lytic activity compared to cefaclor and markedly greater activity than cephalixin and cefadroxil against *E. coli*, *K. pneumoniae*, but no significant difference in lysis of *S. aureus* for the four agents. None of the cephalosporins had significant lytic activity for *P. mirabilis*. The rapid lytic activity in media similar to urine of cefixime and cephalixin may explain their excellent single dose cure of urinary tract infections compared to poor results with cefaclor.

- 719 The Effect of pH on Nitrocefin Permeability in Two Strains of *Bacteroides fragilis*. G.J. CUCHURAL*, S. HURLBUT and N.V. JACOBUS. Tufts-WENC Boston, MA.

Previous work in our laboratory showed a significant increase in MIC's to cotrimox (4 fold) and Imipenem (25 fold) when the pH was lowered from 7.0 to 5.5. This loss of activity was not seen with piperacillin or clindamycin. There was no increased drug destruction due to the lower pH. We determined the β -lactamase activity and outer membrane permeability to nitrocefin through a pH range of 5.5 to 7.0. β -lactamase activity was determined spectrophotometrically. Outer membrane permeability was determined by the method of Zimmerman (AAC 12:369,1977). We found that the permeability was maximal at pH 7.0 and declined by over a factor of 10 at pH 5.5. β -lactamase activity also declined. However, the net effect was lower periplasmic drug concentrations by about 10 fold. Our findings suggest lower pH is associated with lower β -lactam drug permeability and increased drug resistance. Imipenem was most affected probably because of the loss of zwitterionic character at the lower pH. This finding may also explain in part the relative difficulty in treating undraind anaerobic abscesses which are associated with low pH.

REFERENCIA 36

- 716 Isolation of *Salmonella typhi* ompC-, ompF- and phoE-like outer membrane protein genes. J.L. PUENTE, V. FLORES, M. FERNANDEZ, Y. FUGHS and E. CALVA*. Res. Ct. for Genetic Engineering and Biotechnology, Cuernavaca, México.

Considering that the outer membrane proteins of *S. typhi* are important immunogens in patients with typhoid fever, we have isolated ompC-, ompF- and phoE-like genes from a λ 1059 *S. typhi* genomic library, using the equivalent *E. coli* genes as heterologous probes. In *E. coli* these genes code for the outer membrane porins which are expressed at high osmolarity, low osmolarity and low phosphate, respectively. Restriction fragments containing ompC- and phoE-like genes were subcloned in pBR322, while the ompF-like gene was subcloned in pBR325. The *ompF* plasmid was used to transform an *E. coli* minicell-producing strain. Pulse chasing with ³⁵S-met and SDS-PAGE showed that the Omp C-like protein was expressed in minicells and was readily incorporated into the outer membrane of the *E. coli* host. This allowed us to identify the Omp C-like protein in outer membrane protein preparations of *S. typhi* grown under low and high osmolarity conditions.

It is relevant to mention that the isolated *S. typhi* porin genes hybridize only to *S. typhi* and *S. typhimurium* DNA, but not to the *E. coli* genome, under highly stringent conditions.

- 717 Penicillin-binding proteins of *B. fragilis* group species and correlation of antimicrobial resistance with changes in PBP patterns. M.M. WEXLER*, S. HALESIAN, and S.M. FINEGOLD, VA Longworth Medical Center and UCLA School of Medicine, Los Angeles, Ca.

The penicillin binding proteins (PBPs) of ATCC type strains of seven species of the *B. fragilis* group were visualized by gel electrophoresis and subsequent fluorography of radioactively labelled PBPs. Each species had a distinctive PBP pattern, ranging from 3 proteins for *B. distasonis* to 9 for *B. vulgatus* with molecular weights ranging from 44k to 82k daltons. A laboratory derived cefaditin resistant mutant of *B. distasonis* was compared to the wild type (WT) and revertant (i.e. cefaditin sensitive) strains. The mutant strain showed decreased binding of ¹⁴C-penicillin (43% as compared to the WC (100%) and revertant (69%) strains. The fluorograph indicated a marked depression in PBP 1 (MW 79,000) in the mutant as compared to the wild type and revertant strains. Competition experiments with unlabelled cefaditin were performed with clinical strains of varying sensitivity to cefaditin. Cefaditin competed more effectively with labelled penicillin in sensitive than in resistant strains. Further competition studies with clinical strains are in progress.

- 719 Bacteriodes Conjugal Tetracycline Resistance Elements Mediate Tetracycline Dependent Excision of Integrated Plasmids from the Bacteriodes Chromosome. N. B. SHOEMAKER, and A. A. SALYERS*. University of Illinois, Urbana, IL

Conjugal tetracycline resistance (Tc^R) elements, which appear to be chromosomal, have been found in many strains of human colonic *Bacteroides*. We show that several of these elements can mediate tetracycline-dependent excision of integrated plasmid-like elements from the chromosome. When *Bacteroides uniformis* 0061, containing a conjugal Tc^R element from *Bacteroides fragilis* ERL, is grown in tetracycline, a 10.5 kb plasmid (pNBUI) and an 11.5kb plasmid (pNBUI2) can be detected. Neither plasmid is detectable when *B. uniformis* 0061 (Tc^R -ERL) is grown without tetracycline, but results of Southern hybridization analysis demonstrate that both plasmids are now integrated in the chromosome. pNBUI and pNBUI2 are not identical but contain at least one cross-hybridizing region. pNBUI carries a mobilization region that is recognized by the Tc^R -ERL element. Other *Bacteroides* conjugal Tc^R elements mediate the excision of pNBUI, but not pNBUI2, from the chromosome. Thus the different Tc^R elements may be related but not identical.

- 720 Transferable Trospectomycin(U-63866F) Resistance Determinant in *Bacteroides fragilis* (BF), D.W. HECHT*, P.P. TALLEY, and M.H. WALSH*. Tufts Univ. and New England Medical Center, Boston, MA.

Antibiotic resistance in BF, once rare, has increased so that 70% of strains are tetracycline resistant (Tet^R). We have previously described an inducible Tet^R transfer determinant, the "Tet Element" that transfers Tet^R , ampicillin, cefoxitin and clindamycin (Cln^R) resistances by conjugation. BF strain TP230 contains the "Tet Element" and Cln^R . We have discovered that TP230 is resistant to trospectomycin ($Tras^R$), an experimental antibiotic with excellent *in vitro* activity against BF.

Characterization of resistance transfer in TP230 in Tet induced-time-filter-matings has revealed a transfer of $Tras^R$ occurs as an unselected marker in 50% of Tet selected transconjugants ($Tras^+$). Earliest transfer occurs at 30 min after mixing donor(D) and recipient(R). 30 min after first Tet^R marker, and has a maximum frequency of transfer at 10^7 per D at three hours. Cln^R occurred in 30% of Tet^R , 30% of $Tras^+$, and 30% of $Tet^R/Tras^+$. $Tet^R/Tras^+$ or Tet^R/Cln^R Tc^R had similar D properties as TP230; b) transfer of $Tras^R$ occurs at a frequency of 10^7 per D when it is the primary selected marker, with earliest transfer 60 min after D/E mixing. $Tras^R$ was present in less than 10% of Tc^R as an unselected marker, and Cln^R was not separated from Tet^R . No Tet induced $Tras^R/Tras^+$ or $Tras^R/Cln^R$ transfer.

The "Tet element" of TP230 can transfer Tet^R , Cln^R and is required for transfer of $Tras^R$, a semi-antibiotic resistance marker in BF. Resistance to this agent may arise as a consequence of its determinant's association with transfer elements.

RESULTADOS

I.- CARACTERIZACION PRELIMINAR DEL GENE ompC DE Salmonella typhi.

Los resultados sobre la clonación y la caracterización inicial del gene ompC se describen en el apéndice II (37).

II.- CARACTERIZACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL GENE ompC.

La secuencia nucleotídica del fragmento comprendido entre el sitio de A_{su}II al sitio de E_{co}RV-2 del pVF27 fue iniciada. En la figura 1 se muestra la estrategia inicial de secuenciación. El fragmento seleccionado contiene el gene estructural completo, aproximadamente 1000 pares de bases (pb), más un fragmento de 850 pb hacia arriba del sitio donde probablemente inicia la traducción. Aquí deben estar comprendidas las secuencias regulatorias, así como secuencias vecinas. Hacia abajo del extremo 3' del gene se incluyen alrededor de 100 pb extras, donde quedan comprendidas las secuencias que intervienen en la terminación de la transcripción, así como el codón de terminación de la traducción.

La secuencia nucleotídica se determinó utilizando fragmentos de menor tamaño, derivados por digestión con diferentes enzimas de restricción (ER) del fragmento A_{su}II-E_{co}RV-2, y clonándolos en M13 vectores mp18 y mp19 para obtener ambas orientaciones de los insertos.

La figura 2 muestra la secuencia nucleotídica parcial del gene ompC deducida a partir de los fragmentos H_{pa}I-1-H_{pa}I-2 (fragmento 1) y de A_{su}II-P_{st}I (fragmento 2); a este último se le incluye parte de la secuencia del fragmento de P_{st}I-H_{pa}I-1 (fragmento 3), la cual no ha sido totalmente determinada.

La comparación del fragmento 1 con la región respectiva en el gene de E. coli muestra claramente como la secuencia que codifica para

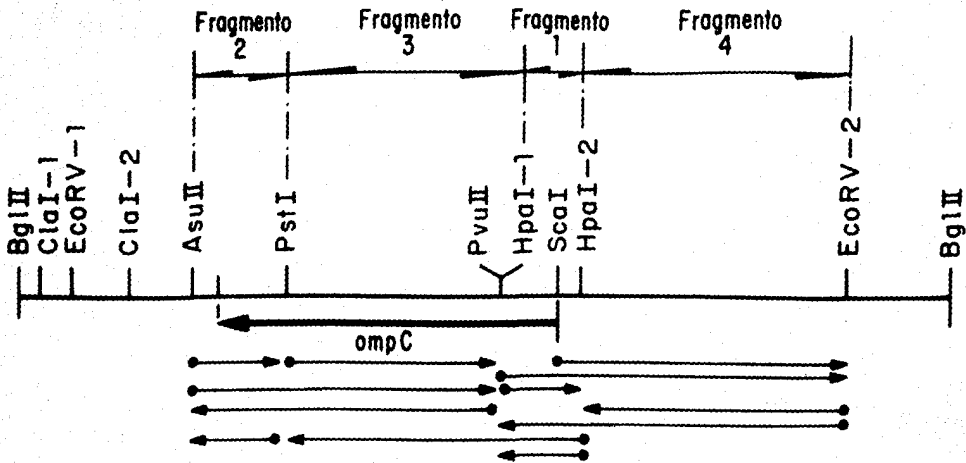


FIG.1.- Mapa de restricción del inserto del plásmido pVF27 y estrategia inicial de secuenciación.

Hpa II M^HILYsValLys
 GTTAATCAGTATGCAGTGGCATAAAAAAGCAATAAAGGCATATAACAGAGGGTTAATAACATGAAAGTTAAA
 * * * * *
 gtcaaccagtaagcagtgccataaaaaagcaaataaaggcatataacagagggttaataacag^ggaaagttaa
 * * * * *

ScaI- -1 +1
 ValLeuSerLeuLeuValProAlaLeuLeuValAlaGlyAlaAlaAsnAlaAlaGluValTyrAsnLysAspGly
 GTACTGTCCCTCCTGGTCCCAGCTCTGCTGGTAGCAGGCCAGCAAAACGCTGCTGAAGTTTACAACAAGACGGC
 * * * * *
 #tctgttccctcctggtaccagctctctctgttggcagggcagcagcgaatgcgctgaatttataataaagacggc
 ile
 #####

20

AsnLysLeuAspLeuTyrGlyLysValAspGlyLeuHisTyrPheSerAspAsnLysAspValAspGlyAspGln
 AACAAATTAGATCTGTACGGTAAAGTAGACGGCCTGCACTATTTCTCTGACAAACAAGATGTAGATGGCGACCAG
 * * * * *
 accaanttagaccttttggtaagttgatggcctgcactactctctgacgacaaagcagcagcggcaccag
 Phe Asp GlySer

#####

40 Hpa II

ThrTyrMetArgLeuGlyPheLysGlyGluThrGlnValThr
 ACCTACATCGCTTGGCTTCAAAGGTGAAACTCAGGTTACT
 * * * * *
 ecctacatggctatcgcttcaaggcgaascgaggttaac
 ile Asn

FIG.2.- Comparación de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de los fragmentos 1 (panel A) y 2 (panel B) descritos en la Fig.1, del gene ompC de *S.typhi*, con las regiones correspondientes del gene de *E.coli* (28). La secuencia en mayúsculas corresponde al gene de *E.coli* y la secuencia en minúsculas al de *S.typhi*. Las regiones variables están delimitadas por rectángulos. La secuencia subrayada corresponde al péptido señal (El codón de inicio está remarcado, ATG). Las flechas (---) (---) indican secuencias invertidas repetidas. El doble subrayado (===) secuencia Shine-Dalgarno. Los asteriscos (****) entre las cadenas indican la presencia de los mismos nucleótidos en *S.typhi* y en *E.coli*, al final de la secuencia de aminoácidos señalan el codón de terminación. Para *S.typhi* solo se señalan los aminoácidos variables. Las barras (###) indican las regiones hidrofílicas según el perfil hidropático de la figura 3.

B

245 260
 ThrArgValGlySerLeuGlyTrpAlaAsnLysAlaGlnAsnPheGluAlaValAlaGlnTyrGlnPheAspPhe
 ACTCGCGTAGGTTCCCTGGGTTGGGCGAACAAAGCACAGAAGCTCGAAGCTGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTC
 * * * * *
 caaccgtccacctcttacggtttgcccacaaagcgcagaactttgaagtggttgcgcagtagcagttcgacttt
 GlnProSerThr Tyr LeuPro Val

#####

-PstI-280

GlyLeuArgProSerLeuAlaTyrLeuGlnSerLysGlyLysAsnLeuGlyArgGly-----TyrAsp
 GGTCTGCGTCCGTCCTGGCTTACCTGCAGTCTAAAGGTA AAAACCTGGGTCGTGGC-----TACGAC
 * * * * *
 ggtctgctccgtctgtggcttacctgcagctctaaacctaaaggacatcagcaacggctacggcgccagctatggc
 Val Pro AspIleSerAsn TyrGlyAlaSer Gly

#####

300

AspGluAspIleLeuLysTyrValAspValGlyAlaThrTyrTyrPheAsnLysAsnMetSerThrTyrValAsp
 GACGAAGATATCCTGAAATATGTTGATGTTGGTCTACTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTACGTTGAC
 * * * * *
 gaccagacatcgtaaaatagttgatgtcggcgcgacttactacttcaacaaaaacatgtccacctatgttgat
 Gln Val

#####

320 340

TyrLysIleAsnLeuLeuAspAspAsnGlnPheThrArgAspAlaGlyIleAsnThrAspAsnIleValAlaLeu
 TACAAAATCAACCTGCTGGACGACAACCACTTCACTCGTGACGCTGGCATCAACACTGATAACATCGTAGCTCG
 * * * * *
 tacaaaatcaacctgctggataaaaaagcactttacgcgataccgggcatcaacaccgacgacatcgtagcgtg
 Lys Asp Tyr Asp

#####

GlyLeuValTyrGlnPhe***
 GGTCTGGTTTACCAGTCTAATCTCGATTGATATCGAAGAAGGGCCTGGGGCCCTTTTTTTCATTGTTTTACGG
 * * * * *
 ggtctggttaccagttctaactcagcaaaagatgttgcctaaaggcctcggggcccttttttcagcctattggc
 -----) (-----) (-----

Asu II

TACAACTCAGTTTTTTGGTGTACTCTTGGACCGTTCGCA
 * * * * *
 tacaaatcagacgttttgatatacgttgcgaccattcga

el péptido señal y el extremo amino terminal conservan un alto grado de similitud (Fig. 2A). La secuencia nucleotídica del péptido señal es básicamente idéntica (conservan el 90% de similitud), solamente presenta cambios puntuales en la tercera base de algunos codones, lo que genera el 100% de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos. A su vez, en la comparación del trecho correspondiente al amino terminal se pueden observar similitudes también del 90% a nivel de secuencia nucleotídica; sin embargo, la secuencia de aminoácidos difiere en aproximadamente el 13% (Fig.2A).

La comparación del fragmento 2 de ambos genes (Fig.2B), la cual comprende aproximadamente 408 pb del extremo carboxilo terminal, incluyendo las secuencias de terminación de la transcripción, señala que existe un 73% de similitud, tanto a nivel de secuencia nucleotídica como de secuencia de aminoácidos. En la Fig.2B, se resalta que esta región en S.typhi presenta principalmente cuatro trechos con alta variabilidad. El segundo de los trechos presenta además una inserción de 4 triplete, la cual puede explicar en parte, porque el peso molecular aparente de la proteína OmpC de S.typhi, es mayor que el de E.coli (apéndice II, Fig.3 y 5. 37). Además, aún no se puede descartar la posibilidad de que existan más inserciones de este tipo, así como tampoco el que pueda haber deleciones para el gene de S.typhi con respecto al de E.coli. El cuarto de estos trechos variables corresponde a la región de terminación; donde 16 nucleótidos inmediatamente después del codón TAA son diferentes. Estos nucleótidos preceden a un trecho más largo que se conserva entre los genes de las dos bacterias y que corresponde a un terminador rho-independiente (28). Sin embargo, a diferencia de E.coli, este trecho presenta secuencias repetidas invertidas, las cuales pueden formar una

estructura de tallo y asa. La estructura del tallo sería más bien inestable por su mayor contenido de pares A-T. Sin embargo, su formación y función son muy especulativas hasta este momento.

Comparando la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos con las secuencias correspondientes de E.coli, se ha mostrado que a lo largo del gene existen regiones totalmente conservadas y que estas corresponden principalmente a trechos hidrofóbicos. Las regiones variables parecen corresponder a secuencias de epitopes expuestos. La deducción anterior se basa en la generación de perfiles de hidrofiliidad e hidrofobicidad de los fragmentos 1 y 2, y compararlos con los perfiles de estos mismos en E.coli (Fig. 3). Para este análisis se utilizó el método descrito por Hopp y Woods (17). Este sistema se seleccionó debido a que al igual que la mayoría de las escalas, ésta se basa en la solubilidad en agua de los aminoácidos individuales y sugiere aquellos que favorecen su exposición a la superficie. Además, comparativamente con otros sistemas descritos, da el mejor rango de confiabilidad; lo anterior se demuestra en un análisis realizado con base en la información conocida para 12 proteínas diferentes, donde en el 100% de los casos el epitope más importante, señalado por este método, correlaciona con lo conocido para cada proteína (17).

Nuestros resultados indicaron que en general todas las regiones variables corresponden a trechos hidrofílicos y que los cambios que se presentan entre las secuencias de ambas bacterias son principalmente sustituciones por aminoácidos con características equivalentes; esto es, que mantienen el carácter hidrofílico de esa región. Lo anterior significaría que esta porción de la proteína continuaría siendo

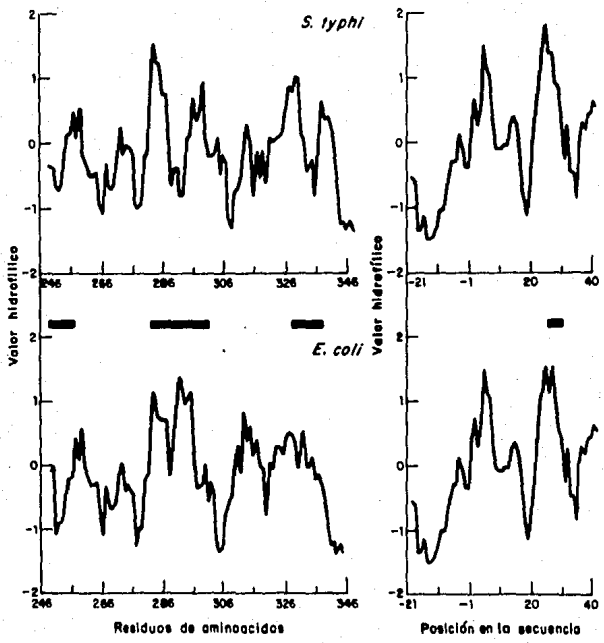


FIG.3.- Perfiles hidropáticos de los fragmentos 2 y 1 de los genes de S.typhi y E.coli.

expuesta en la superficie, pero que la configuración de la vuelta que da la proteína para formar el epítoto expuesto, sería estructuralmente diferente por los aminoácidos que han cambiado. Este resultado es acorde con uno de los postulados hechos desde el principio del proyecto, en el sentido de que aquellas regiones expuestas tienen mayor posibilidad de variar, ya que están sujetas a mayor presión del ambiente y por tanto de sufrir cambios estructurales.

La secuencia nucleotídica del fragmento 3, aunque determinada en forma parcial, también parece indicar que existen trechos con variaciones importantes con respecto a la secuencia de E.coli; sin embargo la información aún no es conclusiva.

El análisis preliminar de la secuencia nucleotídica del fragmento 4 parece sugerir que es muy disímil a la de E.coli. Sin embargo, la secuencia de esta región no está totalmente determinada. Debido a que la región regulatoria del gene está incluida en este fragmento 4 es interesante especular que las diferencias en el mecanismo de regulación, que se sugieren en el apéndice II (37), se debieran a distintas secuencias nucleotídicas regulatorias. Para explorar más estas diferencias, se realizaron experimentos de hibridación tipo Southern utilizando como detector el mismo fragmento 4 contra DNA total de S.typhi y E.coli cortados con diferentes enzimas de restricción. La Fig.4A muestra la comparación de la hibridación relajada del gene ompC de E.coli completo (28) contra DNA de ambas bacterias; con respecto a la hibridación estricta del mismo filtro, contra el fragmento 4 del gene ompC de S.typhi (Fig.4B) Como se puede observar, la hibridación relajada del gene completo de E.coli genera bandas en el DNA de las dos bacterias; mientras que las condiciones de hibridación para el fragmento 4 sólo generan señal para S.typhi,

dando el mismo patrón que en la Fig.4A. Este resultado sugiere que esta región varía considerablemente entre las dos bacterias.

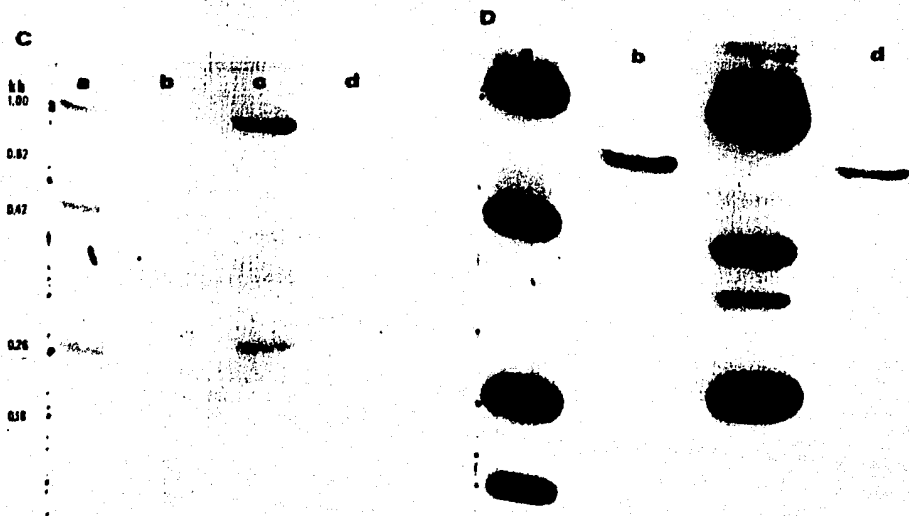
Con el fin de proseguir estos estudios se realizó un experimento similar en el que el DNA total es cortado con enzimas de restricción que reconocen palíndromos de 4 pb. Esto permite, por probabilidad, que el DNA sea cortado con más frecuencia con respecto al corte por enzimas de restricción que reconocen 6 pb. Este DNA fué hibridizado en condiciones relajadas contra el fragmento 4. La Fig.4C y D muestran como se generan patrones de restricción polimórficos y diferencias en la intensidad de hibridización evidentes entre el DNA de ambas bacterias, indicando que las similitudes entre esta región para ambos genes están restringidas a tréchos de pocos pb. Este resultado, junto con los datos preliminares de la secuencia nucleotídica de esta región, y los reportados en el apéndice II (37), sugieren fuertemente que el mecanismo de regulación en S.typhi difiere del de E.coli.

Como una segunda etapa en la deducción de la secuencia nucleotídica, han sido generadas clonas nuevas que ahora llevan fragmentos de menor tamaño que los utilizados inicialmente. Estas clonas fueron contruidas subclonando los fragmentos de restricción, del inserto del plásmido pVF27, derivados de digestiones dobles con ER que cortan más frecuentemente (MspI, RsaI, PaiI, TagI y HpaII). Lo anterior tiene el objeto de poder contar con la secuencia nucleotídica de otros fragmentos que ayuden a corroborar la obtenida hasta el momento y definir aquélla de otras regiones que tengan algunas ambigüedades. Como en su mayor parte no se cuenta con el mapa de restricción para estas enzimas, la selección de clonas de determinada región, será realizada por hibridización, utilizando como sonda



FIG.4.- A) Hibridización tipo Southern del gene ompC de E.coli, en condiciones relajadas, contra DNA total de E.coli y S.typhi cortados, respectivamente, con: EcoRI-HindIII (carriles a y f), BglII-HindIII (b y g), EcoRI (c y h) y BglII (d y i). El carril e contiene DNA del plásmido pMY111 (28) el cual porta el gene ompC de E.coli.

B) Hibridización tipo Southern de una replica del filtro anterior contra el fragmento 4 del gene ompC de S.typhi en condiciones estrictas (Ver metodología en la fig.6 del apéndice II).



C) Hibridización tipo Southern, en condiciones estrictas, del fragmento 4 del gene ompC de S.typhi, contra DNA total de S.typhi y E.coli cortados, respectivamente con: MspI (carriles a y b) y HhaI (carriles c y d). D) Igual que C pero en condiciones relajadas.

fragmentos específicos para las regiones deseadas (Fig.1).

Al ser terminada la caracterización de la secuencia del gene ompC, podrán realizarse predicciones por computación de la estructura secundaria de la proteína completa, siguiendo reglas como las de Chou y Fasman (6) para hoja beta, alfa hélice; así como vueltas o perfiles de hidrofiliidad-hidrofobicidad siguiendo las reglas de Kyte y Doolittle (19), etc., las cuales están integradas en programas de los paquetes de análisis de secuencias de la computadora VAX de este Centro.

DISCUSION Y CONCLUSION

En resumen, los resultados indican que el gene de S.typhi aislado y clonado en el plásmido pVF27 es equivalente al gene ompC descrito para E.coli (28). Esta conclusión se basa principalmente en la similitud que reflejan los experimentos de hibridización, en los cuales se basó el aislamiento del gene. Por otro lado, el tamaño de la proteína codificada por el pVF27 correlaciona con lo previamente observado para la OmpC de E.coli; así como por el hecho de que se trata de una proteína que se integra en la ME de E.coli. Además, la proteína codificada por el plásmido pVF27 comigra con una proteína principal de la ME de S.typhi que correspondería a OmpC y que se expresa en alta osmolaridad. Adicionalmente, el mapeo de restricción muestra claramente como algunas regiones están conservadas entre el gene de S.typhi y de E.coli, ya que los patrones de restricción para ciertas enzimas son equivalentes para ambas bacterias, sin dejar de considerar que también la variabilidad se refleja en otras regiones del gene, donde se pueden observar sitios de restricción diferentes.

Sin embargo, esta similitud no parece ser tan clara en el caso de la regulación de la expresión del gene, ya que se ha podido observar que OmpC de S.typhi, a diferencia de la de E.coli (29), no responde a la osmoregulación (Apéndice II, fig.5. 37). Este hecho, aunado a la sobreexpresión de la proteína clonada, apoyan la idea de que los mecanismos regulatorios pudieran ser diferentes.

En una segunda etapa del trabajo se analizó parte de la secuencia nucleotídica del gene. De este modo se pudo corroborar la información concerniente a la orientación del gene en el pVF27, así como a su localización en el inserto. Por otra parte, se apoyó la identidad del

gene, ya que la secuencia de aminoácidos del péptido señal es idéntica a la de la proteína de E.coli, y algunas de las regiones codificadoras presentan altos porcentajes de similitud entre ambos genes. Adicionalmente, ha sido posible comprobar el postulado inicial de que durante la evolución de ambas bacterias este gene ha ido cambiando; y que algunos de estos cambios pueden, a su vez, determinar modificaciones funcionales importantes que no han sido descritas, pero que deben ir acorde con los diferentes comportamientos de estas dos enterobacterias, tanto a nivel de patogenia como de desarrollo en vida libre. Por ejemplo, podemos considerar la información preliminar sobre la regulación del gene o la presencia de regiones variables correspondientes a vueltas expuestas de la proteína.

Este y otros aspectos sobre la importancia funcional de las diferencias encontradas, así como de la utilidad de la clonación y caracterización del gene ompC de S.typhi, son discutidas más adelante.

I.- IMPORTANCIA DE LA PRESENCIA CONSTITUTIVA DE OmpC

OmpC se encuentra constitutivamente en varias cepas de S.typhi obtenidas de diferentes fuentes, crecidas en diferentes condiciones, como son: temperaturas entre 5 y 42 C; alta y baja osmolaridad, o sea, medio al que se le ha añadido sacarosa del 0 al 20% o NaCl de 0 a 300mM; limitación de hierro, etc. Esto sugiere indirectamente que la proteína puede estar jugando un papel relevante en la viabilidad de la bacteria en diferentes medios ambientes. Quizá pudiera ser importante en los mecanismos de patogenia (como adhesividad, invasividad, resistencia a fagocitosis, etc.) o de sobrevivencia de la bacteria en el huésped.

Nikaido y Vaara (30) han propuesto que el cambio en la expresión genética mediado por la osmolaridad del medio, sobre la relación OmpF/OmpC, es una parte de la adaptación de E.coli y S.typhimurium para crecer ya sea en un huésped o en estado de vida libre. La osmolaridad del suero sanguíneo, es mayor comparada con la del ambiente acuoso que estos organismos pueden encontrar en vida libre. Así, una mayor relación OmpF/OmpC sería característica de bacterias de vida libre; mientras que una pequeña correspondería a bacterias que están infectando un organismo. Además, las relativas bajas temperaturas, típicas de vida libre, también pueden generar una mayor relación; a diferencia de lo que puede suceder en el huésped donde las temperaturas van de 37 C en adelante.

Otra propuesta (30) señala que las bacterias pueden encontrar bajas concentraciones de sustratos en vida libre, por lo que la difusión a través de la ME puede representar un paso limitante en la tasa de incorporación de sustratos. Esta difusión es también proporcional al área seccional de paso a través de la cual ocurre la difusión. De este modo, el que OmpF forme un poro de difusión de mayor tamaño, sería de gran ventaja fisiológica para bacterias de vida libre. Se propone que el menor tamaño de poro formado por OmpC ofrecería una ventaja selectiva para bacterias que crecen en fluidos del huésped, ya que podría excluir la incorporación de compuestos inhibitorios (letales) presentes en el organismo que parasitan.

Cabe mencionar que, si bien la anterior propuesta está relacionada a los conocimientos existentes sobre E.coli y S.typhimurium, y no incluye nuestras observaciones para S.typhi, ahora pudiera hacerse más clara para el caso de esta última. Esto es, S.typhi es un organismo que pudiera estar mejor adaptado a

desarrollarse en el huésped (en este caso el hombre), que en vida libre. Por lo tanto, el hecho de que OmpC se exprese constitutivamente en diferentes cepas de S.typhi y de que OmpF responda aparentemente al mismo mecanismo de regulación que en E.coli y S.typhimurium (apéndice II, 37 y datos del grupo no publicados), aunado al dato de que existen cepas virulentas de S.typhi que carecen de OmpF, habla de la posible importancia fisiológica que representa la presencia de OmpC en cualquier circunstancia, especialmente durante la infección. Por otro lado, durante el desarrollo de una infección sistémica por S.typhi, ésta debe enfrentarse a diversos cambios de las condiciones del entorno (e.g. osmolaridad). Así, la presencia constante de una proteína como OmpC que le pudiera permitir incorporar sustratos, que en la mayoría de los casos pueden encontrarse en abundancia, y, a su vez, excluir otras moléculas que le pudieran resultar perjudiciales (ser selectiva), le sería de gran ventaja fisiológica. Es importante mencionar que S.typhi tiene una alta especificidad por su huésped; de este modo queda abierta la cuestión sobre el papel que pudieran tener algunas proteínas de la ME, como OmpC, en esta especificidad.

II.- IMPORTANCIA EN LA EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.

Ya se ha mencionado anteriormente (Apéndice I, sección de introducción. 3), que uno de los aspectos importantes en donde puede incidir la biología molecular en la caracterización de genes específicos de organismos patógenos, es en el desarrollo de la epidemiología molecular. Se ha sugerido que los patrones epidemiológicos de infecciones entéricas varían de país a país y de

región a región dentro de un país. Por esto, es importante el diseño de metodologías capaces de identificar factores, desde locales hasta regionales, que influyan en el patrón epidemiológico de infecciones entéricas.

Uno de los desarrollos más interesantes es el del estudio de "huellas digitales" moleculares, (molecular fingerprinting). Esta metodología se basa en la utilización de tres procedimientos para determinar si diferentes cepas de una misma especie son idénticas (por ejemplo, clonas), o bien representan organismos diferentes genotípicamente. Los dos procedimientos usados inicialmente son: el estudio de patrones plasmídicos por electroforesis, el cual ha probado ser un sistema rápido, económico y de tipificación epidemiológica reproducible para algunos patógenos bacterianos; y el análisis electroforético de los fragmentos de restricción de DNA bacteriano, BRENDA (Bacterial restriction-endonuclease DNA analysis), el cual ha generado información adicional y especificidad a los resultados. Sin embargo, estos procedimientos están limitados, a la presencia de plásmidos y de patrones de restricción claramente discernibles (para revisión ver 8,44). Actualmente, estos procedimientos se han visto grandemente fortalecidos con la utilización de técnicas de hibridación, por ejemplo la tipo Southern. De este modo, dos o más cepas de la misma especie son consideradas clonas si, usando como detectores genes u oligonucleótidos sintéticos marcados, el patrón de bandas hibridadas de cada cepa es el mismo. En conjunción estos tres procedimientos representan la técnica de huellas digitales moleculares y pueden ayudar a determinar: a) si la mayoría de los episodios infecciosos en una comunidad se deben a una cepa clonal en particular, indicando un reservorio y sistema de transmisión común; o si se deben

a diferentes cepas, indicando reservorios y/o sistemas de transmisión múltiples; b) si los episodios de infecciones recurrentes por la misma especie en un individuo en particular, se deben a la misma cepa (indicando una recaída o la falta de inmunidad adquirida), o son debidos a diferentes cepas patogénicas (indicando la adquisición de nuevas cepas). Además, estas técnicas pueden ser usadas para distinguir cepas virulentas de cepas no virulentas de la misma especie y para identificar factores que seleccionan o favorecen la persistencia en una comunidad de una cepa patogénica.

Esta estrategia también ha sido denominada análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR; término originalmente acuñado para el estudio de enfermedades genéticas; 45) y se basa en la presencia de polimorfismos genéticos, los cuales reflejan la ausencia o presencia de sitios de corte específicos para enzimas de restricción, los cuales pueden ayudar a clasificar diferentes cepas de acuerdo a su origen geográfico o a los síntomas clínicos que inducen. De este modo, es posible que un patrón de bandas de hibridación particular pueda servir de huella digital para una cepa específica.

En el presente trabajo se ha caracterizado parcialmente un gene particular de S.typhi. En experimentos preliminares (datos no mostrados), es posible observar que la hibridación del gene completo contra DNA de diferentes cepas, cortado con enzimas de restricción que reconocen secuencias de 6 pb, pueden generar en algunos casos y para algunas enzimas, patrones polimórficos (observación realizada también para otro gene, datos no mostrados).

Por otra parte, el análisis de la secuencia nucleotídica (sección de resultados; fig. 2) y experimentos de hibridización con regiones específicas del gene ompC (sección de resultados; fig. 4), señalan que interespecificamente (al menos con E.coli, especie estrechamente relacionada) parece existir suficiente heterogeneidad como para plantear la posibilidad de iniciar estudios con este gene como un posible marcador genético. Conjuntamente, cabe la posibilidad de encontrar con este mismo planteamiento heterogeneidad intraespecie que, a diferencia de lo que se espera para una posible sonda universal de diagnóstico, puede permitir la diferenciación y clasificación de cepas según el cuadro clínico producido, el origen geográfico, la epidemia producida, etc.

Basados en la secuencia nucleotídica pueden diseñarse diferentes oligonucleótidos, los cuales pueden ser probados para determinar su homología en diferentes cepas de S.typhi y si pueden generar patrones de hibridización heterogéneos con otras salmonellas (por ejemplo, S.typhimurium, S.Dublin, S.enteritidis, etc.) o funcionar específicamente para S.typhi (punto discutido más ampliamente en su uso para diagnóstico, en el punto IV de la sección de discusión). Cabe mencionar que alguno de estos oligonucleótidos diseñado a partir de la secuencia nucleotídica del gene aislado de nuestra cepa tipo, puede tal vez presentar hibridización diferencial con cepas productoras de cuadros clínicos distintos al de la cepa de referencia. De este modo, podría ser utilizada para estudios epidemiológicos en la clasificación de cepas según esta característica.

La utilidad de estas metodologías ha sido documentada. Por ejemplo, se ha reportado que la utilización de sondas específicas para las enterotoxinas LT y ST de E.coli ha hecho posible discernir la

presencia de estos genes entre diferentes colonias bacterianas. Este resultado permite realizar ensayos en los que se determine la presencia de cepas patógenas, epidémicas o pandémicas (7). Es claro, por ejemplo para E.coli, que los detectores para toxinas han sido invaluable en la clasificación de cepas patógenas, presentes en las heces de la mayoría de las personas enfermas y sanas. Antes del advenimiento de las sondas de DNA, los ensayos requerían producción de toxina in vitro y su detección por ELISA, cultivo de tejidos (CHO, Vero, Etc.) o estudios en modelos animales (Asas ileales de conejo o rata, etc).

Su utilidad es clara ya que, como ya se mencionó, algunas veces son necesarias pruebas adicionales para realizar posteriores subtipificaciones de organismos, particularmente cuando una epidemia es causada por un organismo con características fenotípicas que se presentan comúnmente.

Así también estas sondas pueden ser utilizadas en vigilancia epidemiológica y en investigaciones de epidemias específicas, así como en estudios de campo.

Otros reportes apoyan el uso de sondas para cuantificar la frecuencia relativa de una determinada bacteria patógena, como la E.coli enterohemorrágica (EHEC), como una causa de diarrea, ya sea en niños o adultos de países en vías de desarrollo o industrializados (22).

A este respecto, los oligonucleótidos específicos para S.typhi pudieran ser de gran importancia en la ejecución de amplios programas epidemiológicos que pretendan generar información acerca de la distribución de la bacteria en: grupos de edades de los huéspedes,

diferentes áreas geográficas, etc; así, como para determinar su incidencia, porcentaje de acarreadores en la población, prevalencia, etc. En términos generales todo esto pudiera permitir mantener eficientes programas de vigilancia epidemiológica, con el diseño de marcadores específicos de bacterias enteropatógenas.

Es interesante el hecho de que la región aledaña al extremo 5' del gene estructural ompC (región regulatoria), presente patrones polimórficos con respecto a E.coli (fig. 4, sección de resultados). Existen reportes en los que se observa, en experimentos de hibridación tipo Southern usando como sondas genes clonados o secuencias aledañas, heterogeneidad de los fragmentos de restricción en la región hacia arriba del gene estructural de la exotoxina de Pseudomonas aeruginosa (42). Más aún, esta región ha sido utilizada para distinguir aislados clínicos en experimentos de hibridación; además de que se ha demostrado su estabilidad como marcador epidemiológico (31).

En resumen, la técnica de huellas digitales moleculares para cepas de diferentes bacterias patógenas, utilizando las técnicas de hibridación de DNA genómico (el cual ha sido digerido con enzimas de restricción, separado por electroforesis y fijado a un filtro) contra secuencias de DNA clonadas, ya sea por algún interés en particular (por ejemplo 37) o al azar (41), parece ser un método útil que puede ser aplicado en epidemiología para, por ejemplo, tipificar cepas no tipificables por otros métodos.

Es deseable que un marcador epidemiológico posea las siguientes características: debe ser lo suficientemente sensible para distinguir cepas no relacionadas; debe identificar específicamente todas las cepas relacionadas; y necesita ser lo suficientemente estable de tal

modo que la identificación de cepas no varíe bajo las condiciones usuales de laboratorio o durante una infección.

En términos generales, los usos prácticos en los que puede ser aplicada esta metodología serían los siguientes:

-El procesamiento de gran cantidad de especímenes simultáneamente y en gran escala, para estudios epidemiológicos.

-La detección directa de factores importantes codificados genéticamente, en aislados o especímenes. Por ejemplo, enterotoxinas, genes de resistencia a antibióticos, factores de colonización u otros.

-El diagnóstico clínico de rutina (punto que es discutido en el inciso IV).

Por último, no se puede pasar por alto que tanto a nivel epidemiológico como de diagnóstico (ver más adelante), uno de los aspectos más relevantes de la caracterización de regiones variables que estén expuestas en la superficie, es la generación de anticuerpos monoclonales que reconozcan epítopes específicos para la proteína OmpC de S.typhi, los cuales pueden ser utilizados para la identificación o tipificación de esta bacteria. La especificidad que puede obtenerse con un anticuerpo monoclonal ha sido observada en un estudio realizado para la PME PhoE de E.coli (43).

III.- IMPLICACIONES DEL GRADO DE CONSERVACION ENTRE LOS GENES.

Se ha señalado (ver resultados), que la comparación de la secuencia nucleotídica del gene ompC de S.typhi y E.coli refleja la distribución intercalada de regiones conservadas y variables, y de que las regiones variables muy probablemente codifican para aminoácidos que conforman epítopes expuestos.

Como se mencionó en la sección de resultados, ompC de E.coli y S.typhi presentan altos valores de similitud tanto a nivel de secuencia de nucleótidos como de secuencia de aminoácidos. Sin embargo, a lo largo de sus secuencias es posible encontrar regiones altamente variables que parecen, en su mayoría, corresponder a regiones que pudieran favorecer la formación de vueltas expuestas. Esta suposición se basa en la comparación de modelos que predicen la estructura secundaria de las proteínas; para las PME de E.coli existen antecedentes a este respecto (13,33). De este modo esperamos similitud en estructura y patrones de plegamiento, basados en la homología encontrada y en la observación de que la proteína recombinante es incorporada en la ME de E.coli (Apéndice II, fig.5. 37). En un estudio comparativo realizado con la secuencia de la proteína OmpA de 4 enterobacterias, se ha podido observar heterogeneidad en las regiones formadoras de vueltas expuestas (12).

Hasta el momento, la proteína OmpC no ha sido descrita en otra bacteria gram-negativa más que en E.coli, donde funcionalmente ha sido más o menos caracterizada. Además de permitir el paso de moléculas hidrofílicas y de servir como receptor para fagos y colicinas, no ha sido establecida ninguna otra función, salvo la sugerencia de que puede mediar la exclusión de algunos antibióticos.

Por lo anterior resulta difícil proponer algún papel fisiológico adicional a esta proteína en S.typhi, basados únicamente en su similitud con E.coli.

Sin embargo, no se puede dejar de considerar que las diferencias encontradas a nivel de las posibles regiones expuestas, pueden tener relevancia funcional en aspectos más complejos de la interacción

huésped-parásito. Especulando, es posible pensar que las características de los epitopes heterólogos, no solo le den la posibilidad de servir como receptor para diferentes fagos o biomoléculas, sino además conferirle la capacidad de adherirse a receptores específicos de células del huésped, para de este modo poder colonizar, invadir y establecerse dentro del organismo, haciéndose resistente a factores de este último como la fagocitosis, la acción del suero u otros agentes antibacterianos (9). S.typhi, a diferencia de E.coli es un organismo invasivo; además, OmpC se sintetiza en S.typhi en diversas condiciones (ver inciso I), contrario a lo que sucede en E.coli, lo cual sugiere que es importante para el crecimiento de la bacteria en diferentes nichos ecológicos. Es importante señalar, que es de mucho interés contar con cepas mutantes de S.typhi para esta proteína, las cuales permitan analizar el efecto de la falta de OmpC en diferentes condiciones.

En resumen, no podemos descartar las posibles implicaciones de cambios estructurales específicos en un antígeno de superficie de una especie bacteriana a otra; en especial, si estos cambios se dan en regiones que están directamente en contacto con el medio y que estructuralmente se conforman de manera muy distinta, aunque por comparación demuestren tener sustituciones de aminoácidos equivalentes en cuanto a características como la hidrofobicidad o su capacidad de inducir vueltas.

Numerosos reportes describen la caracterización de PME formadoras de poros en diferentes bacterias patógenas para el hombre; en estos, casi como regla general, se sugiere la participación de estas proteínas en mecanismos de virulencia o inmunidad. Del mismo modo, en ninguno de los casos este papel ha sido finamente descrito. Sin

embargo, se han implicado en mecanismos de resistencia a antibióticos, colonización, adhesividad, invasividad, etc. (1,4,15,34) o de inmunidad (25, 3 para revisión).

En algunos casos las secuencias de estas proteínas, que no incluyen otras OmpC, han sido comparadas con las de las porinas de E.coli, y se ha encontrado algo de similitud con OmpC para algunas de ellas. Las semejanzas parecen estar asociadas a regiones hidrofóbicas, lo que es de esperarse para proteínas que se integran en la membrana de forma similar. En contraste, las regiones variables, si se encuentran expuestas, pueden estar determinando los diferentes mecanismos de acción o inclusive conferir la especificidad hacia el huésped.

Es importante señalar que lo que aquí se ha comentado no establece que la proteína OmpC sea un factor multifuncional en la patogenia, ya que deben de participar más de un elemento de la superficie bacteriana. De cualquier modo, profundizar en el estudio de uno de estos elementos puede aportar las bases para el entendimiento de alguno de los eventos hasta ahora poco documentados.

La correlación entre la proteína OmpC de S.typhi con respecto a otras proteínas de ME que hayan sido asociadas a algún proceso de virulencia podrá ser establecida al comparar la secuencia de aminoácidos completa con las secuencias de estas proteínas membranales.

IV.- DIAGNOSTICO POR HIBRIDIZACION CON DNA.

El objetivo principal del diagnóstico de enfermedades infecciosas con sondas de DNA, es la detección e identificación de un organismo

patógeno directamente en una muestra clínica. Esto debe realizarse de manera rápida y específica, para que incida directamente en el cuidado y tratamiento del paciente.

Así, los resultados obtenidos hasta el momento abren la posibilidad de utilizar alguna de las secuencias descritas (ver resultados), como sonda para el diagnóstico acertado y eficiente de la FT, que en la actualidad es lento e inespecífico (apéndice I, sección Diagnóstico, 3).

Los estudios que se han iniciado en nuestro laboratorio están dirigidos a determinar cuál es la distribución intraespecie de las secuencias variables encontradas en este trabajo; si esta variabilidad es homogénea y cuál es la especificidad, esto es, que tanto se conserva entre otras bacterias.

De ser identificadas secuencias específicas para S. typhi, tendrán que evaluarse los sistemas en los que puedan ser aplicadas para el diagnóstico clínico de la enfermedad. Asimismo, los resultados deben ser rápidos y específicos, y su aplicación eficiente a gran escala.

Como ya se ha mencionado, existen una gran cantidad de situaciones clínicas y experimentales en las cuales es deseable detectar pequeñas cantidades de un biopolímero específico, el cual está combinado con una gran cantidad de material no relacionado, por ejemplo, un gene unicopia en DNA genómico. La especificidad apropiada de algún ensayo usualmente depende del uso de un biopolímero que se combine con el blanco con gran afinidad y que tenga una baja afinidad por todos los demás componentes de la muestra. Tal es el caso de un oligonucleótido complementario a una secuencia de DNA o un anticuerpo que se une a una proteína.

La sensibilidad de un ensayo adecuado se logra acoplado al detector una molécula que genere una señal fácilmente detectable (reportera). Las más comunmente usadas son las moléculas orgánicas fluorescentes y los grupos fosfatos marcados radioactivamente. Estos últimos cuentan con diversas desventajas, como su inestabilidad (vida media muy corta), el riesgo inherente a su manejo y la problemática en la disposición de sus desechos. Actualmente, la sensibilidad de los ensayos no-radioactivos ha sido mejorada mediante la incorporación de diferentes moléculas reporteras a los probadores (revisados en 14,16,18,26). La más popular de estas moléculas reporteras es la Biotina (20). En este último caso, después de que los detectores reconocen a sus blancos, se les une una enzima como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano (21), mediante un acoplador de avidina o estreptavidina (molécula que se pega fuertemente a biotina). De este modo, es posible acumular un buen número de moléculas del producto de la reacción enzimática por cada complejo formado entre el detector biotinilado y la enzima, al agregar el sustrato cromogenico apropiado. Así, es posible obtener mayor sensibilidad que en el caso de moléculas generadoras de señales que están acopladas directamente al detector. A este principio se le puede añadir un segundo paso de amplificación enzimática.

Sin embargo, cabe destacar que las técnicas de hibridización actuales (numeradas anteriormente), no han desarrollado la sensibilidad y velocidad requeridas para su uso en el campo del diagnóstico, ya que los límites de detección de los bioensayos que utilizan esquemas de amplificación lineal, es del orden de 10×10^6 moléculas de blanco (27).

Con el propósito de superar esta limitación, se están

desarrollando novedosos sistemas de detección de ácidos nucleicos, que tienen el potencial de incrementar los límites de sensibilidad en los ensayos de hibridación por varios órdenes de magnitud; esto es, sistemas que se basan en mecanismos de amplificación exponencial.

Uno de estos sistemas consiste en la construcción de sondas formadas por RNAs de cadena sencilla (24). Estas moléculas son bifuncionales, ya que son capaces de hibridizar con su secuencia blanco y a su vez pueden ser replicadas por la replicasa del fago QB (RNA polimerasa dirigida a RNA). Teóricamente, el uso de esta enzima y de las sondas formadas por RNA permitirá la detección de una sola molécula del blanco. Esto hará posible la detección de secuencias presentes en bajo número de copias por célula, de secuencias presentes en una pequeña proporción de células de una población heterogénea, y de secuencias diluidas en una muestra biológica. En términos generales, el sistema consiste en la unión del detector a su blanco, la eliminación de los detectores no unidos y la síntesis por la QB replicasa de gran cantidad de copias del RNA recombinante, lo cual señala a los detectores unidos a un blanco.

Estos RNAs recombinantes combinan, en una sola molécula, las funciones de detector y de reportero. Así, el RNA que es amplificable contiene una secuencia única que identifica su blanco de manera específica. Con este sistema debe ser posible diseñar ensayos de diagnóstico que utilicen una mezcla de RNAs recombinantes, cada uno conteniendo una secuencia detectora que es específica para el genoma de diferentes agentes infecciosos. Después de la amplificación con la QB replicasa, la población de RNA contendría replicas sólo de aquellos detectores que se hubieran unido a sus blancos. La subsecuente

hibridización de estos RNAs amplificados, a una membrana que contenga un arreglo de muestras de DNAs complementarios a cada detector original, permitirá la identificación simultánea de cada organismo que estuviera presente en la muestra. Así, los bioensayos que emplearan la amplificación de detectores de RNA recombinante serían versátiles, rápidos, sensibles y con un rango de acción muy amplio.

Otro de los métodos importantes que se han desarrollado, basándose en la amplificación exponencial enzimática, es el denominado "reacción en cadena de la polimerasa" (del inglés "Polymerase Chain Reaction"). Este sistema produce un enriquecimiento selectivo de una secuencia de DNA específica por un factor aproximado de 10×10^6 (38). La técnica requiere de dos oligonucleótidos sintéticos que funcionen como primeros y que flanqueen la secuencia blanco (la cual será amplificada durante el curso de la reacción). La reacción procede con ciclos repetidos de desnaturalización del DNA por calor, del apareamiento de los primeros a su secuencia complementaria, y de la extensión de los primeros apareados con DNA polimerasa (39).

Debido a que los primeros hibridizan con cada una de las cadenas de la secuencia que va a ser amplificada, la reacción de la polimerasa procede entre ellos, de tal modo que cada ciclo duplica la secuencia blanco. Cuando la amplificación es apropiada (aprox. 10×10^6) el DNA blanco es detectado con un oligonucleótido marcado enzimáticamente, que es complementario a la secuencia amplificada.

La reacción se lleva a cabo a tres temperaturas: 94 C para desnaturalizar el DNA, alrededor de 55 C para el apareamiento y 72 C para la polimerización, utilizando la polimerasa termoestable de Thermus aquaticus (DNA polimerasa Taq). De este modo el método puede ser fácilmente sistematizado (32).

Adicionalmente, este sistema provee las ventajas del uso de oligonucleótidos sintéticos, los cuales pueden ser diseñados con base en la secuencia nucleotídica del gene que se está caracterizando. Estos son pequeños (de 15 a 20 bases) y de cadena sencilla, lo que evita que hibridicen consigo mismos, como en el caso de los detectores de doble cadena, lo que representa problemas de competencia que disminuyen la eficiencia del sistema. Otras ventajas son: el estar libres de vector y una hibridización más rápida.

Una de las principales limitantes que este tipo de sistemas de amplificación pueden ayudar a superar, utilizando por ejemplo secuencias especie-específicas del gene ompC de S.typhi, es la cantidad de muestra que puede estar contenida en un mililitro de sangre de un paciente con FT (aprox. 20 células) o lo enmascarado de ésta en heces fecales.

V.- UTILIZACION DE LA PROTEINA COMO PRESENTADORA DE EPITOPES HETEROLOGOS.

Hasta ahora, los resultados obtenidos parecen indicar que la expresión de la proteína OmpC en S.typhi es constitutiva, esto es, que está regulada de forma distinta a la reportada para E.coli (29). Sabemos que la proteína es sintetizada en S.typhi todas las condiciones de crecimiento probadas hasta el momento; que en E.coli es abundantemente producida e incorporada en la ME cuando la bacteria porta el plásmido recombinante pVF27/ompC (37); y que la secuencia nucleotídica de la región regulatoria es probablemente diferente a la del gene de E.coli (ver resultados). Aunado a esto, la comparación de la secuencia nucleotídica y la predicción de epitopes expuestos a

través del análisis de perfiles de hidrofiliicidad y hidrofobicidad, abre posibilidades en el uso de la proteína como acarreador de epitopes heterólogos.

Lo anterior, como ya se mencionó, está basado en el hecho de que OmpC en S.typhi está presente tanto en alta como en baja osmolaridad. Además, su expresión en E.coli es muy elevada (aún considerando que está clonado en un plásmido de alto numero de copias) (anexo II, fig.5. 37). Por otra parte, la información preliminar sobre la secuencia nucleotídica de la región regulatoria y experimentos de hibridización, parecen señalar que existen diferencias importantes a este nivel, lo que pudiera estar determinando mecanismos de regulación distintos.

Así, es factible que OmpC pueda ser manipulada mediante técnicas de ingeniería genética, de tal manera que funcione como acarreadora de epitopes heterólogos. De este modo, regiones expuestas de la proteína pueden ser sustituidas por péptidos inmunogénicos provenientes de proteínas de otros microorganismos de importancia médica. Estos péptidos deben mantener la estructura de vuelta, de tal forma que puedan ser expuestos correctamente y generen una respuesta inmune protectora.

El estudio de la secuencia nucleotídica permitirá elegir algunas regiones que tengan la probabilidad de estar expuestas en la superficie y que sean fácilmente manipuladas. Esto se podría lograr deletándolas, para posteriormente sustituirlas por secuencias heterólogas, sin que la estructura general de la proteína se vea comprometida; o bien insertando estas regiones heterólogas manteniendo la conformación que le da la posibilidad de exponerlo al medio. También es necesario que la conformación de la proteína acarreadora,

conteniendo el epítoto insertado, sea la adecuada para su función como inmunógeno.

A este respecto se pueden mencionar dos de los avances más importantes. Uno ha sido desarrollado por el grupo de M. Hofnung (5), el cual utiliza la proteína de membrana externa de E. coli LamB como acarreadora para exponer epítotos foráneos en la superficie de esta enterobacteria. En un caso han insertado el epítoto C3 de poliovirus en dos vueltas externas. El péptido es expresado en la superficie y es accesible a anticuerpos anti-C3. Se ha observado que esta proteína híbrida resulta ser estable y mantiene la mayoría de las funciones biológicas de LamB. Las cepas portadoras de esta construcción, pueden ser utilizadas directamente como inmunógenos en conejos y ratones; en donde la secuencia expuesta fue inmunogénica y los anticuerpos generados por ella reaccionan con la partícula viral completa.

Otro interesante diseño es el basado en el gene para la flagelina de S. typhimurium, el cual ha sido clonado en un derivado de pBR322. En este sistema, oligonucleótidos de alrededor de 45 pares de bases, que codifiquen para un epítoto inmunogénico de otro microorganismo, pueden ser insertados en un sitio de restricción único para EcoRV, el cual se derivó de una deleción de 45 pares de bases que no interrumpe la fase de lectura y no produce pérdida de la función flagelar. Los plásmidos derivados de esta forma son transferidos a una cepa atenuada de S. typhimurium, la cual sirve como acarreadora de los antígenos. Un ejemplo de su utilización es la introducción del epítoto CTP3 de la toxina del cólera, el cual es correctamente expresado y permite la inhibición y aglutinación de la cepa acarreadora de la proteína híbrida por anticuerpos mono y policlonales (Stocker, B.A.D.,

comunicación personal).

La inserción de epitopes heterólogos en OmpC puede proveer el vehículo para generar inmunidad contra otras enfermedades. Además puede en si representar un antígeno importante para producir inmunidad contra S.typhi. Lo anterior pudiera ser logrado introduciendo la proteína híbrida en una cepa inofensiva de E.coli, o idealmente en una cepa atenuada de S.typhi, la que al igual que E.coli sobreexpresa la proteína. De este modo, se pudieran exponer tanto epitopes propios como heterólogos, para así constituir vacunas bivalentes y, por que no, polivalentes.

De cualquier modo, los diseños e implantación de tales sistemas deberán cubrir requerimientos mínimos como son: que la respuesta inmune desarrollada (celular o humoral) hacia el antígeno pasajero o heterólogo genere protección en contra del organismo en cuestión; que las cepas portadoras de estos vectores posean la suficiente estabilidad para evitar la pérdida del plásmido, tanto in vivo como in vitro; y que se pueda demostrar la permanencia de dichas cepas en órganos como el bazo y el hígado.

Actualmente se están haciendo esfuerzos dirigidos a la obtención de cepas atenuadas de S.typhi (23), las cuales serían de gran utilidad como portadoras de este tipo de construcciones, tanto para la presentación de otros epitopes como para la exposición de epitopes propios en mayor número.

Además de estos acercamientos, otra estrategia es la utilización de cepas productoras de minicélulas como portadoras de antígenos. Uno de los resultados obtenidos durante el presente trabajo (apéndice II, fig.5. 37), indica que este tipo de cepas pueden sobreexpresar a la

proteína a partir del plásmido recombinante y que éstas la incorporan en la membrana externa al parecer correctamente. De ser esto así, la membrana externa de dichas células contendría en su mayoría la proteína producida a partir del plásmido.

La utilización de este tipo de células puede ayudar a fortalecer y concentrar la respuesta inmune hacia un antígeno específico. Del mismo modo, este modelo puede aplicarse con células que porten plásmidos que contengan el gene para proteínas híbridas que porten la secuencia de un epítoto heterólogo.

Puede resultar muy aventurado y presuntuoso considerar que los resultados obtenidos hasta este momento, junto con los antecedentes de la literatura, estén indicando que los genes clonados en nuestro laboratorio (en especial ompC por sus características), vayan a cubrir efectivamente todos los aspectos anteriormente mencionados.

Sin embargo, es importante que se invierta el esfuerzo necesario para evaluar la utilidad de nuestros resultados en cualquiera de estos campos o en otros.

Hasta aquí, sólo se ha tratado de dar un panorama general de algunas de las aplicaciones que pudieran dársele a los elementos con los que ahora contamos. Los trabajos se están iniciando y habrá mucho más por hacer, de cualquier modo algo se ha aportado con estos estudios al conocimiento básico en biología molecular de S. typhi, un organismo sobre el cual no se conoce mucho, en especial sobre sus factores de virulencia.

La aportación que pueda hacer la utilización de la proteína OmpC en la producción de una vacuna contra la FT es por el momento poco predecible. No se debe ignorar que los procesos de inmunidad hacia un microorganismo deben ser multifactoriales. Sin embargo, se cuenta ya

con uno de los posibles factores, que puede tener mucha o poca importancia a este nivel.

En conclusión, las perspectivas del trabajo iniciado en este proyecto de tesis son:

-Examinar la distribución del gene entre diferentes aislados clínicos.

-Utilizar los genes clonados en la clasificación de cepas por medio de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción; evaluándolos como marcadores genéticos para estudios epidemiológicos a gran escala.

-Determinar si cepas de S.typhi expresan proteínas OmpC heterólogas; esto es, analizar si la proteína ha variado estructuralmente intraespecie, mediante el uso de oligonucleótidos que puedan detectar disparidades en regiones con mayor probabilidad de variación, o con la generación de mapas proteolíticos y el análisis de estos por electroforesis uni y bidimensional.

-Desarrollar anticuerpos monoclonales dirigidos contra OmpC o detectores de DNA como reactivos de diagnóstico.

-Evaluar los productos de los genes o parte de ellos como vacunas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ARMSTRONG, S.K., PARR, Jr. T.R., PARKER, C.D. y HANCOCK, R.E.W. (1986). *Bordetella pertussis* major outer membrane porin protein forms small, anion-selective channels in lipid bilayer membranes. J. BACTERIOL. 166:212-216.
- 2.- CALVA, E., DE LA VEGA, H., FERNANDEZ, M., FLORES, V., FUCHS, Y., HERNANDEZ, A., PUENTE, J.L. y VAZQUEZ, M. (1987). Molecular cloning of *Salmonella typhi* outer membrane protein and enterotoxin genes. CENTENARY SYMPOSIUM MOLECULAR BIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES. INSTITUT PASTEUR, Abstract no. B7.
- 3.- CALVA, E., PUENTE, J.L. y CALVA, J.J. (1988). Research opportunities in Typhoid Fever: Epidemiology and Molecular Biology. BIOESSAYS. En prensa.
- 4.- CARBONETTI, N.H. y SPARLING, P.F. (1987). Molecular cloning and characterization of the structural gene for protein I, the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 84:9084-9088.
- 5.- CHARBIOT, A., BOULAIN, J.C., RYTER, A. y HOFNUNG, M. (1986). Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. EMBO J. 5:3029-3037.
- 6.- CHOU, P.Y. y FASMAN, G.D. (1978). Empirical prediction of protein conformation. ANN. REV. BIOCHEM. 47:251-276.
- 7.- ECHEVERRIA, P., TAYLOR, D.N., SERIWATANA, J., CHATKAEOMORAKOT, A., KHUNGVALERT, V., SAKULDAIPEARA, T. y SMITH, R.D. (1986). A comparative study of enterotoxin gene probes and tests for toxin production to detect enterotoxigenic *E. coli*. J. INFECT. DIS. 153:255-260.
- 8.- EISENSTEIN, B.I. y ENGLEBERG, C. (1986). Applied molecular genetics: new tools for microbiologists and clinicians. J. INFECT. DIS. 153:416-430.
- 9.- FALKOW, S., SMALL, P., ISBERG, R., HAYES, S.F. y CORWIN, D. (1987). A molecular strategy for the study of bacterial invasion. R. INFECT. DIS. 9:S450-S455.
- 10.- FERNANDEZ, M., SIERRA, J., LOPEZ-VIDAL, Y., VAZQUEZ, M., RUIZ-PALACIOS, G. y CALVA, E. (1988). MOLECULAR MICROBIOLOGY. En prensa.
- 11.- FLORES, V. (1988). Aislamiento del gene para la proteina de membrana externa OmpC de *Salmonella typhi*. Fac. de Ciencias. Tesis de Licenciatura.
- 12.- FREUDL, R. y COLE, S.T. (1983). Cloning and molecular characterization of the *ompA* gene from *Salmonella typhimurium*. EUR. J. BIOCHEM. 134:497-502.

- 13.- FREUDL, R., MacINTYRE, S., DEGEN, M. y HENNING, U. (1986). Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. J. MOL. BIOL. 188:491-494.
- 14.- GOLDFARB, P. (1986). Applications of recombinant DNA technology to diagnostics. J. CHEM. TECH. BIOTECHNOL. 36:389-394.
- 15.- GOTSCHLICH, E.C., SEIFF, M.E., BLAKE, M.S. y KOOMEY, M. (1987). Porin protein of *Neisseria gonorrhoeae*: Cloning and gene structure. PROC. NATL. ACAD. SCI. 84:8135-8139.
- 16.- GUILLAM, I.C. (1987). Non-radioactive probes for specific DNA sequences. TIBTECH. 5:332-334.
- 17.- HOPP, T.P. y WOODS, K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 78:3824-3828.
- 18.- KINGSBURY, D.T. (1987). DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious diseases. TIBTECH. 5:105-111.
- 19.- KYTE, J. y DOOLITTLE, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. MOL. BIOL. 157:105-132.
- 20.- LANGER, F.R., WALDROP, A.A. y WARD, D.C. (1981). Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 78:6633-6637.
- 21.- LEARY, J.J., BRIGATI, D.J. y WARD, D.C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labelled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 80:4045-4049.
- 22.- LEVINE, M.M., XU, J-g., KAPER, J.B., LIOR, H., PRADO, V., TALL, B., NATARO, J., KARCH, H. y WACHSMUTH, K. (1987). A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. J. INFECT. DIS. 156:175-182.
- 23.- LEVINE, M.M., HERRINGTON, D., MURPHY, J.R., MORRIS, J.G., LOSONSKY, G., TALL, B., LINDBERG, A.A., SVENSON, S., BAQAR, S., EDWARDS, M.F. y STOCKER, B.A.D. (1987). Safety, infectivity, immunogenicity, and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 5411y and 5431y, as live oral vaccines in humans. J. CLIN. INVEST. 79:888-902.
- 24.- LIZARDI, P.M., GUERRA, C.E., LOMELI, H., TUSSIE-LUNA, I. y KRAMER, F.R. (1988). Billion-fold amplification of recombinant RNA hybridization probes. NUCLEIC. ACIDS RES. En prensa.
- 25.- MATHEWS-GREER, J.M. y GILLELAND, Jr.H.E. (1987). Outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine against heterologous immunotype strains in a burned mouse model. J. INFECT. DIS. 155:1282-1291.

- 26.- McINNIS, J.L., DALTON, S., VIZE, P.D. y ROBINS, J.A. (1987). Non-radioactive photobiotin-labeled probes detect single copy genes and low abundance mRNA. BIOTECHNOLOGY. 5:269-272.
- 27.- MELTON, D.A., KRIEG, P.A. REBAGLIATI, M.R., MANIATIS, T., ZINN, K. y GREEN, M.R. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. NUCL. ACIDS RES. 12:7035-7056.
- 28.- MIZUNO, T., CHOU, M-Y. Y INOUE, M. (1983). A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated *ompC* gene. J. BIOL. CHEM. 258:6932-6940.
- 29.- NAKAE, T., (1986). Outer membrane permeability of bacteria. CRC CRIT. REV. MICROBIOL. 13:1-62.
- 30.- NIKAIKO, H., Y VARAA, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. MICROBIOL. REV. 49:1-32.
- 31.- OGLE, J.W., JANDA, J.M., WOODS, D.E. y VASIL, M.L. (1987). Characterization and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. J. INFECT. DIS. 155:119-126.
- 32.- OSTE, C. (1988). Polymerase chain reaction. BIOTECHNIQUES. 6:162-167.
- 33.- PAUL, C. y ROSENBUSCH, J.P. (1985). Folding patterns of porin and bacteriorhodopsin. EMBO JOURNAL. 4:1593-1597.
- 34.- POHLNER, J., MEYER, T.F., JALAJAKUMARI, M.B. y MANNING, P.A. (1986). Nucleotide sequence of *ompV*, the gene for a major *Vibrio cholerae* outer membrane protein. MOL. GEN. GENET. 205:494-500.
- 35.- PUENTE, J.L. (1987). Aislamiento de los genes *phoE* y *glxB* de *Salmonella typhi*. Fac. de Ciencias. Tesis de licenciatura.
- 36.- PUENTE, J.L., FLORES, V., FERNANDEZ, M., FUCHS, Y. y CALVA, E. (1987). Isolation of *Salmonella typhi ompC*-, *ompF*- and *phoE*-like outer membrane protein genes. TWENTY-SEVENTH INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. Abstract no. 716.
- 37.- PUENTE, J.L., FLORES, V., FERNANDEZ, M., FUCHS, Y. y CALVA, E. (1987). Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. GENE. 61:75-83.
- 38.- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALCONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. y ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of B-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. SCIENCE. 230:1350-1354.
- 39.- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H. STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUCHI, R.G., HORN, G.T., MULLIS, K.B. y ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. SCIENCE. 239:487-491.

- 40.- SANGER, F., NICKLEN, S. y COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 74:5463-5467.
- 41.- TOMPKINS, L.S., TROUP, N., LABIGNE-ROUSSEL, A. y COHEN, M.L. (1986). Cloned random chromosomal sequences as probes to identify Salmonella species. J. INFECT. DIS. 154:156-162.
- 42.- VASIL, M.L., CHAMBERLAIN, C. y GRANT, C.C.R. (1986). Molecular studies of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A gene. INFECT. IMMUN. 52:538-548.
- 43.- VAN DER LEY, P., AMESZ, H., TOMMASSEN, J. y LUGTENBERG, B. (1985). Monoclonal antibodies directed against the cell-surface exposed part of the PhoE pore protein of Escherichia coli K-12 outer membrane. EUR. J. BIOCHEM. 147:401-407.
- 44.- WACHSMUTH, K. (1986). Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. R. INFEC. DIS. 8:682-692.
- 45.- WATKINS, P.C. (1988). Restriction fragment length polymorphism (RFLP): applications in human chromosome mapping and genetic disease research. BIOTECHNIQUES. 6:310-320.