

03072
1
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GENE *ompC* DE *Salmonella typhi*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA LA ALUMNA

JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE

**TESIS CON
FALLA LE ORIGIN**

Cuernavaca, Mor., julio de 1992.



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.

RESUMEN

I.- INTRODUCCION

1.- EPIDEMIOLOGIA

2.- PATOGENIA Y CUADRO CLINICO

3.- DIAGNOSTICO CLINICO

4.- MEMBRANA EXTERNA

5.- PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

6.- LA PROTEINA DE MEMBRANA OmpC DE *S.typhi*.

II.- ANTECEDENTES

III.-OBJETIVO GENERAL

IV.-OBJETIVOS ESPECIFICOS

V.-MATERIALES Y METODOS

1.- CEPAS BACTERIANAS

2.- EXTRACCION DE DNA

3.- ANALISIS DE POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCION.

4.- DISEÑO E HIBRIDACION TIPO SOUTHERN DE OLIGODEOXIRRIBONUCLEOTIDOS.

5.- HIBRIDACION TIPO SOUTHERN CON EL FAGO LAMBDA VFC1

VI.-RESULTADOS

1.- ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCION.

2.- HIBRIDACION TIPO SOUTHERN CON LOS OLIGOS

3.- HIBRIDACION TIPO SOUTHERN CON EL FAGO LAMBDA VFC1

VII.-DISCUSION

1.- ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCION

2.- HIBRIDACION TIPO SOUTHERN CON LOS OLIGOS

3.- HIBRIDACION TIPO SOUTHERN CON EL FAGO LAMBDA VFC1

VIII.CONCLUSIONES

IX.-APENDICE

X.-BIBLIOGRAFIA

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GENE *ompC* DE *Salmonella typhi*.

La fiebre tifoidea (FT) es un problema de salud pública en México. La enterobacteria *S typhi*, es el agente etiológico de la FT. Su diagnóstico se hace mediante el cultivo de sangre o de médula ósea, el cual tarda mínimo 48 horas. Se analizó la variabilidad del gene *ompC* de *S typhi* que codifica para una proteína de membrana externa (PME), para comprobar si este podría ser un buen candidato con fines diagnósticos. El gene *ompC* de *S typhi* tiene siete regiones variables con respecto a su contraparte en *E coli*, seis de las cuales codifican para regiones hidrofílicas. Con el objeto de estudiar la especificidad del género o especie de estas regiones variables y la estructura del gene *ompC* dentro del género *Salmonella*, se diseñaron nueve oligodeoxirribonucleótidos (oligos) complementarios a la secuencia nucleotídica de dichas regiones y se probaron en experimentos tipo "Southern blot" contra 15 cepas de *Salmonella*, correspondientes a ocho serotipos. Así mismo, comparamos los patrones de restricción para diez enzimas, utilizando como sonda el gene *ompC* completo.

Las hibridaciones mostraron que *ompC* está muy conservado dentro del género *Salmonella*: los oligos hibridaron con la banda de *EcoRV* correspondiente al gene en todas las cepas probadas, con excepción del oligo 5 que no hibridó con *S arizonae*, *S abordeen*, y *S gallinarum*. En forma similar el oligo 6 no hibridó con las anteriores más *S. worthington* y *S. enteritidis*. Estos oligos podrían funcionar como sonda género específica para la identificación de *Salmonella*. Con el gene completo se observaron polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, únicamente con *S. arizonae*, aunque con *HaeIII S. typhi* presentó un patrón único.

Por otro lado, el DNA del fago recombinante que contiene *ompC* fue marcado radioactivamente y se hibridó contra el DNA de las cepas de *Salmonella* antes mencionadas. Se observó una banda única para *S. typhi* de 3.3kb, la cual será clonada, secuenciada y caracterizada.

También con el objeto de encontrar secuencias de DNA específicas para *S. typhi*, se utilizó el método de cromatografía por hidroxapatita. Se reasoció DNA radioactivo de *S. typhi* con DNA no radioactivo de *S. typhimurium* y posteriormente se pasó por una columna con hidroxapatita. La fracción en donde se encontraba el DNA de cadena sencilla se hibridó contra el DNA de diferentes aislados de *S. typhi*, otras especies de *Salmonella*, y otras enterobacterias. No hubo especificidad para *S. typhi*, ya que se observó heterogeneidad en las señales de hibridación, inclusive entre DNA de una cepa colocada en diferentes lugares de una misma membrana. Por lo tanto consideramos que la cromatografía por hidroxapatita no es un buen método para aislar secuencias específicas de *S. typhi*.

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GENE *ompC* DE *Salmonella typhi*.

La fiebre tifoidea (FT) es un problema de salud pública en México. La enterobacteria *S.typhi*, es el agente etiológico de la FT. Su diagnóstico se hace mediante el cultivo de sangre o de médula ósea, el cual tarda mínimo 48 horas. Se analizó la variabilidad del gene *ompC* de *S.typhi* que codifica para una proteína de membrana externa (PME), para comprobar si este podría ser un buen candidato con fines diagnósticos. El gene *ompC* de *S.typhi* tiene siete regiones variables con respecto a su contraparte en *E.coli*, seis de las cuales codifican para regiones hidrofílicas. Con el objeto de estudiar la especificidad del género o especie de estas regiones variables y la estructura del gene *ompC* dentro del género *Salmonella*, se diseñaron nueve oligodeoxirribonucleótidos (oligos) complementarios a la secuencia nucleotídica de dichas regiones y se probaron en experimentos tipo "Southern blot" contra 15 cepas de *Salmonella*, correspondientes a ocho serotipos. Así mismo, comparamos los patrones de restricción para diez enzimas, utilizando como sonda el gene *ompC* completo.

Las hibridaciones mostraron que *ompC* está muy conservado dentro del género *Salmonella*: los oligos hibridaron con la banda de *EcoRV* correspondiente al gene en todas las cepas probadas, con excepción del oligo 5 que no hibridó con *S.arizonae*, *S.aberdeen*, y *S.gallinarum*. En forma similar el oligo 6 no hibridó con las anteriores más *S.worthington* y *S.enteritidis*. Estos oligos podrían funcionar como sonda género específica para la identificación de *Salmonella*. Con el gene completo se observaron polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, únicamente con *S.arizonae*, aunque con *HaeIII S.typhi* presentó un patrón único.

Por otro lado, el DNA del fago recombinante que contiene *ompC* fue marcado radioactivamente y se hibridó contra el DNA de las cepas de *Salmonella* antes mencionadas. Se observó una banda única para *S.typhi* de 3.3kb, la cual será clonada, secuenciada y caracterizada.

También con el objeto de encontrar secuencias de DNA específicas para *S.typhi*, se utilizó el método de cromatografía por hidroxapatita. Se reasoció DNA radioactivo de *S.typhi* con DNA no radioactivo de *S.typhimurium* y posteriormente se pasó por una columna con hidroxapatita. La fracción en donde se encontraba el DNA de cadena sencilla se hibridó contra el DNA de diferentes aislados de *S.typhi*, otras especies de *Salmonella*, y otras enterobacterias. No hubo especificidad para *S.typhi*, ya que se observó heterogeneidad en las señales de hibridación, inclusive entre DNA de una cepa colocada en diferentes lugares de una misma membrana. Por lo tanto consideramos que la cromatografía por hidroxapatita no es un buen método para aislar secuencias específicas de *S.typhi*.

I.- INTRODUCCION.

La investigación en los países en vías de desarrollo ha sido enfocada al estudio de algunos problemas de salud. Por otro lado, los adelantos tecnológicos en las últimas décadas, han registrado un avance sin paralelo con el apoyo de las metodologías de Biología Molecular y DNA recombinante, lo que ha permitido abordar, de forma precisa, el estudio de la patogénesis, el diagnóstico, la respuesta inmune y la vacunación de algunas enfermedades que son problemas de salud pública en estos países.

En México, siguen siendo las enfermedades infecciosas uno de los principales problemas de morbi-mortalidad; por ello, hay una gran necesidad de emplear estas nuevas metodologías que nos permitan entender dichas patologías, diagnosticarlas mejor para iniciar tratamientos tempranos y utilizarlos en la comunidad con fines de salud pública y en la detección y el control en la industria alimentaria.

En la actualidad, la identificación de microorganismos es esencial en diversos campos de las Ciencias Biológicas, incluyendo investigación básica y aplicada en Biomedicina, en Microbiología, en Ecología y en Agricultura. En Medicina se requiere de pruebas de laboratorio que sean rápidas y seguras para el diagnóstico, y desde el punto de vista epidemiológico se requiere de pruebas que puedan ser usadas con eficiencia en un gran número de muestras clínicas y ambientales, que permitan identificar y clasificar los microorganismos aislados en una epidemia.

Por otro lado, las metodologías utilizadas en la Microbiología convencional, no son rápidas para dichos propósitos, debido a que existen

microorganismos que requieren de medios de cultivo especiales, de períodos prolongados de incubación para su aislamiento, así como de procedimientos laboriosos para su identificación, sobre todo en los llamados exigentes; o bien, que existen en las muestras clínicas en un número muy pequeño y por lo cual no pueden ser aislados rápidamente. Además, el diagnóstico temprano a través de la identificación del germen infeccioso es muy importante para que el clínico pueda dar al paciente el tratamiento específico, éste ofrece varias ventajas: los microorganismos no generan resistencia a antibióticos que no fueron específicos; el paciente podría reintegrarse a sus actividades en un tiempo relativamente corto; y el costo sería menor, tanto para el paciente, como para los hospitales.

Por las razones anteriores, es fundamental desarrollar una herramienta de laboratorio con tecnología moderna que pueda ayudar, en forma rápida y precisa, a solucionar dichos problemas.

Recientemente se han desarrollado técnicas moleculares basadas en hibridación de dígitos de restricción de DNA cromosomal utilizando como sonda RNA ribosomal (Ribotyping) (Altwegg et al., 1989) y patrones electroforéticos que han sido aplicados a investigación de especies de *Salmonella* (Reeves et al., 1989; Tompkins et al., 1986; Beltrán et al., 1988; Selander et al., 1990), *Legionella* (Edelstein et al., 1986; Selander et al., 1985; Tompkins et al., 1987), *Haemophilus influenzae* (Campos et al., 1983; Stull et al., 1988), *Escherichia coli* (Selander et al., 1986; Selander et al., 1987) y especies de *Campylobacter* (Moureau et al., 1989; Romaniuk et al., 1987). Se

han elaborado sondas de DNA para diversas bacterias como *Legionella*, *Mycoplasma pneumoniae*, y *Mycobacterium*, entre otras (Tenover, 1988).

Se han desarrollado dos sondas de DNA para identificar *Salmonella*: una en la industria alimentaria (Fitts et al., 1983; Fitts et al., 1985) y la otra para diagnóstico clínico de fiebre tifoidea (FT) (Rubin et al., 1985), aunque se han utilizado con aislados y no directamente en las muestras clínicas (Rubin et al., 1988).

Nuestro laboratorio ha tenido el interés de generar este tipo de metodologías, para ayudar a resolver uno de los problemas importantes de salud que prevalecen en este país, la FT, que es una infección generalizada producida por *S.typhi*.

Salmonella typhi es un bacilo gramnegativo, forma parte de la familia de las enterobacterias, las cuales fermentan la glucosa, reducen los nitratos y producen catalasa. Las características fenotípicas que la diferencian dentro de su género, son la producción de ácido sulfhídrico y la no utilización de citrato, como única fuente de carbono (Ewing, 1986). Perteneció al serotipo 9,12,d,Vi. Esta clasificación está basada en la unidad repetitiva del antígeno somático, también conocido como antígeno O (9,12), el cual forma parte del lipopolisacárido de la membrana externa; el antígeno flagelar H(d), y el antígeno capsular (Vi) (Bergey, 1984).

Partiendo de la base de que en nuestro laboratorio se ha aislado y caracterizado el gene *ompC* de *S.typhi*, en este trabajo hemos analizado su variabilidad genética entre diferentes especies de *Salmonella* para determinar

si éste gene pudiera tener utilidad diagnóstica con algunas secuencias que pudieran fungir como detectores específicos en la identificación de *S.typhi*, y proporcionar al clínico el diagnóstico temprano de la FT.

1.- EPIDEMIOLOGIA

En 1986, se reportaron 12.5 millones de casos anuales de FT (excluyendo China) en el mundo. Asimismo, se calculó una incidencia de 365 casos por cada 100 mil habitantes de la población total, y hasta de 540 por cada 100 mil habitantes de la población de países en vías de desarrollo (0.5%). La tasa mundial de mortalidad es de alrededor de 1% (Edelman y Levine, 1986). En México, en 1991, se reportaron 14,963 casos de FT, siendo el grupo más afectado el comprendido entre los 15 y 44 años de edad (Dir. Gral de Epidemiología, 1991).

2.- PATOGENIA Y CUADRO CLINICO

S.typhi es un patógeno intracelular facultativo, porque es capaz de penetrar (invadiendo), sobrevivir, y multiplicarse dentro de diferentes tipos de células eucariotas (Finlay et al., 1989).

Uno de los inconvenientes para el estudio de las infecciones por *S.typhi* es la carencia de un modelo animal, ya que *S.typhi* es un patógeno especie-específico. El modelo más aceptado para el estudio de los mecanismos de patogenia es el del ratón, hospedero natural de *S.typhimurium*. Esta bacteria produce salmonelosis murina en ratón y nos da un modelo análogo para el estudio de la patogénensis de FT en el hombre.

El sitio de entrada de *S.typhi* a la barrera intestinal del hombre no se conoce aún con certeza; sin embargo, los hallazgos en una biopsia de yeyuno, en un paciente infectado revelaron inflamación, sugiriendo la posibilidad de que el yeyuno pudiera ser el sitio de penetración en algunos pacientes (Hook, 1990).

La dosis infectante ha sido estudiada en voluntarios sanos, siendo aproximadamente de 10^6 - 10^9 organismos (Hornick et al., 1970). Sin embargo, el desarrollo de la enfermedad después de la ingestión de *S.typhi* está influenciada por la virulencia de los organismos, así como por múltiples factores de resistencia del hospedero (Hook, 1990).

La infección por *S.typhi* es generalmente por vía oral, mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces de humano;

posteriormente, la bacteria pasa a través del estómago, en donde la mayoría de los bacilos son inactivados por la acidez gástrica. Las bacterias resistentes a la inactivación en esta barrera natural, invaden la mucosa del intestino delgado, en donde son ingeridas por células epiteliales, hasta alcanzar la lámina propia, donde se reproducen en el tejido linfoide de las placas de Peyer. Las bacterias son fagocitadas por las células del sistema reticulo endotelial, causando daño citotóxico al epitelio, en donde se multiplican dentro de los fagocitos mononucleares en el hígado, bazo, nódulos linfáticos y médula ósea. Los mecanismos por los cuales la bacteria lleva a cabo estos procesos invasivos aún se desconocen. Algunos de los bacilos son transportados a la vesícula biliar, en donde pueden eludir todos los mecanismos inmunes. La bilis infectada produce una continua reinfección del intestino (Germanier, 1984; Groisman et al., 1990). Durante el padecimiento, del 50 al 80% de los enfermos excretan *S.typhi* en las heces.

El tiempo de incubación de la FT es de 10-14 días. Durante ciertos estados de la enfermedad, *S.typhi* circula en la sangre produciendo bacteremia, de donde puede ser aislada con propósitos de diagnóstico (Calva et al., 1988).

Se ha hipotetizado que la mayoría de las manifestaciones clínicas son causadas por metabolitos como el ácido araquidónico, radicales libres y otros mediadores liberados de células mononucleares. Asimismo, se ha mencionado también que la endotoxina contribuye a la patogénesis de la FT, por un aumento en la respuesta local inflamatoria en los tejidos donde se multiplica *S.typhi*, lo cual sugiere que la fiebre es el resultado del aumento en la síntesis

y liberación de pirógeno en lesiones inflamatorias locales (Hook, 1990).

Entre las manifestaciones clínicas que se presentan durante la enfermedad se encuentran: fiebre entre 39-40°C, cefalea, malestar general, diarrea, náusea, vómito, pérdida del apetito, dolor abdominal, escalofríos, tos y dolores musculares. Las complicaciones más frecuentes son hemorragia intestinal y cambios inflamatorios en el hígado (Calva et al., 1988).

3.- DIAGNOSTICO CLINICO

En la actualidad, el diagnóstico definitivo de la FT y de otras infecciones por *S.typhi* se realiza mediante el aislamiento del organismo de sangre u otros sitios normalmente estériles como médula ósea y biopsia de tejido. El aislamiento del microorganismo en heces, en áreas endémicas, no establece el diagnóstico, pero da una evidencia presuntiva de que el paciente pudiera tener FT, siempre y cuando éste curse con un cuadro clínico sugestivo y se hace el diagnóstico de estado de portador crónico asintomático. El hemocultivo tiene una sensibilidad del 80%, pero presenta el inconveniente de requerir un período de incubación mínimo de 48 horas, el cual puede prolongarse hasta siete días o más. Además, para aumentar la probabilidad de aislamiento de *S.typhi*, es necesario tomar tres muestras de 10 ml de sangre, en intervalos de media hora cada uno (Washington, 1986). Un método que mejora la sensibilidad hasta 90% es el cultivo de médula ósea (Hoffman et al., 1984; Edelman et al., 1986). El microorganismo puede aislarse de esta muestra aún

cuando el paciente haya recibido tratamiento con cloranfenicol (Hoffman et al., 1984), pero presenta varios inconvenientes: la toma de muestra es agresiva para el paciente, debe ser tomada por un especialista, y el tiempo de incubación es también prolongado. Por otro lado, la terapia antimicrobiana, iniciada antes de tomar la muestra para el cultivo, disminuye la posibilidad de recuperar el microorganismo de cualquier muestra. Recientemente, se han desarrollado métodos microbiológicos para mejorar el aislamiento de bacterias, pero es necesario esperar de 2 a 7 días para la recuperación del microorganismo (Kelly et al., 1983; Wilson , 1992).

Existen métodos serológicos para el diagnóstico de la FT, pero no son tan específicos como el cultivo. Estos tienen muchas limitaciones y los resultados deben interpretarse con precaución. La prueba de Widal es la más usada, en donde se detectan anticuerpos contra los antígenos O y H de *S.typhi*. En áreas endémicas, existe la posibilidad que no haya un aumento en el título de aglutinación durante el curso de la infección. Al mismo tiempo, otras enfermedades, especialmente infecciones por otros bacilos gramnegativos, pueden causar elevaciones no específicas de aglutininas por reacción cruzada de antígenos (Hock, 1990). Por otro lado, en áreas endémicas con la prueba de Widal se pueden detectar títulos altos de anticuerpos (1:160) sin haber infección, y es sólo sugestiva en individuos no vacunados de áreas no endémicas y en niños menores de 10 años de áreas endémicas, por lo que en estos casos tampoco podría ser útil esta prueba (Levine, et al., 1978) y, por lo tanto la prueba de Widal presenta inconveniencias para el diagnóstico de la FT.

Se han realizado estudios serológicos en países endémicos sugiriendo que, para considerar positiva la prueba de Widal, se necesitan títulos altos (1:160). Otros estudios sugieren que la prueba de hemaglutinación es comparable con la prueba de Widal (Coovadia et al., 1986). Se pueden determinar también anticuerpos contra el antígeno Vi por hemaglutinación y por EIA, pero solamente son de utilidad en la detección de portadores crónicos de *S.typhi* (Nolan et al., 1980).

En el *First Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever* (1991), se describieron varios métodos serológicos como ELISA, EIA, hemaglutinación pasiva, pruebas que emplean el uso de lipopolisacárido purificado o extractos de proteínas de membrana cruda de *S.typhi*, con anticuerpos policlonales o monoclonales, todas ellas con mejores perspectivas, que la prueba de Widal. Sin embargo, es necesario validar las metodologías para poder utilizarlas como una herramienta de diagnóstico en el laboratorio clínico (Sedallah et al., 1990; Pang et al., 1992).

En la etapa temprana de la FT el diagnóstico diferencial es muy importante, ya que hay una gran variedad de padecimientos infecciosos que presentan síntomas y signos inespecíficos que pueden confundirse con FT, como son la brucelosis, mononucleosis, influenza, y otras (Hook, 1990). Por lo tanto, es necesario tener un método diagnóstico sensible, específico y rápido que pueda diferenciar FT de otras infecciones; Verdugo et al., (1992), han reportado un ELISA altamente específico en la primera semana de la infección; sin embargo, la utilización de sondas de DNA podría resolver este problema,

con una mayor sensibilidad y especificidad.

4.- MEMBRANA EXTERNA

Las bacterias gramnegativas tienen una cubierta celular que está compuesta de: una membrana interna o citoplásmica y una externa, las cuales están separadas por una pared de peptidoglicano. La membrana interna se compone de una bicapa fosfolipídica y de una variedad de polipéptidos. Sus funciones son la generación de energía, el transporte activo, la biosíntesis y excreción de componentes tóxicos del interior. La región que separa la membrana interna de la externa se llama periplasma, el cual está probablemente localizado entre el gel de peptidoglicano y la membrana. Esta región contiene proteínas y oligosacáridos aniónicos como el peptidoglicano y la membrana citoplasmática (Hancock , 1991; Nakae, 1986).

La membrana externa (ME) juega un papel muy importante en la fisiología de las bacterias gramnegativas, ya que es una bicapa totalmente asimétrica compuesta de fosfolípidos y de lipopolisacáridos (LPS), estos últimos confieren a la ME sus propiedades de barrera física y funcional entre la célula y el medio que la rodea. El LPS es un componente característico de la membrana externa. Es una molécula anfifílica, que contiene una región hidrofóbica, determinada en gran parte por la fase lipídica del lado interno de la membrana; ésto permite la entrada selectiva de moléculas hidrofóbicas a la

membrana citoplásmica, por lo que protege a las células de agentes nocivos, como la acción detergente de sales biliares, y de la degradación de enzimas digestivas. El LPS tiene un papel relevante en la relación huésped parásito, y en la resistencia que poseen las bacterias gramnegativas a una serie de antibióticos (Nikaido et al., 1991; Nikaido y Vaara, 1985) y en procesos de resistencia a complemento, fagocitosis y otros fenómenos de respuesta inmune (Nakae T., 1986)

5.- PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME)

La ME posee tres o cuatro proteínas principales, presentes en un alto número de copias (10^5 por célula), algunas de las cuales forman poros de difusión pasiva (porinas), que permiten el paso a través de la membrana de pequeñas moléculas hidrofílicas (400-600 Da), y sirven como receptores de fagos y colicinas. Las porinas tienen una composición de aminoácidos y peso molecular similar (35 - 45 kDa). Cruzan inmunológicamente y la unidad funcional formadora de los poros es un trímero (Mizuno et al, 1983). Se ha observado, por estudios de microscopía electrónica, que presentan orificios separados en la superficie externa, que forman un canal único cerca de la mitad de la membrana y se unen al final del otro lado de la membrana como un solo canal central (Engel A. et al, 1985). Actualmente, existe un modelo en el que se propone cómo cada monómero se integra en la ME, de tal forma que

cruza varias veces. Se sabe que las PME tienen regiones hidrofóbicas cortas, que son las partes fundamentales para que la proteína pueda atravesar la membrana. La estructura secundaria de las porinas es predominantemente de hojas beta, y conforman dos terceras partes del esqueleto de la proteína. Las hojas beta corren en sentido antiparalelo en el eje transversal al plano de la membrana. Este modelo se ha apoyado en estructuras inferidas por microscopía electrónica y por cristalografía de rayos X (Nikaido y Vaara, 1985) (Fig.1).

La porinas más estudiadas son los productos de los genes *ompC*, *ompF* y *phoE* de *E.coli* K-12. Las proteínas OmpC y OmpF, están reguladas por la osmolaridad y la temperatura del medio, y PhoE se expresa en condiciones de limitación de fosfatos (Nikaido and Vaara, 1985). La proteína estructural OmpA es un monómero de peso molecular semejante al de las otras porinas, y se ha visto que es receptora de algunos fagos y también incrementa la eficiencia en la conjugación (Nikaido y Vaara, 1985).

En los últimos años, se ha dado mucha importancia a las PME de las bacterias, no sólo por sus posibles implicaciones en la patogenicia, sino como antígenos de superficie, al observarse la presencia de anticuerpos específicos en el suero de enfermos, tanto en fase aguda como en fase convalescente (Calderón et al, 1986; Verdugo et al., 1992).

Se ha comprobado que las PME inducen inmunidad protectora en ratones, contra *S.typhimurium* y *S.typhi*, (Isibasi et al., 1988). Además de ser inmunogénicas, las porinas, son capaces de conferir protección duradera y de

inducir el desarrollo de hipersensibilidad retardada, considerada una manifestación de la inmunidad celular (Udhayakumar and Muthukkaruppan, 1987 a,b; Matsui y Arai, 1991), también se ha demostrado que las porinas pueden inducir inflamación durante la infección y que probablemente participen en la activación del complemento durante dicho fenómeno (Galdiero et al., 1990). En el caso de las porinas de *S.typhi* se les ha atribuído un efecto hemolítico en eritrocitos de humano (Calderón et al, 1984).

6.-LA PROTEINA DE MEMBRANA EXTERNA OmpC DE *S.typhi*.

En nuestro laboratorio se ha aislado y secuenciado el gene *ompC* de *S.typhi* que codifica para la proteína de membrana externa OmpC. Se ha observado que esta proteína se expresa independientemente de la osmolaridad del medio (Puente et al., 1987), mientras que la OmpC de *E.coli* se expresa preferencialmente en un medio de alta osmolaridad. Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de OmpC de *S.typhi* es dependiente del activador transcripcional OmpR de *E.coli*, lo cual demuestra que existen diferencias entre los mecanismos de osmoregulación de ambas bacterias, aunque comparten efectores comunes (Puente et al., 1991). Debido a que OmpC de *S.typhi* se expresa independientemente de la osmolaridad del medio, pensamos que OmpC pudiera estar presente en la membrana externa no

solamente en condiciones de vida libre, sino también durante la infección, debido a que la osmolaridad del suero humano (0.9% de NaCl) es equivalente a la alta osmolaridad utilizada en el laboratorio (10% de sacarosa) (Nikaido y Vaara 1985). Además, se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos en sueros de pacientes (Verdugo, et al., 1992), lo cual sugiere que esta proteína es un buen antígeno candidato para ser evaluado en diagnóstico y vacunación.

Recientemente, se ha propuesto un modelo común de la estructura de las porinas, incluyendo a OmpC de *S.typhi* (Nikaido, 1991). Dicho modelo se basa en la estructura tridimensional de una PME de *Rodhobacter capsulatum*, obtenida a baja resolución por rayos X, en donde cada poro del monómero consiste de un barril de 16 hojas beta (Weiss et al, 1990). Asimismo, se basa en la secuencia de aminoácidos de OmpC (Puente et al., 1989) y del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de porinas, tanto de enterobacterias como de otras bacterias filogenéticamente muy distantes (Jeanteur et al., 1991). Con todos estos elementos elaboramos un esquema de la proteína OmpC de *S.typhi* (Fig.2), postulando las regiones que pudieran estar expuestas al exterior de la célula, y las regiones que se encuentran en la membrana interna. En el esquema se señalan también las regiones en donde hay diferencias con su contraparte en *E.coli* (denominadas a,b,c,d,e,f,g,), además de los aminoácidos conservados entre ambas proteínas.

II.- ANTECEDENTES

Nuestro grupo ha realizado investigación en el área de las infecciones producidas por *S.typhi* y *Campylobacter spp.*, con el fin de saber más acerca de la biología molecular de estas bacterias y generar conocimiento básico, en regulación genética, en la relación huésped -parásito, en la definición de inmunógenos referentes para marcar la pauta en el desarrollo de medidas más eficientes para diagnóstico, control y prevención de las enfermedades que producen.

Los trabajos previos utilizados como cimiento para la realización de esta tesis fueron :

- a) La construcción de un banco de genes de *S.typhi* en el vector lambda 1059 (Puente et al., 1987).
- b) Se clonó y caracterizó el gene para la proteína de membrana externa OmpC (Puente et al., 1987; Puente et al., 1989); así mismo, se estudiaron aspectos de la regulación del gene (Puente et al., 1991).
- c) Se ha demostrado, por experimentos de ELISA, que pacientes con FT generan anticuerpos específicos en contra de preparaciones de membrana externa (Verdugo et al., 1992).

III.- OBJETIVO GENERAL

Analizar la variabilidad del gene *ompC* de *S.typhi* como candidato para el desarrollo de una sonda específica que sea útil con fines diagnósticos.

IV.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.-Analizar si existe polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PLRF) de diferentes aislados clínicos de *S.typhi* y de otras especies de *Salmonella* spp., generados por el gene *ompC*.
- 2.-Comprobar si existe PLFR, utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de las diferencias nucleotídicas en los genes *ompC* de *S.typhi* y *E.coli*, en aislados clínicos de *S.typhi* y en otras especies de *Salmonella* spp.
- 3.-Determinar la especificidad de los oligonucleótidos probados para *S.typhi*
- 4.-Comprobar si existe polimorfismo en el DNA de las áreas aledañas al gene *ompC* en el fago recombinante lambda VFC1.

V.-MATERIALES Y METODOS

1.- CEPAS BACTERIANAS:

1.- *Salmonella typhi* Ty-403 j-z66, de Indonesia (3483/82 Le Minor).

2.- *Salmonella typhi* Ty-404 d-z66, de Indonesia (3083/80 Le Minor).

Las cepas de Indonesia tienen el antígeno H llamado z66 por Le Minor, que las hace tener movilidad diferente a la de *S.typhi* con antígeno H conocido (d)(LeMinor et al, 1981).

3.- *Salmonella arizonae*, aislada de líquido articular de una paciente con artritis séptica (laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán INNSZ). Serológicamente sólo aglutinó con el antisuero polivalente de *Salmonella* spp., de los grupos A hasta el I más VI (serobac antisuero S-1, Bigaux Diagnóstica México,D.F.).

4.- *Salmonella worthington* serotipo G2 (1,13,23, z), aislado clínico de un brote de gastroenteritis en Mérida, Yuc.

5.- *Salmonella enteritidis* serotipo D1 (1,9,12), aislada de un paciente con gastroenteritis, en el laboratorio de Microbiología Clínica del INNSZ.

6.- *Salmonella aberdeen* serotipo F (11, i, 1,2), cepa de referencia (Bigaux Diagnóstica).

7.- *Salmonella anatum* serotipo E1 (3,10 e,h 1,6), cepa de referencia (Bigaux Diagnóstica).

8.- *Salmonella typhi* Ty2 D 9,12 d,Vi, ATCC 19430.

- 9.- *Salmonella gallinarum* serotipo 9,12, cepa de referencia de la Facultad de Veterinaria, UNAM.
- 10.- *Salmonella typhi* IMSS-1, serotipo 9,12,d Vi. Cepa de referencia mexicana, aislada de un paciente con FT en el Instituto Mexicano del Seguro Social.
- 11.- *Escherichia coli* Q359 (hsdR-, hsdM-, supE, 080, P2), derivada de K-12, descrita por Karn et al., 1980.
- 12.- *Salmonella paratyphi* serotipo A (1,2,12) cepa de referencia (Bigaux Diagnóstica).
- 13.- *Salmonella paratyphi* serotipo B (1,4,[5],12) cepa de referencia (Bigaux Diagnóstica).
- 14.- *Salmonella* spp. aislado clínico serogrupo B de un paciente con gastroenteritis (Laboratorio de Microbiología Clínica del INNSZ) (serobac antisuero S-4, Bigaux Diagnóstica).
- 15.- *Salmonella manhattan* serotipo C2 (6,8 d 1,5), cepa de referencia (Bigaux Diagnóstica).
- 16.- *Salmonella typhimurium* LT2, cepa de referencia SL937; cepa silvestre de Herzberg.
- 18.- *Salmonella typhi* "JM", *Salmonella typhi* "La Raza", *Salmonella typhi* "H-185", serotipo D (9,12,d Vi), son aislados clínicos de pacientes del brote de FT en México en 1972, donadas por el Dr. Jorge Olarte.
- 19.- *Salmonella typhi* serotipo D (9,12, d Vi), "NVS-1" aislado clínico de un paciente con FT en una comunidad de Chiapas.

20.-*Salmonella typhi* MK04, MK12, MK13, MK15, MK20, MK24, MK27, MK28, MK29, MK30, MK31, MK33, aislados de pacientes con diferentes cuadros clínicos de FT, incluyendo: cuadro clínico clásico con fiebre, hepatitis, diarrea, y portador asintomático. El aislamiento y la identificación de la especie fue hecha en el Departamento de Infectología del INNSZ.

21.-Otros bacilos gramnegativos: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella boydii*, *Yersinia* spp., *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Kluyvera* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, estas cepas fueron aisladas e identificadas en el laboratorio de Microbiología Clínica del INNSZ.

2.- EXTRACCION DE DNA

Las cepas se crecieron inicialmente en placas de agar Mac Conkey, se tomó una colonia y se inoculó en un matraz con 50 ml de caldo soya tripticaseína. Las cepas se incubaron en agitación a 37°C toda la noche. La extracción de DNA cromosómico se realizó de acuerdo con el procedimiento reportado por Betlach y col.(1976).

3.- ANALISIS DE POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

Se digirieron 5 µg de DNA de las cepas de *Salmonella* spp. con las siguientes enzimas de restricción : *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Msp*I, *Rsa*I, *Sau*3A y *Taq*I. Los fragmentos generados por las tres primeras enzimas fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, con amortiguador tris-acetatos al 1X. Los fragmentos obtenidos con las enzimas restantes fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, con amortiguador tris-boratos al 1X. La electroforesis se hizo a 100 volts durante aproximadamente tres horas. Posteriormente, los fragmentos de DNA fueron transferidos y fijados a filtros de nitrocelulosa. La fijación del DNA se llevo a cabo mediante el secado del filtro en un horno a vacío a 80°C, durante dos horas (Maniatis et al., 1989).

Se marcaron 200ng de DNA del gene estructural *ompC* por el método de traslado de corte ("Nick translation"). El intervalo de actividad específica fue entre 10^6 - 10^8 cpm/µg . El filtro fue prehibridado con una solución de Denhardt 10X (0.2% de ficoll, 0.2% de polivinilpirrolidona y 0.2% de albúmina bovina), buffer de fosfatos 0.1M, SSC 5X (citrato de sodio 0.075M, cloruro de sodio 0.75M) y de DNA de timo de ternera 0.1mg/ml, durante tres horas. La solución de hibridación fue la misma que la de prehibridación. La hibridación se llevó a cabo con 10^6 cpm/carril a 65°C, durante 12 a 16 horas , después de este tiempo los filtros fueron lavados con una solución de SSC 1X, SDS 0.01%,

a 65°C; durante 30 minutos y, posteriormente, los filtros se expusieron en una película de rayos X (Maniatis et al., 1989).

Se digirieron 5µg de DNA de las enterobacterias con *EcoRV* y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel y se transfirieron a un filtro como se describió en el párrafo anterior.

Los filtros se prehibridaron con una solución de SSC 5X, formamida 30%, Denhardt 10X, Tris-HCl pH 7.5 50 mM y DNA de timo de ternera 0.1 mg/ml por tres horas. La hibridación se hizo con la misma solución, con 10⁶ cpm/ carril de sonda radioactiva, a 42°C, durante 12-16 horas. Los filtros se lavaron en condiciones estrictas (SSC 1X, SDS 0.1%, 65°C, 60 min) y se expusieron en un cassette con una película de rayos X.

4.- DISEÑO E HIBRIDACION TIPO "SOUTHERN BLOT" CON OLIGODEOXIRRIBONUCLEOTIDOS

Se diseñaron nueve oligodeoxirribonucleótidos (oligos C1-C9), complementarios a la secuencia nucleotídica de siete regiones variables entre los genes *ompC* de *S.typhi* y de *E.coli*. Todos ellos están en dirección 5'→ 3' y son 100% homólogos a la secuencia de *S.typhi* (Puente et al., 1989) (Fig.3, Tabla I). Se marcaron 10 pmoles de cada uno de los oligos, con 70µCi de gamma-ATP-³²P y 10 unidades de polinucleótido cinasa. La marca no incorporada se separó en una columna de 800 µl de Biogel P-30 contenida en

un tubo Eppendorf utilizando una centrifuga clínica (Maniatis et al., 1989). Se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo. La actividad específica estuvo en intervalos de 10^8 - 10^9 cpm/ μ g de oligo. El filtro de nitrocelulosa fue prehibridado en una solución de SSC 6X, Denhardt 5X, pirofosfato de sodio 0.05%, DNA de timo de ternera 0.01 mg/ml y SDS 0.05%. La solución de hibridación fue: SSC 6X, Denhardt 1X, rRNA 100 μ g/ml, pirofosfato de sodio 0.05%, SDS 0.1%. La hibridación se llevó a cabo con 10^6 cpm, del oligo marcado, por carril, a 37°C, durante 16-18 horas. El lavado se hizo desde condiciones relajadas (SSC 2X, SDS 0.1%) hasta condiciones muy estrictas (SSC 0.1X, SDS 0.1%). La temperatura de lavado se hizo en base a la Tm de cada uno de los oligos. Posteriormente, los filtros se expusieron en un cassette con una película sensible a Rayos X (Maniatis et al., 1989).

TABLA I.- CARACTERISTICAS DE LOS OLIGOS UTILIZADOS

SECUENCIA (5'→3')	L	%G+C	Tm
C1 GÄCÄCÄÄÄGGCAGCGÄC	18	61	58
C2 CAGACTGÄÄGGCAGCÄÄCGÄC	21	57	66
C3 GCGTGAGCGGTGÄÄÄÄCÄCC	20	60	64
C4 CAATCGGCGÄÄGGCTTCTCTG	21	57	66
C5 ACÄCCGCTÄÄCGCTCGCCTGTAT	23	56	82
C6 GGTGGACGGGTTGCTGCCGTTAGAGGT	27	62	87
C7 GCGGTTGCTGÄTGTCTT	18	55	56
C8 CTGGTCGCCATAGCTGGCGC	20	70	68
C9 CGCATCGCGGTÄÄÄAGTCGTTTTTA	25	48	89

L= longitud (nucleótidos)

GC: % guanina + citosina

Tm: temperatura de disociación (50%)

El punto arriba de cada nucleótido indica homología con el gene de *E.coli*.

5.- HIBRIDACION TIPO "SOUTHERN BLOT" CON FAGO VFC1

En nuestro laboratorio, se construyó un banco de genes de *S.typhi* en el vector fago lambda 1059, del que se aisló un fago recombinante llamado VFC1, en éste se tiene clonado un fragmento de aproximadamente 15kb, el cual porta el gene *ompC* de *S.typhi* (Puente et al., 1987).

Se marcaron 200ng de DNA de fago VFC1 por el método de "Nick Translation" (Maniatis et al., 1989) y se hizo hibridación tipo "Southern blot" contra DNA de las cepas de *Salmonella* spp. digeridas con *EcoRV* y *BglII* . Las condiciones de hibridación fueron: 40% de formamida , 42°C, 12-16 horas. Los filtros se lavaron en condiciones estrictas (SSC 0.1X, SDS 0.1%, 65°C, 30 min) y se expusieron en un cassette con una película sensible a rayos X.

VI.- RESULTADOS

1.- ANALISIS DE POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PLFR).

Con el fin de saber si en diferentes especies de *Salmonella* el gene *ompC* se encuentra conservado dentro del género *Salmonella* spp., se hizo análisis de PLFR en DNA de quince cepas de *Salmonella* spp., con diez diferentes enzimas de restricción.

Los hallazgos fueron:

a) No se observó PLFR ya que todas las cepas mostraron un patrón único para cada una de las enzimas probadas (Fig.4A), con excepción de *HaeIII* con la cual *S.typhi* presentó un patrón único diferente a todas las demás especies (Fig.4B).

b) *S.arizonae* fue la única que presentó polimorfismo con todas las enzimas probadas (datos no mostrados); más aún, cuando el lavado fue en condiciones estrictas la señal desapareció (Fig.4A y 4B).

En la figura 5 se muestra la hibridación tipo Southern del gene *ompC* de *S.typhi* contra el DNA de diferentes especies de *Salmonella* cortado con *EcoRV*. Se observa que el gene hibrida con todas las cepas de *Salmonella* spp. probadas en una banda de 2.3kb como se había demostrado anteriormente en *S.typhi* (Puente et al., 1987).

Posteriormente, con el fin de determinar si el gene *ompC*, o secuencias homólogas a *ompC* están contenidas en un fragmento del mismo o de otro

tamaño, en otras enterobacterias, se hizo un experimento control en el que se hibridó el DNA de 13 enterobacterias, digeridos con *EcoRV*, contra el gene *ompC*. En la Figura 6 se muestra el resultado, en ella se observa que hubo señal de hibridación con bandas de diferente tamaño para cada una de las cepas probadas; nótese que solamente *S.typhi* hibridó con una banda de 2.3 kb.

2.- HIBRIDACION CON OLIGOS

En los resultados obtenidos en el análisis de PLFR, pudimos observar que el gene *ompC* está conservado en las diferentes especies de *Salmonella* probadas. Sin embargo, para hacer un estudio más fino de la variabilidad del gene y comprobar si podrían generarse patrones de hibridación heterogénea entre diferentes especies de *Salmonella*, así como entre diferentes aislados de *S.typhi*, se probaron nueve oligos llamados C1-C9. Estos fueron diseñados a partir de las regiones variables entre los genes *ompC* de *E.coli* y *S.typhi* (Fig.3) (Puente et al., 1989).

Los hallazgos de la hibridación tipo "Southern blot," del DNA de diferentes salmonelas contra los oligos fueron :C1, C2, C3, C4, C7, C8 y C9 hibridaron con todas las salmonelas en una banda de 2.3kb, con excepción de *S.arizonae*, que no hibridó con ninguno de los nueve oligos probados; ni con *E.coli*, que fue la cepa utilizada como control negativo (Fig. 7A,B; Tabla II). El oligo C5, no hibridó con, *S.arizonae*, *S.aberdeen* ni con *S.gallinarum* (Tabla II);

el oligo C6 no hibridó con las tres anteriores ni con *S.worthington*, *S.enteritidis*, (Fig. 7B, Tabla II).

3.- HIBRIDACION TIPO "SOUTHERN BLOT" CON EL FAGO VFC1

Los resultados obtenidos al hacer el análisis de la variabilidad del gene *ompC*, mediante el uso de PLFR y con la hibridación de oligonucleótidos cuyas secuencias se encuentran contenidas en dicho gene, nos mostraron que se encuentra conservado en el género *Salmonella*.

En vista de esto, se decidió comprobar si había variabilidad en el DNA de áreas aledañas al gene o si dichas áreas estarían también conservadas. Para ello se marcó radioactivamente el fago lambda VFC1 y se hizo hibridó contra el DNA de quince aislados de *Salmonella* cortados con *EcoRV* y con *BglII*, se encontró una banda de hibridación única en un fragmento de 3.3kb con *EcoRV* para *S.typhi* (Fig.8). Con *BglII* se encontró también una banda única para *S.typhi* de 1.7kb (Fig.9). Posteriormente, se digirió el DNA del fago VFC1 con *EcoRV* y con *BglII*. Con *EcoRV* aparecieron varias bandas de aproximadamente 3 a 3.5kb, lo cual no nos pudo ayudar a distinguir la banda que buscábamos.

En la digestión con *BglII*, encontramos bandas separadas, una de aproximadamente 3kb y otra de aproximadamente 1.7kb. Estos resultados nos sugerían que probablemente una de estas bandas o las dos pudieran hibridar sólo con *S.typhi*.

Por lo tanto, el siguiente paso fué digerir el DNA del fago VFC1 con

*Bgl*II. Se cortaron cada una de las bandas obtenidas de un gel preparativo (19.8 Kb, 3kb, 1.7kb), se purificaron se marcaron radioactivamente y se hibridaron contra el DNA de salmonelas cortado con *Eco*RV y se encontró que: con la banda de 3kb, no se presentó polimorfismo (Fig. 10); con la banda de 1.7 kb se presentó polimorfismo para la mayoría de las salmonelas (Fig.11); con la banda de 19.8kb del fago, como sonda, apareció nuevamente una banda única para *S.typhi* de 3.3kb (Fig.12).

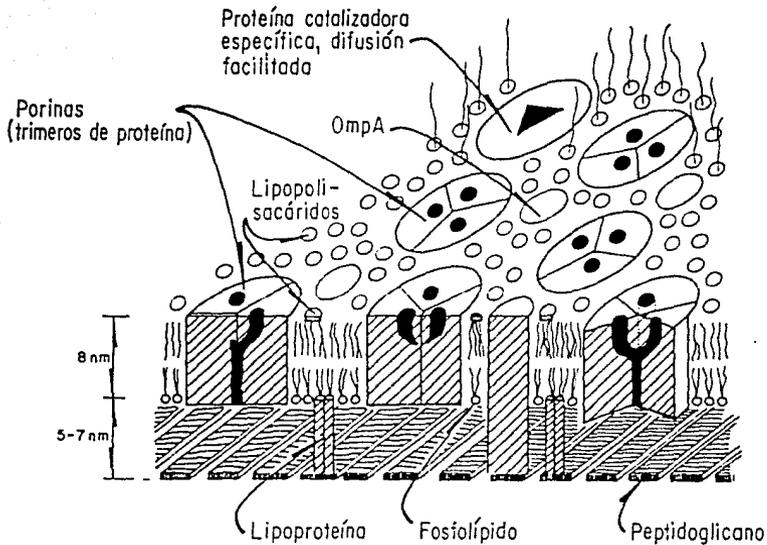


Fig. 1.- Modelo esquemático de la membrana externa de *E.coli* y *S.typhimurium*.

Esquema donde se muestran las porinas (trímeros de proteína) de la membrana externa, se observan los orificios separados que forman un canal único y se unen al final del otro lado de la membrana como un solo canal central.

TABLA II.- OLIGOS UTILIZADOS Y RESULTADOS DE LA HIBRIDACION.

SECUENCIA (5'--->3')	L	GC	Tm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C1 GACGACAAAGCCAGCGAC	18	61	58	+	+	±	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C2 CAGACTGAAGGCAGCAACGAC	21	57	66	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C3 GCGTGAAGCGGTGAAAACACC	20	60	64	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C4 CAATCGCGAAAGGCTTCTCTG	21	57	66	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C5 ACACCGCTAACCGCTGGCCTGTAT	23	56	82	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C6 GGTGGACGGGTTGCTGCCGTTAGAGGT	27	62	87	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
C7 CCCGTTGCTGATGTCCTT	18	55	56	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C8 CTGGTCGCCATAGCTGGCCG	20	70	68	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C9 CGCATCGCGGTAAAGTCGTTTTA	25	43	89	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

L= Longitud (nucleótidos) GC:% guanina + citocina; Tm = temperatura de disociación (50%).

1.- *S.typhi* Ty403

2.- *S.typhi* Ty404

3.- *S.arizonae*

4.- *S.worthington*

5.- *S.enteritidis*

6.- *S.anatum*

7.- *S.aberdeen*

8.- *S.typhi* Ty2

9.- *S.gallinarum*

10.- *E.coli*

11.- *S.typhi* IMSS-1

12.- *S.paratyphi*A

13.- *S.paratyphi*B

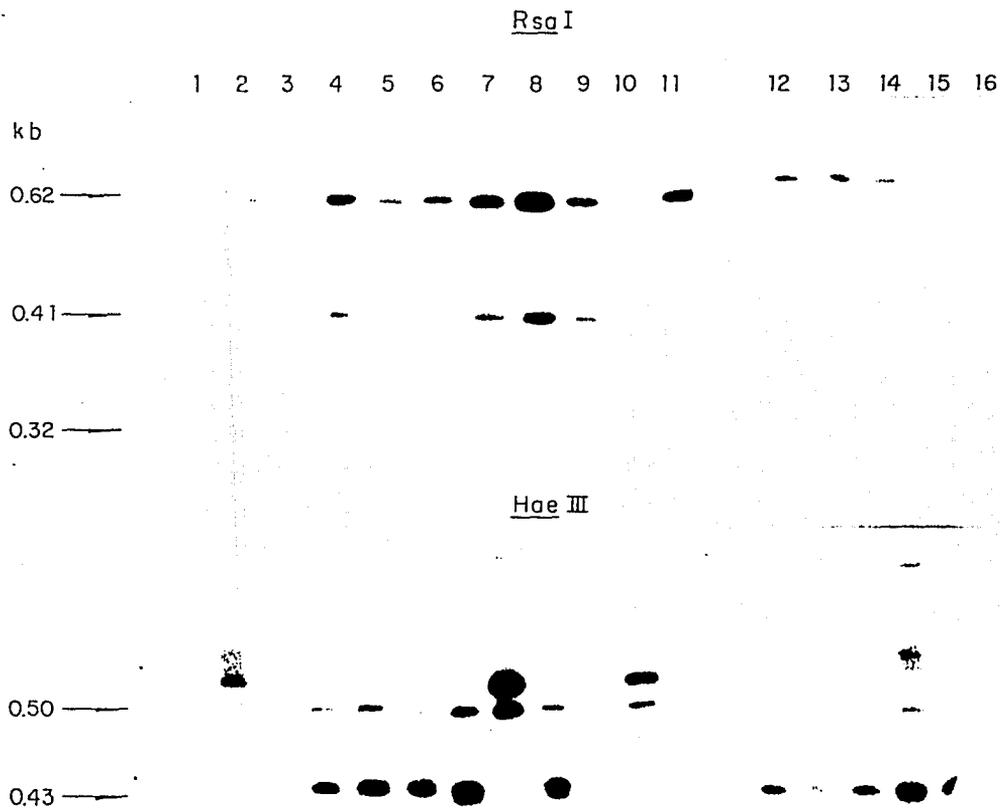
14.- *Salmonella* grupo B

15.- *S.manhattan*

16.- *S.typhimurium* SL937

Fig.4.- Hibridación del gene *ompC* de *S.typhi*, contra DNA de salmonelas.

Autorradiograma de la hibridación tipo Southern del gene radioactivo *ompC* de *S.typhi* contra DNA de salmonelas cortado con *RsaI* (A) ó *HaeIII* (B): 1.-*S.typhi* Ty403 2.-*S.typhi* Ty404 3.-*S.arizonae* 4.-*S.worthington* 5.-*S.enteritidis* 6.-*S.antum* 7.-*S.aberdeen* 8.-*S.typhi* Ty2 9.-*S.gallinarum* 10.-*E.coli* 11.-*S.typhi* IMSS-1 12.-*S.paratyphiA* 13.-*S.paratyphi* B 14.-*S.manhattan* 15.-*S.typhimurium* SL937.



A

B

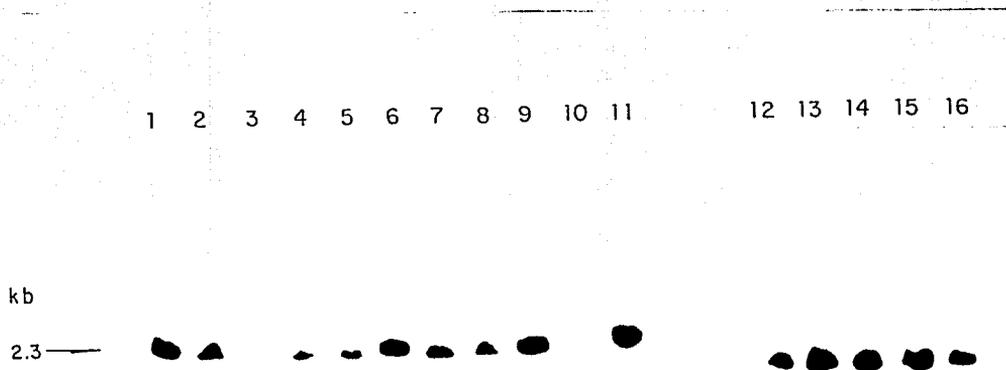


Fig.5.- Hibridación del gene *ompC* de *S.typhi* contra DNA salmonelas cortado con *EcoRV*.

Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con DNA de 1.-*S.typhi* Ty403 2.-*S.typhi* Ty404 3.-*S.arizonae* 4.- *S.worthington* 5.- *S.enteritidis* 6.- *S.antum* 7.-*S.aberdeen* 8.-*S.typhi* Ty2 9.-*S.gallinarum* 10.-*E.coli* 11.-*S.typhi* IMSS-1 12.-*S.paratyphi* A 13.-*S.paratyphi* B 14.-*S.manhattan* 15.- *S.typhimurium* SL937.

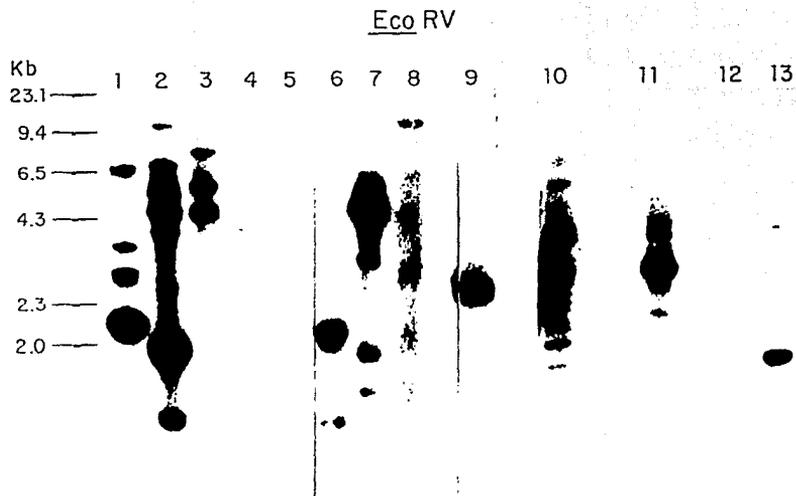


Fig.6.- Hibridación del gene *ompC* de *S.typhi*, contra DNA de diferentes enterobacterias, cortado con *EcoRV*.
 Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con DNA de : 1.-*E.cloacae* 2.-*E.aerogenes* 3.-*S.marcescens*
 4.-*P.mirabilis* 5.-*P.vulgaris* 6.-*K.oxytoca* 7.-*K.pneumoniae* 8.-*Kluyvera* sp. 9.-*S.typhi* 10.-*E.coli* 11.-*E.coli*
 12.-*Sh.fexnerii* 13.-*C.freundii*.

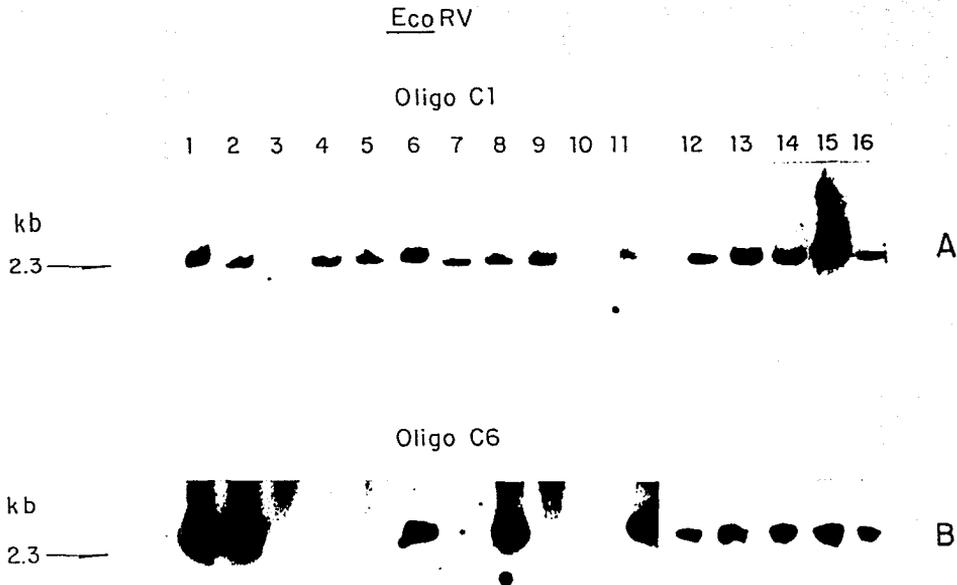


Fig.7.- Hibridación de oligos contra DNA de salmonelas cortado con *EcoRV*.

Autorradiograma de la hibridación tipo Southern del oligo C1(A) ó C6(B) contra DNA de salmonelas: 1.-*S.typhi* Ty403 2.-*S.typhi* Ty404 3.-*S.arizonae* 4.-*S.worthington* 5.-*S.enteritidis* 6.-*S.antum* 7.-*S.aberdeen* 8.-*S.typhi* Ty2 9.-*S.gallinarum* 10.-*E.coli* 11.-*S.typhi* IMSS-1 12.-*S.paratyphi*A 13.-*S.paratyphi*B 14.-*S.manhattan* 15.-*S.typhimurium* SL937.

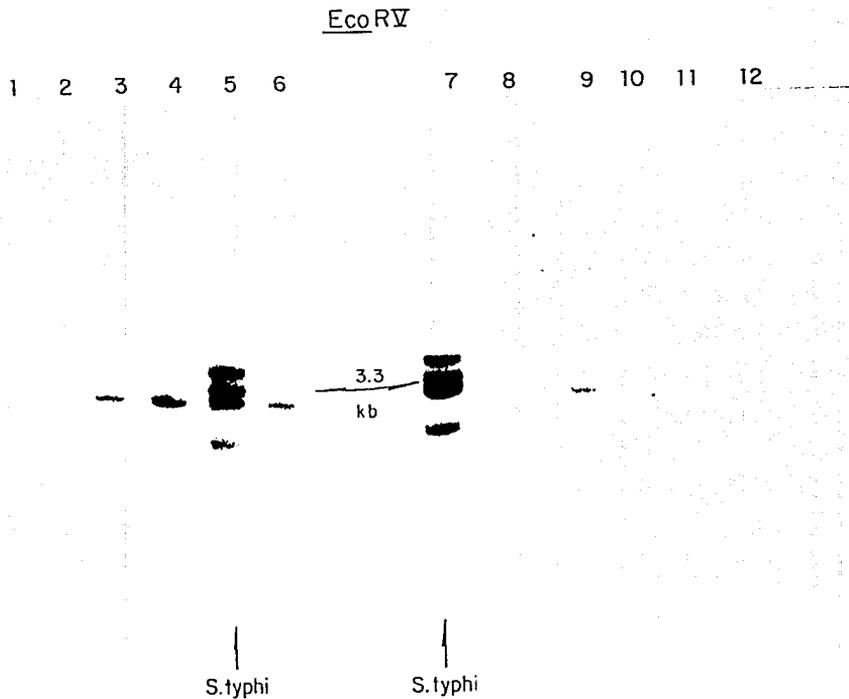


Fig.8.- Hibridación del DNA del fago lambda VFC1 contra DNA de salmonellas cortado con *EcoRV*.

Autorradiograma de la hibridación tipo Southern del DNA del fago lambda VFC1 con DNA de salmonelas:

1.-*S.worthington* 2.-*S.enteritidis* 3.-*S.anatum* 4.-*S.aberdeen* 5.-*S.typhi* Ty2 6.-*S.gallinarum* 7.-*S.typhi* IMSS-1
8.-*S.paratyphi* A 9.-*S.paratyphi* B 10.-*Salmonella* grupo B 11.-*S.manhattan* 12.-*S.typhimurium*.

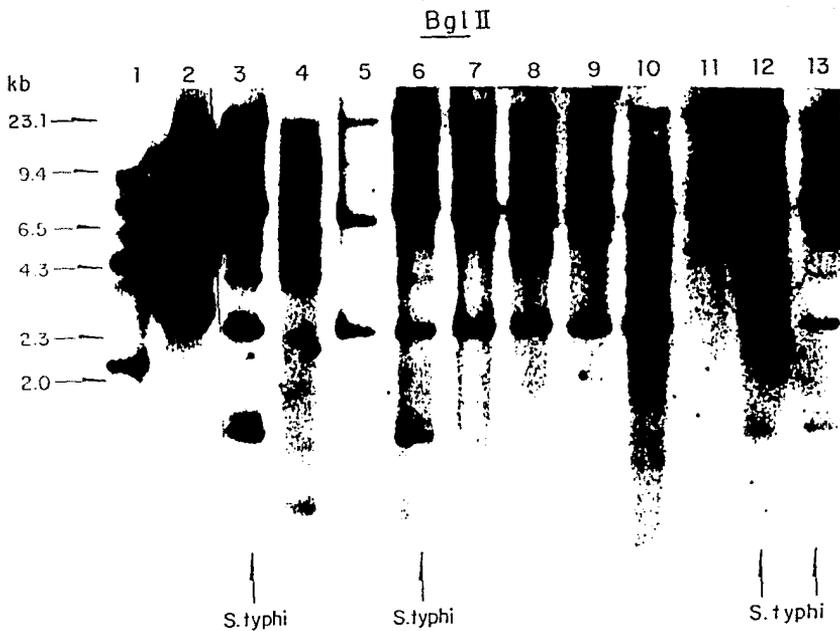
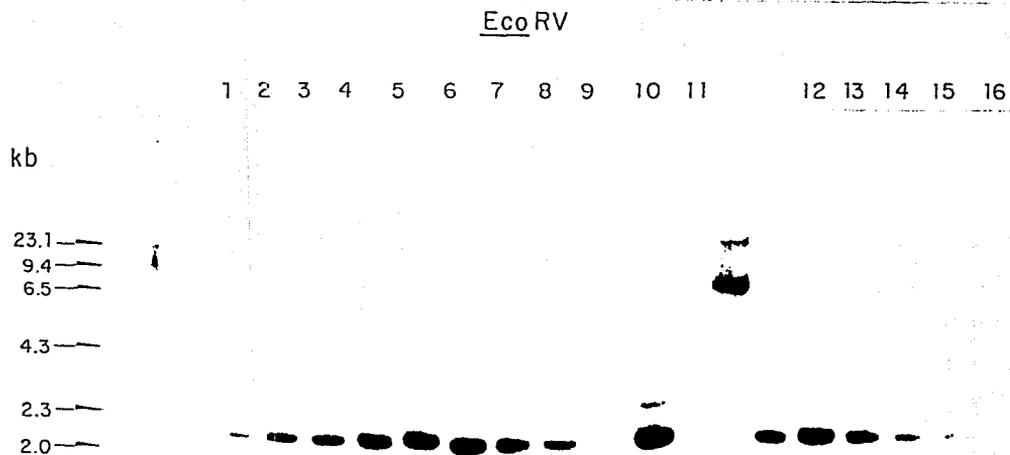


Fig.9.- Hibridación del DNA del fago lambda VFC1 contra DNA de salmonellas cortado con *Bgl*II.

Autorradiograma de la hibridación tipo Southern del DNA del fago lambda VFC1 con DNA de salmonelas:

- 1.-*S.paratyphi* A 2.-fago lambda *Hind* III 3.-*S.typhi* IMSS-1 4.-*E.coli* 5.-*S.gallinarum* 6.-*S.typhi* Ty2 7.-*S.aberdeen*
 8.-*S.anatum* 9.-*S.enteritidis* 10.-*S.worthington* 11.-*S.arizonae* 12.-*S.typhi* Ty404 13.-*S.typhi* Ty403.



42

Fig.10.- Hibridación del fragmento de *Bgl*I contra DNA de salmonelas cortado con *EcoRV*.

Autorradiograma de la hibridación tipo Southern del fragmento de 3kb obtenido de la digestión del fago lambda VFC1 contra DNA de salmonelas: 1.-*S.typhi* Ty403 2.-*S.typhi* Ty404 3.-*S.arizonae* 4.-*S.worthington* 5.-*S.enteritidis* 6.-*S.anatum* 7.-*S.aberdeen* 8.-*S.typhi* Ty2 9.-*S.gallinarum* 10.-*E.coli* 11.-*S.typhi* IMSS-1 12.-*S.paratyphi* A 13.-*S.paratyphi* B 14.-*Salmonella* grupo B 15.-*S.manhattan* 16.-*S.typhimurium* SL937.

Eco RV



43

Fig.11.- Hibridación del fragmento de *Bgl*II contra DNA de salmonelas cortado con *Eco*RV.

Autorradiograma de la hibridación tipo Southern del fragmento de 1.7kb obtenido de la digestión del DNA del fago lambda VFC1 contra DNA de salmonelas: 1.- Marcador lambda cortado con *Hind*III 2.-*S.typhi* Ty403 3.-*S.typhi* Ty404 4.-*S.arizonae* 5.-*S.worthington* 6.-*S.enteritidis* 7.-*S.anatum* 8.-*S.aberdeen* 9.-*S.typhi* Ty2 10.-*S.gallinarum* 11.-*E.coli* 12.-*S.typhi* IMSS-1 13.-*S.paratyphi* A 14.-*S.paratyphi* B 15.-*Salmonella* grupo B 16.-*S.manhattan* 17.-*S.typhimurium* SL937.

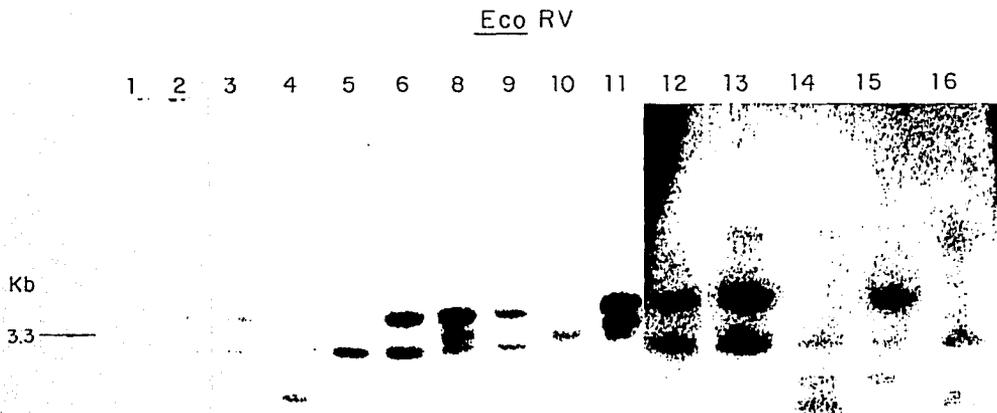


Fig.12.- Hibridación del fragmento de *Bgl*II contra DNA de salmonelas cortado con *Eco*RV.

Autorradiograma de la hibridación tipo Southern del fragmento de 19.8kb obtenido de la digestión del DNA del fago lambda VFC1 contra DNA de salmonelas: 1.-*S.typhi* Ty403 2.-*S.typhi* Ty404 3.-*S.arizonae* 4.-*S.worthington* 5.-*S.enteritidis* 6.-*S.anatum* 7.-*S.aberdeen* 8.-*S.typhi* Ty2 9.-*S.gallinarum* 10.-*E.coli* 11.-*S.typhi* IMSS-1 12.-*S.paratyphi* A 13.-*S.paratyphi* B 14.-*Salmonella* grupo B 15.-*S.manhattan* 16.-*S.typhimurium* SL937.

DISCUSION

1.- ANALISIS DE POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCION.

Se ha propuesto que algunos de los genes aislados de *S.typhi* puedan ser utilizados como sondas en el estudio de genética molecular de poblaciones, mediante el uso de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción. Esto probablemente nos podría permitir clasificar a las diferentes cepas de acuerdo a su origen geográfico, o bien, a los síntomas clínicos que inducen (Calva et al,1988).

El objetivo principal de este trabajo fué estudiar secuencias específicas de *S.typhi*, que nos permitieran obtener conocimientos básicos acerca de la estructura de esta bacteria y determinar la posibilidad de su aplicación como una sonda diagnóstica. Para ello, se utilizó el gene *ompC* de *S.typhi* como sonda para definir la variabilidad genética de diferentes especies de *Salmonella* mediante el uso de PLFR con diez enzimas elegidas de tal manera que cortaran el DNA genómico con una frecuencia promedio de 256 pb. Por los resultados obtenidos, pudimos constatar que dicho gene se encuentra conservado ya que no se observó PLRF con ninguna de las salmonelas probadas, con excepción de *S.arizonae* (datos no mostrados). Por ello, este gene, podría ser utilizado como un marcador genético en la identificación del género *Salmonella*.

Observamos que utilizando la enzima *HaellI* se obtiene un patrón único para *S.typhi* (Fig.4B); ésto nos proporciona un marcador adicional para diferenciar o corroborar los aislados clínicos de *S.typhi*, en un brote epidémico, digiriendo el DNA de las cepas que se quieren identificar con *HaellI* y utilizar como sonda el gene *ompC* de *S.typhi*.

Es importante señalar que *S.arizonae* no hibridó contra el gene *ompC* de *S.typhi*, lo que la hace diferente de todas las cepas probadas del género *Salmonella*. Ewing (1963) clasificó por pruebas bioquímicas a *Salmonella* y *Arizona* como dos géneros distintos, y propuso el nombre *Arizona hinshawi*. Después Crosa et al. (1973) demostraron, por estudios de reasociación de genoma a genoma, una similitud del 70-80% entre los genomas de *S.typhimurium* y *S.arizonae*. Posteriormente también con estudios de reasociación parecidos a los de Crosa (1973), se demostró similitud entre el 65-74% (Le minor et al., 1982).

Por estos mismos estudios se sabe también que *S.arizonae* presenta una gran diversidad antigénica. Se ha visto también que el cuadro clínico producido por *S.arizonae* es siempre una infección de tipo localizada, como resultado de la diseminación del microorganismo de sangre o de médula ósea. En el hombre, el 30% de los cultivos positivos para *S.arizonae*, han sido de sangre o de infecciones localizadas (Guckian et al., 1967). Cazali (1989), realizó un estudio retrospectivo de seis años en donde se encontraron diez casos de infección por *S.arizonae*. La infección currió predominantemente en pacientes inmunocomprometidos. El cuadro clínico fue bacteremia primaria

seguida de artritis séptica, en articulaciones previamente afectadas y de colecistitis con bacteremia secundaria.

Edwards y cols. (1959) sugieren que la alta incidencia de cultivos de *S.arizonae* obtenido de sangre y de infecciones localizadas comparadas con *Salmonella* puede ser atribuida a: 1o.- *S.arizonae* puede ser más invasiva que *Salmonella* en el hombre y 2o.- *S.arizonae* no se puede detectar en heces debido a que posee beta galactosidasa, con la posibilidad de fermentar la lactosa y confundirse con las bacterias fermentadoras que no son identificadas habitualmente.

Se han hecho diversos estudios con pruebas bioquímicas y de diversidad antigénica y se ha mostrado que todas las salmonelas presentan diversidad en ambas (Edwards y Ewing, 1986), por otro lado se sabe que hay diferencias en cuanto a la adaptación del hospedero. Sin embargo, cuando nosotros probamos aislados de diversos grupos antigénicos y diferentes especies por pruebas bioquímicas, encontramos que todas hibridan con el gene *ompC* de *S.typhi*. Así mismo, en un estudio (Galán et al., 1991) de la distribución de los genes *inv A, B, C* y *D* de *S.typhimurium* entre 91 aislados clínicos de diferentes serotipos de *Salmonella*, se mostró que todas, con excepción de *S.arizonae*, fueron capaces de penetrar en células Henle-407, más aún cuando se hizo hibridación tipo "Southern blot" de los 91 aislados, utilizando como sonda los genes *inv A, B, C* se mostró que éstos se encuentran conservados en el género *Salmonella*, en tanto que *S.arizonae* presentó un patrón de hibridación significativamente diferente, sugiriendo con

ésto que el operon *inv ABC* no es funcional en esta bacteria y por lo tanto su comportamiento no es como el de las demás salmonelas, cuando se probó como sonda el gene *inv D*, éste se encuentra también conservado en el género *Salmonella*, con excepción nuevamente de *S.arizonae* con el cual no hibridó.

Los resultados que obtuvimos y los datos de Galán (1991) nos apoyan para sugerir que *S.arizonae* filogenéticamente no debe incluirse en el género *Salmonella* como se ha postulado por estudios de reasociación elaborados por Crosa (1973).

Sin embargo, es necesario profundizar este estudio, ya que en este trabajo solo se probó un aislado de *S.arizonae*. Debido a ésto, será conveniente probar más aislados de *S.arizonae* y corroborar su comportamiento versus el gene *ompC*, y determinar si otros aislados pudieran presentar polimorfismo o si se comportan igual al aislado probado cuando se hibriden contra el gene *ompC*.

Además, independientemente de los resultados que se obtengan, sería importante que se aislara y caracterizara el gene *ompC* de *S.arizonae* con el cual se puede obtener conocimiento básico, taxonómico y de patogenicidad y compararlo contra el gene *ompC* de *S.typhi* para determinar sus diferencias y semejanzas.

2.-HIBRIDACION CON OLIGOS

Como ya se ha dicho anteriormente, es importante hacer la identificación del microorganismo en diversas áreas incluyendo investigación básica y aplicada. Las técnicas de hibridación de DNA podrían incrementar la rapidez y disminuir los métodos laboriosos de identificación de microorganismos, además se podría incrementar la precisión, porque el uso de marcadores genéticos de identificación es independiente de la expresión fenotípica de los microorganismos.

El principal objetivo del diagnóstico de las enfermedades infecciosas con sondas de DNA, es la detección e identificación temprana de un organismo patógeno directamente de una muestra clínica. Esto debe realizarse de forma rápida y específica para el cuidado y tratamiento del paciente.

El primer paso para desarrollar sondas de DNA es encontrar una pieza de DNA única y semejante a la del organismo que va a ser identificado.

Se ha mostrado que las PME de las enterobacterias tienen regiones hipervariables que se postulan están expuestas, las cuales podrían ser utilizados como sondas para la identificación de diversas especies de enterobacterias (Spierings, et al., 1989). Por otro lado, se ha propuesto la utilización de oligonucleótidos complementarios a regiones específicas del gene *ompC* de *Styphi* para la identificación de aislados clínicos de *Salmonella* (Calva et al., 1988).

En este trabajo se probaron nueve oligonucleótidos totalmente homólogos a la secuencia del gene *ompC* de *S.typhi* los cuales fueron

enumerados en forma consecutiva de C1 a C9 (Fig. 3), correspondiendo a regiones que codifican para aminoácidos que forman parte de epítopes probablemente expuestos (Fig.2). Nuestros resultados mostraron que todos los oligos hibridaron en una misma banda con todos los aislados de *Salmonella* probados, con excepción de los oligos C5 y C6.

El oligo C5, se encuentra en la región E de la proteína (Figs.2 y 3), entre los aminoácidos 203-210 la cual se ha postulado como expuesta en la membrana externa; el oligo C6 corresponde a la región F (Figs.2 y 3) entre los aminoácidos 247-255. Nosotros hubieramos esperado que este oligo fuera un buen candidato para probarlo como sonda género o especie específicos ya que este oligo corresponde a una región de *S.typhi* que no existe en *E.coli* (Fig. 3); sin embargo, es éste el que mostró mayor variabilidad entre las especies de *Salmonella*, lo cual podría indicar que es una inserción obtenida por el género *Salmonella* en forma evolutiva, pero que tiene cambios de uno o más aminoácidos en esta región. No sabemos si estos cambios pudieran determinar una característica diferente de la proteína, como por ejemplo servir de receptor para diferentes bacteriofagos o inclusive conferir la especificidad hacia el hospedero .

Los resultados obtenidos con los oligos, corroboraron los resultados obtenidos con el análisis de PLRF, demostrando que el gene *ompC* está conservado dentro del género *Salmonella*. Esto pudiera deberse a que las PME de las enterobacterias están en contacto con el medio ambiente, el cual probablemente ejerce presión selectiva para la conservación de la proteína a

través de la evolución.

En este trabajo se empezaron a probar parejas de oligos con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para determinar las condiciones de la reacción y poder probarlos en muestras clínicas. El sistema PCR, produce un enriquecimiento selectivo de una secuencia específica de DNA por un factor aproximado de 10^6 . La metodología requiere de dos oligos sintéticos que funcionen como iniciadores y que flanqueen una secuencia blanco, la cual es amplificada durante la reacción (Saiki et al., 1985; Saiki eta al., 1988). La reacción procede con ciclos repetidos de desnaturalización del DNA por calor (94°C), del apareamiento de los iniciadores a su secuencia complementaria (la cual varía dependiendo de la T_m del oligo) y de la extensión de los iniciadores apareados con DNA polimerasa (72°C).

Esta última es una enzima termoestable de *Thermus aquaticus*. De las combinaciones que se probaron los oligos C2 y C7 (datos no mostrados), son los que se podrían empezar a probar directamente en las muestras clínicas, ambientales y en control de calidad de alimentos.

Este tipo de estudios no se han realizado directamente en el laboratorio clínico, aunque ya se han probado algunas metodologías para la identificación de aislados de *Salmonella* en Perú e Indonesia (Rubin et al., 1988) y posteriormente en muestras de sangre, utilizando un método de concentración de células (DuPont Isolator) en filtros de nylon, el cual es colocado en un medio de cultivo e incubado toda la noche para la amplificación del microorganismo (Rubin et al., 1989). Seriwatana et al. (1987), y Tompkins y

Kradjen (1986) han mostrado que hay un incremento en la sensibilidad en los ensayos de hibridación para *E.coli* enterotoxigénica y *C.jejuni*, cuando se utiliza DNA purificado en lugar de colonias crecidas toda la noche en filtros de papel; además, con el DNA purificado se puede utilizar directamente y en conjunto con la PCR.

Se ha descrito un método de purificación de DNA de muestras de heces, el cual consiste en lisar la muestra con una solución de proteinasa K, urea, SDS, lauril sulfato de sodio y EDTA y luego pasarla por una columna extractora, la cual tiene propiedades de intercambio iónico y exclusión de peso molecular, junto con el uso de diferentes concentraciones de sal para unir, purificar y eluir DNA (Coll et al., 1989).

Nuestros oligos podrían ser utilizados con DNA de muestras de heces de pacientes a quienes se les sospeche tengan infección por *Salmonella*, se purifique DNA de la muestra con el método antes descrito y utilizar la PCR para amplificar la región de DNA que flanqueen estos oligos.

La sensibilidad de un ensayo adecuado se logra, acoplado al detector, una molécula que genere una señal fácilmente detectable (reportera). Las más comúnmente usadas son las moléculas orgánicas fluorescentes y los grupos fosfatos marcados radioactivamente. Estos últimos tienen algunas inconveniencias: su vida media es muy corta, el costo es elevado, se requiere de una área especial de trabajo, son peligrosos en su manejo y es problemática la disponibilidad de sus desechos. Hay formas de marcaje no radioactivas y su sensibilidad ha sido mejorada mediante la incorporación de

diferentes moléculas reporteras a los probadores, como el sistema avidina-biotina.

Después de que los detectores reconocen a sus blancos, se les une una enzima, como la fosfatasa alcalina, al que se le une un acoplador que es la avidina.

Otra forma de marcaje no radioactivo es medir la señal de quimioluminiscencia; este consiste en unir el oligo a un éster de acridina (esta es la sonda marcada) y se pone a hibridar en solución con el DNA de la muestra previamente desnaturalizada, la sonda marcada se une al DNA blanco y se mide la quimioluminiscencia, la cual será proporcional a la cantidad de DNA blanco unido a la sonda marcada (Engleberg, 1991).

3.- HIBRIDACION CON EL FAGO LAMDA VFC1

Como ya se mencionó anteriormente, se ha visto que se puede utilizar el gene *ompC* de *S.typhi* como un marcador epidemiológico para la identificación de aislados del género *Salmonella*. Asimismo, se pueden también utilizar secuencias específicas del gene como oligos, con un sistema de amplificación (PCR) y acoplarlo a una molécula señal para la detección de *Salmonella* en muestras clínicas, alimentos contaminados y muestras ambientales. Existen además otras formas de obtención de sondas para la detección de patógenos.

Las primeras sondas para identificar especies de *Salmonella* han sido

desarrolladas por Fitts (1985), en la detección de *Salmonella* en alimentos. Estas fueron obtenidas de un banco de genes de DNA cromosomal de *S. typhimurium*, clonadas en un plásmido vector. Se encontraron dos sondas que hibridaron con DNA de 330 cepas de *Salmonella*, que no hibridaron con otros organismos entéricos. Estas sondas han sido probadas en muestras de alimentos contaminadas con *Salmonella*, (Fitts, 1983) y han sido también probadas en muestras de heces y alimentos en un brote de salmonelosis (Harris et al., 1987). Estas sondas tuvieron los siguientes inconvenientes: fueron probadas con cultivos que necesitan mínimo de 18 horas de crecimiento y se han probado pocas muestras .

Se ha reportado una sonda para detectar *S.typhi* (Rubin et al., 1985) obtenida a partir de la clonación de la región del antígeno Vi que codifica para el locus *viaB* de *C.freundii*.

Sin embargo, se observó que esta sonda cruza con algunas cepas de *C.freundii* y de *Salmonella* sp. Esta sonda ha sido evaluada para identificar aislados de *S.typhi* de pacientes en Indonesia y Perú (Rubin et al., 1988), haciendo hibridación en colonia. Posteriormente fue utilizada en muestras de sangre de pacientes con fiebre, utilizando un método de concentración de células y amplificando con la incubación de las bacterias en filtros de nylon, durante toda la noche (Rubin et al., 1989). Esta sonda tiene el inconveniente de la incubación de la muestra para amplificar el número de bacterias y cruza con aislados de *C.freundii*, como se había visto antes.

Por otro lado, se han clonado secuencias al azar de DNA de *S.enteritidis*

en el cósmido vector pHC79. De los fragmentos contenidos se seleccionaron dos cósmidos y cada uno se probó como sonda con diferentes aislados de *Salmonella* de brotes epidemiológicos de distintos lugares geográficos. Estas sondas agruparon a los aislados en tres especies diferentes de *Salmonella* (Tompkins et al., 1986).

Se han descrito también sondas de DNA que reconocen RNA ribosomal. Los genes que codifican para RNA ribosomal son el material genético más conservado en el reino de las bacterias y con frecuencia se producen más de 10^9 copias por célula y, por lo tanto, es un excelente blanco para una sonda de DNA, debido a su alto número de copias que sirve como un sistema de amplificación in vivo. Este concepto ha sido explotado en el desarrollo de sondas diagnósticas para *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., algunas especies de micobacterias (Tenover, 1989) y bacterias gramnegativas (Barry et al., 1990).

En nuestro laboratorio se ha construido un banco de genes de *S.typhi* en el vector fago lambda 1059, del que se aisló un fago recombinante llamado lambda VFC1. En este fago se tiene clonado un fragmento de aproximadamente 15 kb, el cual porta el gene *ompC* de *S.typhi* (Puente et al., 1987).

Al hibridar este fago versus DNA de diferentes salmonelas encontramos un patrón único de bandas para todas las salmonelas, pero lo más importante fué que se identificó una banda única para *S.typhi*. Estos resultados preliminares mostraron que podríamos encontrar secuencias específicas para

S.typhi a partir de este banco.

En este trabajo sólo se llegó a determinar que dicha secuencia se encuentra pegada al brazo izquierdo del vector (ver resultados). Con esta pista se sigue trabajando sobre dicha región para obtener una secuencia específica de *S.typhi*, la cual se pueda secuenciar y caracterizar con el fin de obtener información básica acerca de esta bacteria, como pudiera ser la especificidad de huésped, patogenicidad e información sobre procesos de inmunidad, etc. Por otra parte, se podría contar con una sonda específica para el diagnóstico temprano de la FT y, una vez conocida la secuencia, se podrían diseñar oligos para ser utilizados con sistemas de amplificación de señales, como PCR o con la Qbeta replicasa, los cuales se aplicarían a muestras clínicas acoplados a un sistema de detección no radioactivo.

XII.- CONCLUSIONES:

- El gene *ompC* de *S.typhi* se encuentra muy conservado entre el género *Salmonella*.
- La enzima *HaeIII*, genera un patrón de restricción único para *S.typhi*, con todas las demás enzimas utilizadas, no se generó PLFR.
- *Salmonella arizonae* presentó diferencias significativas con respecto a las otras salmonelas, ya que no hibridó con ninguno de los oligos, y presentó polimorfismo con todas las enzimas probadas. Estos resultados sugieren que *S.arizonae* debe ser considerada como un género aparte de *Salmonella*.
- Las secuencias que corresponden a los oligos C5 y C6 no están conservadas para todas las salmonelas probadas.
- Algunos de los oligos probados en este trabajo, podrían ser utilizados para la detección de *Salmonella*.
- La hibridación con el fago lambda VFC1 mostró una banda única para *S.typhi*

APENDICE

Selected Papers from the
First Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever

TYPHOID FEVER

Strategies for the 90's

Kuala Lumpur, Malaysia

October 1 - 3, 1991

edited by
T. Pang, C. L. Koh and S. D. Puthucherry

World Scientific

GENETIC VARIATION OF THE *Salmonella ompC* GENE; A STUDY ON OmpC TOPOLOGY

JOSÉ LUIS PUENTE, MIRIAM BOBADILLA, CARLOS ARIAS AND EDMUNDO CALVA

Department of Molecular Biology
Instituto de Biotecnología, UNAM
Apdo. Postal 510-3; Cuernavaca, Mor. 62271, MEXICO
Fax (52) (73) 17-2388

ABSTRACT

Radioactive oligodeoxynucleotides, complementary to the nucleotide (nt) portions that code for variable regions between *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC proteins, were hybridized against Southern blots of genomic DNA from 15 strains of *Salmonella*. These comprised 12 different species and included *S. typhi* Ty2, IMSS-1 (a Mexican reference strain), Ty-403 and Ty-404 (from Indonesia). An oligo corresponding to variable region g did not hybridize to *ompC* from *S. worthington* (group G), *S. gallinarum* (group B), *S. enteritidis* (group D), and *S. aberdeen* (group F). Similarly, an oligo from region f did not hybridize with *ompC* from the latter three strains.

Site-directed mutagenesis of a hydrophilic variable region was performed in order to produce a gene coding for a chimeric OmpC protein with a 22 amino acid (aa) insert between residues 160 and 161 of the native protein. The insert contains an 18 aa sequence corresponding to a rotavirus capsid VP4 protein neutralizing epitope. The chimeric OmpCRV160 was expressed and assembled within the outer membrane.

By oligodeoxynucleotide hybridization it is possible to obtain some information about the genetic variability of the *Salmonella ompC* gene, and site-directed mutagenesis can be used to better understand the topology of the *S. typhi* OmpC protein.

1. Introduction

We have previously reported the cloning of the *S. typhi ompC* gene¹. This gene codes for a major outer membrane protein (OMP) and consists of an open reading frame of 1134 nt, corresponding to a protein of 378 aa; with a 21-aa signal peptide. This protein is 11 aa longer than *E. coli* OmpC, but it has an identical leader peptide. The mature OmpC sequence shows 79% similarity for both bacteria at the aa level, and 77% similarity at the nt level. Seven main variable regions in the OmpC protein were identified. Five of them correspond to hydrophilic regions and contain aa observed most frequently in turn configurations in soluble proteins. This suggests that these aa stretches could be located on the exterior of the outer membrane².

S. typhi ompC gene expression is not influenced by medium osmolarity in the same manner as *ompC* in *E. coli*. The OmpC protein is highly expressed when *S. typhi* is grown in nutrient broth (NB) of low (NB + 0% sucrose) or high (NB + 20% sucrose) osmolarity³. This contrasts with the expression of *E. coli* OmpC, which is clearly inhibited in low osmolarity and enhanced in high osmolarity, as has been described previously^{4,5}. Nevertheless, expression of *S. typhi* OmpC is dependent on the *E. coli* OmpR transcriptional activator. These findings suggest differences between the mechanisms of osmoregulation of gene expression in both bacteria, although common effectors appear to be shared³.

2. Genetic variability of the *Salmonella ompC* gene

The entire *S. typhi ompC* structural gene hybridizes to a 2.1 kilobase pair (kb) *EcoRV* fragment in the DNA of all the *Salmonella* strains tested (see Table I); with the exception of *S. arizonae*, which presents a polymorphic pattern, aside of a less intense hybridization signal. This result suggests that *ompC* is, in general, well conserved between salmonellas.

As mentioned above, the comparison of the nucleotide and deduced aa sequences of *S. typhi* and *E. coli* OmpC, revealed the presence of variable regions that, in most of the cases, correspond to hydrophilic putatively exposed regions (Fig. 1). To determine if these regions are also variable between different species or serotypes of the *Salmonella* genus (Table I), nine different oligodeoxynucleotides, corresponding to the coding sequences of these regions in the *S. typhi ompC* gene (Fig. 1), were synthesized.

Table I.- *Salmonella* species used in this study

<i>S. arizonae</i>
<i>S. worthington</i> (group G)
<i>S. enteritidis</i> (group D)
<i>S. anatum</i> (group E)
<i>S. aberdeen</i> (group F)
<i>S. gallinarum</i> (group B)
<i>S. paratyphi</i> A
<i>S. paratyphi</i> B
<i>S. manhattan</i> (group C)
<i>S. typhimurium</i> (group B)
<i>S. sp</i> (group B)
<i>S. typhi</i> Ty403 and Ty404 (from Indonesia)
<i>S. typhi</i> Ty2 (ATCC reference strain)
<i>S. typhi</i> IMSS-1 (reference strain from Mexico)

3. A study on *S. typhi* OmpC topology

In order to define the localization of putative hydrophilic exposed regions of the OmpC protein, we are using the following molecular approach. It is based on the use of site-directed mutagenesis techniques, to insert the sequence that codes for an 18 aa heterologous reporter epitope from the VP4 rotavirus capsid protein, in defined coding regions of the *S. typhi ompC* gene. This peptide comprises aa 296 to 313 from the VP4 protein and is recognized by the monoclonal antibody YO-2C2, which is capable of neutralizing the whole virus *in vitro*⁹.

The first selected site to carry out the insertion described above is located between aa 160 and 161, which are included in a putative hydrophilic region². Different studies on the *E. coli* porins lead to the suggestion that this region in *S. typhi* OmpC has a high probability of being exposed outside the bacterial cell and to be permissive for the insertion of heterologous sequences. Punctual mutations in this region in *E. coli* OmpC affect the phage receptor function but not the pore function⁶. Also, in *E. coli* this region contains 6 aa more with respect to *S. typhi* OmpC; furthermore, it contains 14 and 15 more aa with respect to *E. coli* OmpF and PhoE, respectively⁵. Recently, in a study where *E. coli* OmpF antigenic epitopes were defined, it was found that the 160-161 equivalent region in OmpF is recognized by monoclonal antibodies even in whole cells⁷, suggesting that it could be facing the cell exterior.

After site-directed mutagenesis of this region, the chimeric protein was expressed in *E. coli*. The molecular and immunological characteristics of the fusion protein was determined by PAGE of OMP preparations and by an ELISA with a rotavirus-specific monoclonal antibody, YO-2C2, reacting against OMP preparations and whole *E. coli* cells carrying the chimeric protein gene. The level of expression of the hybrid protein was normal and the protein was incorporated into the outer membrane. The VP4-epitope appeared to be exposed at the cell surface since intact cells were recognized by the monoclonal antibody specific for rotavirus. The results obtained strongly indicate that variable region c is indeed exposed in wild-type OmpC, and that it can be useful for the insertion and presentation of heterologous epitopes (Puente *et al.*, in preparation).

4. Conclusion

The analysis of *ompC* genetic variability in *Salmonella* showed, by hybridization experiments with oligodeoxynucleotides, that the gene is, in general, conserved between different species of *Salmonella*. Nevertheless, the sequences corresponding to regions e and f are not conserved in the *Salmonella* tested. All the enzymes used so far did not generate restriction fragment length polymorphism in *ompC*. Interestingly, the exception was *S. arizonae*, which did not hybridize with all the oligos used and presents restriction fragment length polymorphism for all the enzymes tested. These results suggest that *S. arizonae* might be considered a genus apart from the *Salmonella*, as has been shown with other techniques.

Genomic DNA of the strains listed in Table I was digested with *EcoRV* restriction endonuclease and subjected to agarose gel electrophoresis. After transfer to a nitrocellulose membrane, the resulting Southern blot was hybridized to either of the nine ³²P-radiolabelled oligos, as described before².

All the oligos hybridized with the 2.1 kb band of the salmonellas tested; with the exception of oligos corresponding to variable region g that did not hybridize to *ompC* from *S. worthington* (group G), *S. gallinarum* (group B), *S. enteritidis* (group D), and *S. aberdeen* (group F) and variable region f that did not hybridize with *ompC* from the latter three strains (Fig.1). None of the nine oligos hybridized with *S. arizonae* DNA.

Restriction fragment length polymorphism, for several restriction enzymes tested so far, was detected only in *S. arizonae* when the entire structural gene was used as probe.

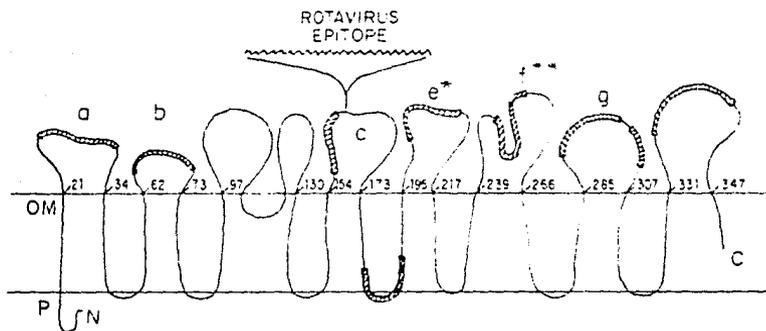


Fig.1.- Schematic representation of the *S. typhi* OmpC structure. The model is based on different data obtained by the analysis of *E. coli* OmpC, OmpF and PhoE mutants and the use of polyclonal and monoclonal antibodies against these proteins, reported elsewhere^{6,7}. The definition of outer membrane spanning segments and putative exposed regions, was done with respect to a structural analysis reported before² and a general porin protein alignment published recently⁸. Shaded bars represent the peptide region corresponding to each oligo used in this work and the insert shows the rotavirus heterologous epitope inserted in one chimeric OmpC protein described herein. OM (outer membrane), P (periplasm).

Aside of the possible relevance of OmpC conservation to the biology of *Salmonella*, this work shows that some nucleotide sequences of the *S. typhi* *ompC* gene could be used for detection of *Salmonella* in general; say by establishing a nucleic acid amplification scheme with the polymerase chain reaction.

The OmpC variable regions are being altered by the insertion of an antigenic determinant of rotavirus, in order to define the topology of the protein. For the case reported here, it appears that region c is exposed at the cell surface.

The methodology described might not only allow the obtention of a better knowledge about OmpC structure and function, but also could be useful in the design of live vaccines using this protein as carrier of heterologous epitopes, as has been shown for other outer membrane proteins^{10,11}.

5. Acknowledgements

We thank Miriam Ortiz for excellent technical assistance. The research of E. Calva was supported in part by grants No. 89088-66 from the Rockefeller Foundation (USA), No. IN204191 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM, Mexico), and by an International Research Scholar Award from the Howard Hughes Medical Institute (USA), No. 75191-527102.

6. References

1. J.L. Puente, V. Flores, M. Fernández, Y. Fuchs and E. Calva, *Gene* **61** (1987) 75-83.
2. J.L. Puente, V. Alvarez-Scherer, G. Gosset and E. Calva, *Gene* **83** (1989) 197-206.
3. J.L. Puente, A. Verdugo-Rodríguez and E. Calva, *Mol. Microbiol.* **5** (1991) 1205-1210.
4. C. Verhoef, B. Lugtenberg, R. van Boxtel, P. de Graaff, and H. Verheij, *Mol Gen Genet* **169** (1979) 137-146.
5. H. Kawaji, T. Mizuno, and S. Mizushima, *J. Bacteriol* **140** (1979) 843-847.
6. R. Misra and S.A. Benson, *J. Bacteriol* **170** (1988) 3611-3617.
7. P.E. Klebba *et al*, *J Biol Chem* **265** (1990) 6800-6810.
8. D. Jeanteur, J.H. Lakey and F. Pattus, *Mol. Microbiol.* **5** (1991) 2153-2164.
9. K. Taniguchi *et al*, *J Virol* **62** (1988) 2421-2426.
10. A. Charbit, A. Molla, W. Saurin, and M. Hofnung, *Gene* **70** (1988) 181-189.
11. M. Agterberg *et al*, *Gene* **88** (1990) 37-45.

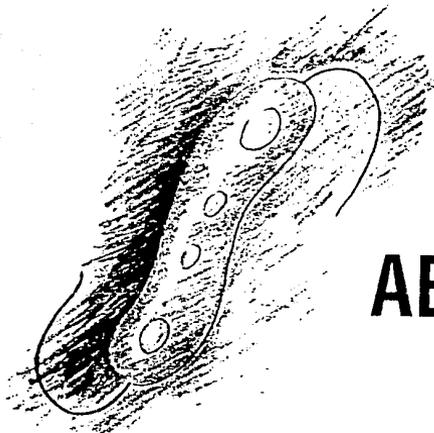
American Society for Microbiology

92nd General Meeting

26-30 May 1992

New Orleans, Louisiana

H. Calva



ABSTRACTS



D-252 Induction in the Intracellular Environment of *Salmonella typhimurium* Genes that Respond to low Fe^{2+} or Mg^{2+} .
 FRANCISCO GARCIA DEL MONTE^{1,2}, JOHN W. POSTER¹, MICHAEL E. MANGUIRE¹ AND H. BRITTY FINLAY¹. ¹ Univ. of British Columbia, Vancouver, B.C. Canada; ² Univ. of South Alabama, Mobile, AL, USA; and ³ Case Western Reserve Univ., Cleveland, OH, USA.

S. typhimurium can be classified as a facultative intracellular bacterium by its ability to survive in some macrophages and invade and multiply in gut cells.

Our current interest is to characterize which are the conditions which permit *Salmonella* to multiply inside a vacuole after invading cultured epithelial cells. Several *S. typhimurium* genes have been described that respond to environmental changes, such as low Fe^{2+} or low Mg^{2+} . We have used such reporter genes in some of these genes previously transduced in a *S. typhimurium* virulent strain to detect their expression in the vacuole in which bacteria multiply after invading Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells.

The most explosive results obtained with genes that respond to few parameters reflect that the *bsx* gene, which is induced at low Fe^{2+} , shows a high level when bacteria are in the vacuole, even if high concentrations of free Fe^{2+} are added to the extracellular medium. Another gene, *mgpB*, described as induced mainly by low Mg^{2+} , is also expressed at high levels in the intracellular stage. These results experiments did not show a correlation between the expression of these two genes during the bacterial multiplication phase, suggesting that Fe^{2+} and Mg^{2+} are present at low concentrations after internalization and during intracellular replication.

D-253 Genetic Variants of the *Salmonella typhi* ompC gene: a study on OmpC topology. J.L. PUENTE, M. BOGARDILLA, C. AMIAS, and E. CALVA. Instituto de Biología, UNAM, Ciudad de México, México. The *Salmonella typhi* *ompC* gene codes for OmpC, a major outer membrane protein (OMP). Variants with respect to their extracellular part, gene is mainly circumscribed in seven regions. Nine radioactive oligonucleotides corresponding to these regions were hybridized against Southern Blot of genomic DNA from 14 strains of *Salmonella*. These comprised 12 different genotypes and included *S. typhi* T2 (MS8) (the Mexican reference strain), Ty-43 and Ty-406 (from Indonesia). The *ompC* corresponding to variable region 4 did not hybridize with any of the oligonucleotides. A major outer group B, *S. enteritidis* (group D) and *S. enteritidis* group F. The oligo from region 4 did not hybridize with *ompC* from the latter three strains. No variation was observed in the other regions nor when the whole gene was used as probe. Restriction fragment length polymorphism was detected only in *S. enteritidis*; furthermore, no oligo hybridized with *S. enteritidis* DNA and hybridization with the whole gene was less intense than with other variables.

Site-directed mutagenesis of the hypervariable region 4 resulted in a gene that codes for a protein OmpC₄ with a 22 amino acid insertion containing a roviavirus capsid NPA-recognizing epitope. The chemical protein is expressed in *E. coli* and assembled within the outer membrane; the roviavirus epitope conserves its antigenic structure and is exposed on the cell surface. This was determined by PAGE of OMP preparations and by an ELISA with a roviavirus monoclonal antibody reacting against OMP preparations and whole *E. coli* cells. Region 4 epitopes can be expressed in whole OmpC and it might be useful for the isolation and preservation of heterologous epitopes.

D-254 Characterization of the *Salmonella typhi* *hlyA* gene of Havana (Hav), serotype B, M/M, VENA, BSAK and J/M, B/5582.
 Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C. 20315-6100.

The *hlyA* gene of *Salmonella typhi* serotype B (strain M907) encodes a major immunogen of the *hly* defined with consilient human and monkey antisera. The *hlyA* gene complement in *S. typhi* B comprises five copies of the allele on the plasmid pOmp1, and five copies on the chromosome. Further, the *hlyA* gene complement in *S. typhi* B includes two loci, corresponding to *hlyA* B and *hlyA* C, are tandemly linked and located adjacent to the *hlyA* B gene cluster. Southern analysis of *hlyA* B digested *S. typhi* B chromosomal DNA hybridized with oligonucleotide probes derived from the *hlyA* B sequence, indicated that a conserved region of the plasmid-borne *hlyA* B gene sequence was deleted in the *hlyA* B chromosomal copies of the gene. However, studies using copies of the variable amino-terminal and amino-terminal ends were not detected in any of the chromosomal copies. A form of *hlyA* B was obtained from a pan-*Salmonella* library of a *hlyA* B clone *S. typhi* B, termed *hlyA* B, that has the chromosomal copies of *hlyA* B and *hlyA* C as well as a copy of the *hlyA* B gene on the *S. typhi* B chromosome. DNA sequences ranging either end of the pWR100 plasmid and *hlyA* B gene were found to hybridize multiple bands on Southern Blot analysis of invasion plasmid and chromosomal DNA from several *Salmonella* species. Since the banding pattern of these "linking repeats" was distinct from that observed in the *hlyA* B gene, we have sequenced these genes are most likely embedded with sequences that are themselves related. Sequence analysis of the *S. typhi* B chromosomal *hlyA* B copies and characterization of the "linking repeats" is being pursued to clarify the molecular arrangement of these determinants in *S. typhi* B.

D-255 Characterization of invasion plasmid antigens (IpaD and VirG) of *Shigella flexneri* with antisera produced against synthetic peptides. E. N. OLAN¹, K. H. TAYLOR¹, H. OLAN¹, J. MCKEY¹, and J. BAYNE². Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C.

Several plasmid encoded proteins of *Shigella flexneri* have been characterized as both major antigens and enteric components of the invasion process. The further characterization of these proteins (VirG and IpaD), antisera were made against synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of these proteins. Peptides of length exposed to the *Shigella* surface were recognized by antisera against IpaD peptides 257-270 and 269-270 but not against VirG peptides 202-215. It was not possible to demonstrate IpaD in purified outer membranes of *S. flexneri* with any of the antisera. Antisera against VirG peptides were also reactive with the surface of invasive shigellae. One VirG antiserum also reacted with a smaller size VirG peptide (VirG₂) of about 15 kDa. This protein was found in the outer membrane and was extractable with water. Interestingly, *Shigella* strains (G311 or G106) made only VirG₂. These strains were able to invade tissue culture cells and form plaques in tissue culture membranes, but were not able to induce keratoconjunctivitis in guinea pigs. Furthermore, VirG₂ was temperature regulated and under the control of *virE*, while the larger form of VirG (120 kDa) was not temperature regulated. The region of VirG₂ that is conserved in the processing of a large precursor but instead may be a result of transcriptional or translational regulation.

D-256 Adherence Parameters Associated with *Vibrio vulnificus*. E.D. TALL, R.L. MURPHY, M.L. TAMPLIN, A.B. GAYLE, P.D. SINGER, and D.B. SHAH. FDA, Washington, DC, and Univ. of FL, Gainesville, FL.

Vibrio vulnificus, an estuarine bacterium, is an opportunistic pathogen that causes systemic septicemia and necrotic fasciitis in humans. The mechanisms of adherence are ill-defined. We investigated a possible association of hemagglutination, Hela adherence, and hydrophobic characteristics among strains isolated from environmental and clinical sources. The results showed that the strains, independent of source, had similar hemagglutinating activity. Sixty of 83 strains tested were strongly hydrophobic, and that there was no difference observed with respect to adherence to Hela cells among the strains. Eleven isogenic opaque (capsule⁻) and translucent (capsule⁺) phase variant pairs, independent of source, were further evaluated for any correlation with the above parameters. The results showed a trend toward hydrophobicity (hemagglutination and Hela adherence) for isogenic translucent strains versus isogenic opaque strains. These results correlate with the hypothesis that the translucent opaque phase variation observed in *V. vulnificus* is a virulence enhancement mechanism and suggest that isolate source is independent of hydrophobicity, hemagglutination, and Hela adherence.

D-257 Molecular Analysis of Tandem Multiple Gene Encoding S-100 Membrane Proteins in *Pasteurella haemolytica*. G.L. MURPHY, L.C. WHITWORTH, and A. W. CONFER. Oklahoma State University, College of Veterinary Medicine, Stillwater, OK 74076.

Pasteurella haemolytica A1 is the organism most frequently associated with the severe fibrinous pneumonia characteristic of bovine shipping fever. A number of outer membrane proteins, including a 30 kDa protein, may be important in eliciting immunity to *P. haemolytica* infections. To better understand the nature of the S-100 antigen we determined the DNA sequence of a previously cloned gene encoding this protein. This analysis indicated that two distinct genes, capable of encoding ~30 kDa proteins, are tandemly arranged on the *P. haemolytica* A1 chromosome. A portion of a third, similar gene, adjacent to these, has also been sequenced. Hybridization analyses with Northern Blots of *P. haemolytica* RNA, revealed the presence of five transcripts (5.4 kb, 1.8 kb, and 2.7 kb) that hybridize to a probe spanning the three open reading frames. Southern analyses with Southern Blots indicated that at least one other chromosomal locus also hybridizes with this probe. Immunoblots with anti-30 kDa polyclonal sera, demonstrated that at least one of the genes encodes a 30 kDa protein, which is associated with both fresh and soluble inner membrane-enriched and Sarkosyl-insoluble inner membrane-enriched cellular fractions of *P. haemolytica* A1. The deduced amino acid sequences of the proteins encoded by these genes are similar to a 25 kDa outer membrane protein which contributes to the virulence of *Hemophilus influenzae* type B strains.

- D-204 Production of an Extracellular Serine Protease by *Streptococcus difficile*
 VESSELLA and J. P. SPEFFY, The University of Rhode Island, U.S.A.

An extracellular serine protease of *Streptococcus difficile* has been identified in the supernatant of cultures grown in tryptone yeast glucose (TYG) broth. Protease was present after only 6 h growth in TYG, but was not detected until after 16 h in brain heart infusion (BHI) broth. Proteolytic activity was demonstrated using: azocoll, hide blue, azocasein, and p-toluene sulfonyl-L-arginine methyl ester. The protease has tryptin-like activity, indicated by sensitivity to certain inhibitors. Activity was inhibited 90% by phenyl methyl sulfonyl fluoride, 75% by cysteine and 50% by soybean trypsin inhibitor. Optimal pH for activity was 7.8 and optimal temperature was 37°C. The molecular weight of the protease was over 100 kDa, with apparent substrate of 34 kDa. The serine protease degraded the synthetic activity of superantigen of *S. difficile*. The addition of deoxyribose to the medium allowed for an increase in serine protease production in TYG cultures and inhibition of serine protease production in BHI cultures.

- D-205 Restriction Endonuclease Analysis of Chromosomal DNAs from *Campylobacter* and *Helicobacter* Species
 W.R. EDWARDS*, K. M. HARTLINE and P. EDMONDS, School of Biology, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia

We digested chromosomal DNAs from sixteen *Campylobacter* strains (*C. jejuni*, 4; *C. fetus*, 4; *C. hominis*, 4) and from four *Helicobacter* strains (*H. pylori*, 2; and *H. mustelae*, 2) with the following restriction endonucleases: HhaIII, SfiI, BamHI, DpnI, MspI, and SmaIA. Restriction fragments were then separated by electrophoresis in 1% agarose or 20% polyacrylamide gels. DNAs from six strains tested were digested efficiently with BamHI, HpaIII, SfiI. In some instances restriction patterns among strains within a species were different. Both *Campylobacter* and *Helicobacter* strains exhibited considerable variability among restriction patterns obtained with DpnI, MspI, and SmaIA. Only DNA from one *Helicobacter* strain in this study appeared to be partially digested with DpnI, suggesting the presence of methylated adenine at GATC sequences. We used MspI and SmaIA to confirm the presence of unmethylated GATC sequences in these DNAs. Additional experiments are in progress to determine if chromosomal DNAs from *Campylobacter* and *Helicobacter* strains contain methylated cytosines.

- D-206 Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using the polymerase chain reaction. B. A. OYOFO*, S. A. THORNTON, D. H. BURR, T. J. TRUST, O. PAVLOVSKIS and P. GERRY, Naval Med. Res. Inst., Bethesda, MD and Dept. Biochem. and Microbiol., Univ. of Victoria, Victoria, B.C., Canada.

C. jejuni and *C. coli* are among the most frequently isolated causative agents of bacterial diarrhea worldwide. Clinical isolation of these fastidious microaerophilic organisms requires special growth conditions, and is often problematic. We evaluated the use of the flagellin gene of *Campylobacter* as a target gene for a diagnostic assay using the polymerase chain reaction (PCR). An oligonucleotide primer pair derived from a conserved region of the *flaA* gene of *C. coli* VC167 was used. The assay generated the appropriate size PCR product using DNAs from 12 strains of *C. coli* and 47 strains of *C. jejuni*, but was negative with strains of *C. fetus*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. croticocoli*, *C. faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Waldobryella reeta*, *Eteherchia coli*, *Shigella* sp., *Vibrio cholerae*, *Citrobacter freundii*, and *Aeromonas* sp. The assay was capable of detecting 6500 fg of VC167 DNA, as determined by agarose gel analysis. The PCR assay was tested on fecal swabs of rabbits experimentally infected with *C. coli*. PCR products were dot blotted and probed with a non-radioactively labelled probe internal to the primer pair. Flagellin specific PCR product was detected in 15/15 infected rabbits, and in 0/15 uninfected animals. These results indicate that the assay is sensitive and specific for *C. jejuni* and *C. coli* and is applicable to direct testing of fecal samples.

- D-207 Characterization of Two Novel DNA *Campylobacter jejuni* Phages

E. CALVA, A. BUSTAMANTE, M. ELKANDEZ, M. BOBADILLA, L. SANCHEZ, J.L. PUENTE, Instituto de Biología, UNAM, Cuernavaca, Mex., Mexico

We have isolated recombinant plasmids pCJ19 and pCJ20 containing specific *C. jejuni* DNA fragments of 2.1 and 2.2 kb respectively. The fragments in pCJ19 hybridize specifically with DNA from *C. jejuni* the fragments in pCJ20 hybridize specifically with DNA from *C. coli* and *C. coli*. This was determined by hybridization experiments using DNA from several *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. fetus* reference strains as well as from more than twenty other enteropathogens likely to be isolated with *Campylobacter*, such as *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, enteropathogenic and enteropathogenic *Escherichia coli*, various *Salmonella* strains, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* among others.

The pCJ20 fragment hybridized with DNA from twenty nine *Campylobacter* field isolates from children with asymptomatic and diarrhea-associated infections. Twenty of these hybridized also with pCJ19, suggesting that they are *C. jejuni*. These isolates were further characterized by genomic DNA DNA hybridization, which allowed evaluation of probe specificity.

Experiments in *E. coli* models showed that the pCJ20 fragment codes for several proteins with apparent molecular weights ranging from 56 to 62 kDa. Whether these are degradation products of one protein or are different proteins translated from overlapping genes is a matter of current investigation. The *in situ* pCJ20 is not expressed in *E. coli*. Stability of both pCJ19 and pCJ20 is improved by propagating in *E. coli* BMH 71-1F mut., instead of in *E. coli* HB101.

- D-208 Molecular cloning of a RecA-like gene from *Campylobacter*
 P. POPE*, S. JOSEPH, and P. GERRY, Naval Med. Res. Inst., Bethesda, MD and Dept. Microbiol., Univ. of Md., College Park, MD

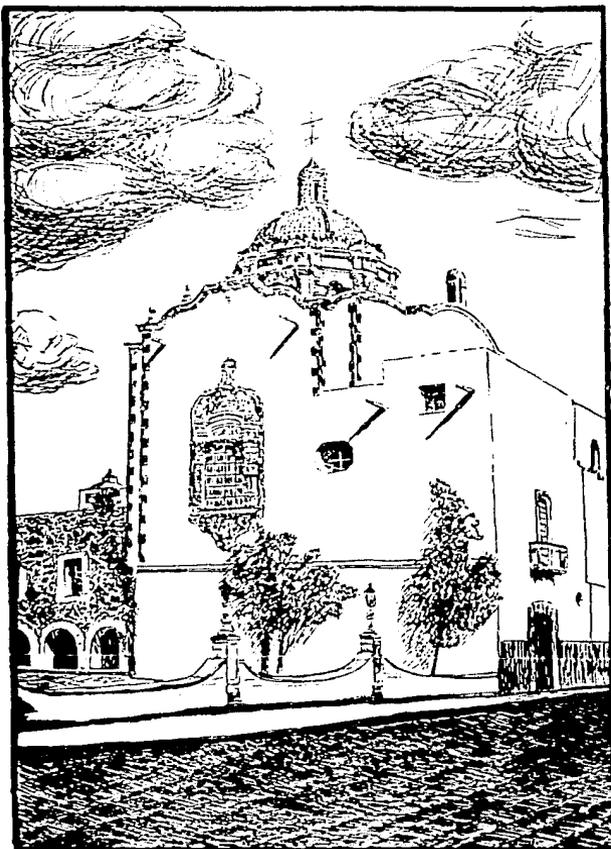
Although the thermophilic *Campylobacter* are important causes of bacterial diarrhea worldwide, little is known about their molecular biology. Cloning of enzymes involved in generalized recombination in *Campylobacter* would aid isolation of recombinational mutants towards useful for molecular cloning and basic studies. Proteins analogous to the RecA protein of *Escherichia coli* have been cloned from a variety of bacteria by complementation of *E. coli* recA mutations, or by DNA homology to the cloned *E. coli* RecA gene. Attempts to complement *E. coli* DHS recA with libraries of *C. coli* VC167 DNA have been unsuccessful. Moreover, we have been unable to demonstrate DNA sequence homology between *Campylobacter* DNA and protein consisting of cloned *E. coli* RecA genes from *C. coli*, *Legionella pneumophila*, *Rhizobium meliloti*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, or *Hemophilus influenzae*. Nonetheless, we have identified a UV inducible 38,000 Mr protein in *C. coli* which crossreacts with anti-RecA antibodies, suggesting that *Campylobacter* have a functional RecA analog. Synthetic oligonucleotides encoding highly conserved regions of RecA proteins were used as primers in a polymerase chain reaction with *C. coli* DNA as template. DNA sequence analysis of the cloned product revealed an open reading frame with greater than 50% sequence identity with the corresponding portion of the RecA protein of *E. coli*. This PCR product has been used as a probe to clone the *in situ* gene from *Campylobacter*.

- D-209 Transformation and Plasmid Vector Construction in *Helicobacter pylori*. Y. WANG* and D. E. TAYLOR, Univ. of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

Little information is available concerning the genetics of *Helicobacter pylori*, now recognized as a major factor in the development of gastritis and ulcer disease in man. Therefore, we have developed a simple procedure for natural transformation in *H. pylori*. Nine out of ten strains tested were naturally competent for DNA uptake, including *H. pylori* UA872 for which a genetic map has been constructed using *Neor* and *Vec1*. Transformation frequencies for both streptomycin and rifampicin resistance markers were approximately 10^3 transformants per viable cell. The *Campylobacter coli* *gcsA* gene was inserted into a *H. pylori* cryptic plasmid pUA724 by transformation into *H. pylori* UA724 (pUA724) to construct pUA26. The chloramphenicol-resistant transformants of *H. pylori* contained both plasmids pUA724 and pUA26 even after several subcultures. The plasmid pUA26 was separated from pUA724 by electroransformation into plasmid-free *H. pylori* UA872. The pUA26 plasmid DNA was purified from this new host. These techniques should be useful for development of genetic strategies for *H. pylori* including the construction of *Escherichia coli* to *H. pylori* shuttle vectors.



SOCIEDAD MEXICANA DE
BIOQUIMICA, A. C.



Capilla de San Jorge. 1840

1840 M. J. J. J. J.

XVIII CONGRESO NACIONAL

11 a 16 de NOVIEMBRE de 1990

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

PROGRAMME
AND
ABSTRACTS

First Asia-Pacific Symposium
on Typhoid Fever

Edited by
D. G. Brown and S. M. Shreeve
University of Alberta

1987, 1988

GENETIC VARIATION OF THE *SALMONELLA OMPC* GENE: USE OF OMPC AS CARRIER OF HETEROLOGOUS EPITOPES.

J. L. Puente, M. Bobadilla, C. Arias, and E. Calva

Ctr. Res. Genetic Eng. & Biotechnology, UNAM: Apdo. Postal
510-3; Cuernavaca, Mor. 62271, MEXICO. Fax (52) (73) 172388

The *Salmonella typhi ompC* gene codes for a major outer membrane protein (OMP). OmpC, whose expression is not influenced by medium osmolarity in the same manner as *ompC* in *E. coli*. Thus, so far, under laboratory conditions this OMP is expressed constitutively. *S. typhi ompC* shares a 77% and a 79% amino acid (aa) and nucleotide (nt) sequence similarity with *E. coli ompC*. Variation between both genes is mainly circumscribed to seven regions, ranging in size from 4 to 18 aa. Six of these regions are hydrophylic and thus might be exposed. Nine radioactive oligonucleotides, complementary to the nt portions that code for these variable regions, were hybridized against Southern blots of genomic DNA from 15 strains of *Salmonella*. These comprised 12 different species and included *S. typhi* Ty2, IMSS-1 (a Mexican reference strain), Ty-403 and Ty-404 (from Indonesia). An oligo corresponding to variable region 6 did not hybridize to *ompC* from *S. worthington* (group G), *S. gallinarum* (group B), *S. enteritidis* (group D), and *S. aberdeen* (group F). Similarly, an oligo from region 5 did not hybridize with *ompC* from the latter three strains. No variation was observed in the other regions nor when the whole gene was used as probe. Restriction fragment length polymorphism was detected only in *S. arizonae*; furthermore, no oligos hybridized with *S. arizonae* DNA and hybridization with the whole gene was less intense than with other salmonellae.

A 100mer oligonucleotide was used for site-directed mutagenesis of hydrophylic variable region 3, resulting in a gene that codes for a chimeric OmpC, with a 22 aa insert between aa 160 and 161. The insert contains an 18 aa sequence corresponding to a rotavirus capsid VP4 neutralizing epitope. The chimeric protein is expressed in *E. coli* and assembled within the outer membrane; the rotavirus epitope conserves its antigenic structure and is exposed on the cell surface. This was determined by PAGE of OMP preparations and by an ELISA with a rotavirus-specific monoclonal antibody reacting against OMP preparations and whole *E. coli* cells. This result strongly indicates that variable region 3 is indeed exposed in wild-type OmpC, and that it can be useful for the insertion and presentation of heterologous epitopes.

The research of E. Calva was supported in part by an International Research Scholar Award from the Howard Hughes Medical Institute (USA).

Volume 7, Special Issue

October 1991

MICROBIAL ECOLOGY IN HEALTH AND DISEASE

THE VIth INTERNATIONAL WORKSHOP ON
CAMPYLOBACTER HELICOBACTER AND
RELATED ORGANISMS

ISSN 0891-060X

MEHD E6 4(S) S1-S210 (1991)



WILEY

Publishers Since 1807

CHICHESTER · NEW YORK · BRISBANE · TORONTO · SINGAPORE

C8-15

**COMPARATIVE STUDY OF TWO DNA PROBES SPECIFIC FOR
CAMPYLOBACTER.**

E. Calva, V. Bustamante, M. Fernández, M. Bobadilla, L. Sánchez*,
and J. L. Puentes

Cr. Res. Genetic Eng. & Biotechnology, UNAM: Apdo. Postal
510-3: Cuernavaca, Mor. 62271. MEXICO. Fax (52) (73) 172388

Two recombinant plasmids, pCj19 and pCj20, harboring *C. jejuni* DNA *Hind*III fragments of 2.1 and 2.2 kilobasepairs, respectively, were isolated from a random genomic library, constructed in pBR322.

pCj19 contains a DNA insert specific for *C. jejuni*, whereas the insert in pCj20 is specific for *C. jejuni* and *C. coli*. This was determined by hybridization experiments with DNA from various *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis*, and *C. fetus* reference strains, as well as from more than twenty other enteropathogens likely to be co-isolated with *Campylobacter*, such as *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli*, various *Salmonella* strains, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*, among others.

pCj20 hybridized with DNA from twenty-nine thermophilic *Campylobacter* field strains, isolated from children with diarrhea. Twenty of these hybridized with pCj19, indicating that they are *C. jejuni*. In order to validate the specificity of the probes, outer membrane protein, restriction fragment length polymorphism, and genomic DNA-DNA hybridization profiles are being correlated with the probe data.

pCj20 is unstable in *E. coli* HB101; its propagation is stabilized upon transformation into *E. coli* BMH 71-18 *mutL*. pCj19 is stable in both *E. coli* strains.

Experiments in *E. coli* minicells showed that the insert in pCj20 codes for several proteins with an apparent molecular weight of 36, 38, 50, 60, and 62 kDa. Whether these are degradation products of one protein, or are different proteins translated from overlapping genes, is a matter of current investigation. The insert in pCj19 does not appear to be expressed in *E. coli*.

*Stanford Univ. Regional Center, San Cristóbal de las Casas, Chis. Mexico.

BIBLIOGRAFIA

- ALTWEGG, M., HICKMAN-BRENNER, W. y FARMER, J.J.III (1989). Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. J. INFECT. DIS. 160:145-149.
- AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SEIDMAN, J., SMITH, J., STRUHL, K. Eds. (1990). *En: Currents Protocols in Molecular Biology*. Vol.I. JOHN WILEY & SONS, INC. N.Y.
- BARRY, T., POWELL, R., GANNON, F., (1990). A general method to generate DNA probes for microorganisms. BIOTECHNOLOGY. 8:233-236.
- BELTRAN, P., MUSSER, J., HELMUTH, R., FARMER, J.J.III, FRERICHS, W., WACHSMUTH, I., FERRIS, K., MACWHORTER, A., WELLS, J., CRAVIOTO, A., y SELANDER, R. (1988). Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: Genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 85:7753-7757.
- BERGEY, D.H., BREED, R.S., MURRAY, E.G., y HITCHENS, A.P. Eds. (1984). *En: Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.I. WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE.
- BETLACH, M.C., HERSHFIELD, V., CHOW, L., BROWN, W., GOODMAN, H.M. y BOYER, H.W. (1976). A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *Eco* RI restriction modification of DNA. FED. PROC. 35:2037-2043.
- BOLETIN MENSUAL. EPIDEMIOLOGIA (1991). DIRECCION GENERAL DE EPIDEMIOLOGIA . SISTEMA NACIONAL DE SALUD. MEXICO.
- CALDERON, I., LOBOS, R., y MORA, G. (1984). The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty 2 porins. J. BIOCHEM. 141:579-583.
- CALDERON, I., LOBOS, S.R., ROJAS, H.A., PALOMINO, C., RODRIGUEZ, L.H., y MORA, G.C. (1986). Antibodies to porin antigens of *S.typhi* induced during typhoid infection in humans. INFECT. IMMUN. 52:209-212.
- CALVA, E., PUENTE, J.L., y CALVA, J.J. (1988). Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. BIO. ESSAYS 9:173-177.

- CAMPOS, J., GARCIA-TORNAL, S., MUSSEY, J.M., SELANDER, R.K., y SMITH, A.L. (1983). Molecular epidemiology of multiply resistant *Haemophilus influenzae* type b in day care centers. J. INFECT. DIS. 156:483-489.
- CAZALI, I., SIFUENTES, J., SOTO, L., PONCE DE LEON, S., CALVA, J.J. RUIZ-PALACIOS, G. (1989). Infecciones por *Salmonella arizonae*. XIV CONGRESO INTERNACIONAL DE INFECTOLOGIA.
- COLL, P., PHILLIPS, K., y TENOVER, F. (1989). Evaluation of a rapid method of extracting DNA from stool samples for use in hibridization assays. J. CLIN. MICROBIOL. 27:2245-2248.
- COOVADIA, Y.M., SINGH, V., BHANA, R.H., MOODLEY, N. (1986). Comparasion of passive haemagglutination test with widal agglutination test for serological diagnosis of typhoid fever in an endemic area. J. CLIN. PATHOL. 37:680-683.
- CROSA, J.H., BRENNER, D.J., EWING, W.H. y FALKOW, S. (1973). Molecular relationships among the Salmonelleae. J. BACTERIOL. 115:307-315.
- EDELMAN, R., y LEVINE, M.M. (1986). Summary of an international workshop on typhoid fever. REV. INFECT. DIS. 8:329-349.
- EDELSTEIN, P.H., NAKAHAMA, C., TOBIN, J.O., CALARKO, K., BEER, K.B., JOLY, J.R., y SELANDER, R.K. (1986). Paleoepidemiologic investigation of Legionnaires disease at Wadsworth Veterans administration hospital by using three typing methods for comparasion of Legionellae from clinical and environmental sources. J. CLIN. MICROBIOL. 23:1121-1126.
- EDWARDS, P.R., FIFE, M.A., y RAMSEY, C.H. (1959). Studies on the Arizona group of enterobacteriaceae. BACTERIOL. REV. 23:155-174.
- ENGEL, A., MASSALSKI, A., SCHINDLER, H., DORSET, D.L. y ROSENBUSCH, J.P. (1985). Porin channel triplets merge into single outlets in *Escherichia coli* outer membranes. NATURE 317:643-645.
- ENGBERG, N. (1991). Nucleic acid probe tests for clinical diagnosis- where do we stand? Initial excitement and secondary disappointment are giving way to a realistic sense of their value. FEATURES 57:183-186.
- EWING, W.H., (1963). An outline of nomenclature for the family *Enterobacteriaceae*. INT. BULL. BACT. NOMENCL. 13:95-110.

- EWING, W.H., (1986). *En: Eduard's and Ewing's identification of enterobacteriaceae*. 4th.ed. ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING CO. INC., N.Y.
- FINLAY, B.B., y FALKOW, S. (1989). *Salmonella* as an intracellular parasite. MOLECULAR MICROBIOL. 3:1833-1841.
- FIRST ASIA-PACIFIC SYMPOSIUM ON THIPPOID FEVER (1992). Programme and Abstracts. University of Malaya.
- FITTS, R., (1985). Development of a DNA-DNA hybridization test for the presence of *Salmonella* in foods. FOOD. TECHNOL. 39:95-103.
- FITTS, R., DIAMOND, M., HAMILTON, C., y NERI, M. (1983). DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 46:1146-1151.
- GALAN, J. y CURTISS, R. III (1991). Distribution of the *invA*, *B*, *C*, and *D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA*, mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. INFECT. IMMUN. 59:2901-2908.
- GALDIERO, F., TUFANO, M.A., GALDIERO, M., MASIELLO, S. y DI ROSA, M. (1990). Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. INFECT. IMMUN. 58: 3283-3186.
- GERMANIER, R. (1984). En bacterial vaccines, pp. 136-165. Ed. R. Germanier. ACADEMIC PRESS INC., New York.
- GROISMAN, E. y SAIER, M.H.Jr. (1990). *Salmonella* virulence: New clues to intramacrophage survival. TIBS 15:30-33.
- GUCKIAN, J., BYERS, E., y PERRY, J., (1967). *Arizona* infection of man. ARCH. INTERN. MED. 119:170-175.
- GUINEE, P.A.M., JANSEN, W.H., MAAS, H.M.E., LE MINOR, L. y BEAUD, R. (1981). An unusual H antigen (z₆₆) in strains of *Salmonella typhi*. ANN. MICROBIOL. 132A:331-334.
- HANCOCK, R.(1991). Bacterial outer membranes: envolving concepts. FEATURES 57:175-182.

- HARRIS, J., MAKER, S., BICCHIERE, R., GEORGE, H., PRINZ, H., y KLINGER, J. (1987). Evaluation of a nucleic acid hybridization assay during two foodborne *Salmonella* outbreaks. ABSTR. ANNU.MEET.AM. SOC.MICROBIOL. C-319.
- HOFFMAN, S.L., PUNJABI, N.H., ROCKHILL, R.C. (1984). Duodenal string-capsule culture compared with bone marrow, blood and rectal-swab cultures for diagnosing typhoid and paratyphoid fever. J. INFECT. DIS. 149:157-161.
- HOOK, E., (1990). *Salmonella* species (including typhoid fever). 1700-1716. *En: Mandell/Douglas/Bennett, Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 3rd.ed. Vol.I. CHURCHILL LIVING STONE INC., N.Y.*
- HORNICK, R.B., GREISMAN, S.E., WOODWARD, T.E., DUPONT, H.L., DAWKINS, A.T. y SNYDER, J. 1970. Typhoid fever: Pathogenesis and immunologic control. NEW ENG. J. MED. 283:686-691.
- ISIBASI, A., ORTIZ, V., VARGAS, M., PANIAGUA, J., GONZALEZ, C., MORENO, J., y KUMATE, J. (1988). Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane protein isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. INFECT. IMMUN. 56:2953-2959.
- JEANTEUR, D., LAKEY, J., y PATTUS, F. (1991). The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. MOLECULAR MICROBIOLOGY 5:2153-2164.
- KELLY, M.T., BUCK, G.E., y FOJTASEK, M.F. (1983). Evaluation of a lysis-centrifugation and biphasic blood culture system during routine use. J. CLIN. MICROBIOL. 18:554-557.
- LE MINOR, L., VERON, M., POPOFF, M., (1982). Taxonomie des *Salmonella*. ANN. MICROBIOL. 133B:223-243.
- LEVINE, M., GRADOS, O., GILMAN, R., WOODWARD, W., SOLIS-PLAZA, R., y WALDMAN, W. (1978). Diagnostic value of the Widal test in areas endemic for typhoid fever. AM. J. TROP. MED. HYG. 27:905-800.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E., y SAMBROOK, J. (1989) *En: Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. COLD SPRING HARBOR, NY.*
- MATSUI, K., y ARAI, T. (1991). Specificity of protective immunity induced by porin from *Salmonella typhimurium*. MICROBIOLOGICA 14: 103-112.

- MIZUNO, T., CHOU, M., e INOUE, M. (1983). A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. J. BIOL. CHEM. 256:6932-6940.
- MOUREAU, P., DERCLAYE, I., GREGOIRE, D., JANSSEN, M., y CORNELIS, G.R. (1989). *Campylobacter* species identification based on polymorphism of DNA encoding rRNA. J. CLIN. MICROBIOL. 27:1514-1517.
- NAKAE, T., (1986). Outer-membrane permeability of bacteria. CRC. CRIT. REV. MICROBIOL. 13:1-62.
- NIKAIDO, H., y VAARA, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. MICROBIOL. REV. 49:1-32.
- NIKAIDO, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. MOLECULAR MICROBIOLOGY 6:435-442.
- NOLAN, CH.M., FEELEY, J., WHITE, P., HAMBIE, E., BROWN, S. y WONG, K. (1980). Evaluation of a new assay for Vi antibody in chronic carriers of *Salmonella typhi*. J. CLIN. MICROBIOL. 12:22-26.
- PANG, T., CALVA, E., PUNJABI, N., ROWLEY, D. (1992). Typhoid fever: Strategies for the 90's. Report from the first Asia-Pacific Symposium on typhoid fever. (Artículo sometido a publicación).
- 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:75-83.
- PUENTE, J.L., ALVAREZ-SCHERER, V., GOSSET, G. y CALVA, E. (1989). Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. GENE 83:197-206.
- PUENTE, J.L., VERDUGO-RODRIGUEZ, A., y CALVA, E. (1991). Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* *OmpC* is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* *OmpR*. MOLECULAR MICROBIOLOGY 5:1205-1210.
- REEVES, M., EVINS, G., HEIBA, A., PLIKAYTIS, B., y FARMER, J.J.III (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis. J. CLIN. MICROBIOL. 27:313-320.

- ROMANIUK, P.J., y TRUST, T.J. (1987). identification of *Campylobacter* species by Southern hybridization of genomic DNA using an oligonucleotide probe for 16S rRNA genes. FEMS MICROBIOL. LETT. 43:331-335.
- RUBIN, F., KOPECKO, D., NOON, K., y BARON, S., (1985). Development of a DNA probe to detect *Salmonella typhi*. J. CLIN. MICROBIOL. 22:600-605.
- RUBIN, F., KOPECKO, R.B., SUDARMONO, S., YI, A., MAURTA, D., MEZA, R., MOECHTAR, M.A., EDMAN, D.C., y HOFFMAN, S.L. (1988). Evaluation of a DNA probe for identifying *Salmonella typhi* in Peruvian and Indonesian bacterial isolates. J. INFECT. DIS. 157:1051-1053.
- RUBIN, F., MCWHIRTER, P., PUNJABI, N., LANE, E., SUDARMONO, P., PULUNGSIH, S., LESMANA, M., KUMALA, S., KOPECKO, D. y HOFFMAN, S. (1989). Use of a DNA probe to detect *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever. J. CLIN. MICROBIOL. 27:1112-1114.
- RUIZ, J., SEMPERE, M.A., VARELA, M.C. y GOMEZ, J. (1992). Modification of the methodology of stool culture for *Salmonella* detection. J. CLIN. MICROBIOL. 30:525-526.
- SADALLAH, F., BRIGHOUSE, G., DEL GIUDICE, G., DRAGER-DAYAL, R., HOCINE, M., LAMBERT, P.H., (1990). Production of specific monoclonal antibodies to *Salmonella typhi* flagellin and possible application to immunodiagnosis of typhoid fever. J. INFECT. DIS. 161:59-64.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S.J., FALLONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., y ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. SCIENCE 230:1350-1353.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. SCIENCE 239:487-491.
- SELANDER, R.K., MACKINNEY, R.M., WHITTAM, T.S., BIBB, F., BRENNER, D.J., NOLTE, F.S., y PATTISON, P.E. (1985). Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. J. BACTERIOL. 163:1021-1037.

- SELANDER, R.K., PATTISON, y CAUGNANT, D.A. (1986). Genetic relationships and clonal structure of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. *INFECT. IMMUN.* 52:213-222.
- SELANDER, R.K., CAUGANT, A., OCHMAN, H., MUSSER, J.M., GILMOUR, M.N., y WHITTAM, T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 51:873-884.
- SELANDER, R., CAUGANT, D., y WHITTAM, T. (1987). *En: E.coli and Salmonella typhimurium* cellular and Molecular Biology. Ed. Ingraham, J.L. et al. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Washington, D.C. 1625-1648.
- SELANDER, R., BELTRAN, P., SMITH, N., BARKER, R., CRICHTON, P., OLD, D., MUSSER, J., y WHITTAM, T. (1990). Genetic population structure, clonal phylogeny, and pathogenicity of *Salmonella paratyphi* B. *INFECT. IMMUN.* 58:1891-1901.
- SELANDER, R., BELTRAN, P., SMITH, N., HELMUTH, R., RUBIN, F., KOPECKO, D., FERRIS, K., TALL, B., CRAVIOTO, A., y MUSSER, J. (1990). Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars. Thats cause human typhoid and other enteric fevers. *INFECT. IMMUN.* 58:2262-2275.
- SERIWATANA, J., ECHEVERRIA, P., TAYLOR, D.N., SAKULDAIPEARA, T., CHANGSCHAWALIT, S., y CHIVORATANOND, O. (1987). Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* with syntetic alkaline phosphatase-conjugated oligonucleotide DNA probes. *J. CLIN. MICROBIOL.* 25.1 438-1441.
- SIBLEY, CH., y AHLQUIST, J.E. (1984). The phylogeny of the hominoid primates, as indicated by DNA/DNA Hibridization. *J. MOL. EVOL.* 20:2-15.
- SPIERINGS, G., HOFSTRA, H., VELD, J., HOEKSTRA, W. y TOMMASSEN, J. (1989). Development of Enterobacterium specific oligonucleotide probes based on the surface exposed regions of outer membrane proteins. *APPL. ENVIRO. MICROBIOL.* 55:3250-3252.
- STULL, T.L., LIPUMA, J.J., y EDLIND, T.D. (1988). A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J. INFECT. DIS.* 157:280-286.

- TENOVER, R.C. (1988). Diagnostic deoxy-ribonucleic acid probes for infectious diseases. CLIN. MICROBIOL. REV. 1:82-101.
- TENOVER, C. (1989). *En*:DNA probes infectious diseases 53-63. CRC PRESS INC., N.Y.
- TOMPKINS, L.S., y KRAJDEN, M. (1986). Approaches to the detection of enteric pathogens, including *Campylobacter*, using nucleic acid hybridization. DIAG. MICROBIOL. INFECT. DIS. 4:71S-78S.
- TOMPKINS, L., y TROUP, N. (1986). Cloned, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. J. INFECT. DIS. 154:156-162.
- TOMPKINS, L.S., TROUP, N.J., WOODS, T., BIBB, W., y MCKINNEY, R.M., (1987). Molecular epidemiology of *Legionella* species by restriction endonuclease and alloenzyme analysis. J. CLIN. MICROBIOL. 25:1875-1880.
- JDHAYAKAMAR, V y MUTHUKKARUPPAN, V. (1987). An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed-type hypersensitivity in murine salmonellosis. INFECT. IMMUN. 55:822-824.
- JDHAYAKUMAR, V. y MUTHUKKARUPPAN, V. (1987). Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. INFECT. IMMUN. 55:816-821.
- VERDUGO-RODRIGUEZ, A., LOPEZ-VIDAL, Y., PUENTE, J.L. RUIZ-PALACIOS, G., y CALVA, E. (1992). Early diagnosis of typhoid fever by detection of serum antibodies against *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. (Artículo sometido a publicación).
- WASHINGTON, J.A., II (1986). Blood cultures: issues and controversies. REV. INFECT. DIS. 8:792-802.
- WEISS, M., WACKER, T., WECKESSER, J., WELTE, W., y SCHULZ, G. (1990). The three-dimensional structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3Å resolution. EUR.J. BIOCHEM. 267:268-272.
- WILSON, M., WEINSTEIN, M., REIMER, L., STANLEY, M. y RELLER, B. (1992). Controlled comparison of the BacT/alert and bactec 660/730 nonradiometric blood culture systems. J. CLIN. MICROBIOL. 30:323-329.