

26
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE LA EXISTENCIA DE
UN GENE PARA UNA ENTEROTOXINA
LT-like EN *Salmonella gallinarum*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A

JAVIER BALCAZAR QUINTANA

ASESOR PRINCIPAL: DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ

COASESORES: DR. FRANCISCO SUAREZ GUEMES

DR. JOSE ANTONIO QUINTANA LOPEZ

MEXICO, D.F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN.



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

| | |
|---|----|
| I. RESUMEN | 1 |
| II. INTRODUCCION | 2 |
| -Tifoidea aviar | 3 |
| -Mecanismos de patogenisidad | 7 |
| -Enterotoxinas de <i>Escherichia coli</i> | 9 |
| -Enterotoxinas de <i>Vibrio cholerae</i> | 11 |
| -Enterotoxinas de <i>Salmonella</i> spp. | 12 |
| III. MATERIALES Y METODOS | |
| -Cepas bacterianas, plásmidos | 15 |
| -Marcadores de peso molecular y Enzimas | 18 |
| -Soluciones | 19 |
| -Estuches o <i>Kits</i> | 22 |
| -Oligonucleótidos o <i>primers</i> | 23 |
| -Extracción de ADN total | 25 |
| -Extracción de ADN de plásmidos | 26 |
| -Extracción de ADN de plásmidos de peso molecular grande | 26 |
| -Electroforesis en geles de agarosa | 27 |
| -Digestiones con enzimas de restricción | 28 |
| -Purificación de fragmentos de ADN | 28 |
| -Transferencia tipo <i>Southern</i> | 29 |
| -Hibridación | 30 |
| -Reacción en cadena de la polimerasa | 31 |
| -Secuencia nucleotídica | 32 |
| IV. RESULTADOS | 34 |
| V. DISCUSION | 53 |
| VI. CONCLUSIONES | 58 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 59 |

RESUMEN

BALCAZAR QUINTANA, JAVIER. DETERMINACION DE LA EXISTENCIA DE UN GENE PARA UNA ENTEROTOXINA *LT-like* EN *Salmonella gallinarum*.(BAJO LA ASESORIA DE: DR. VERDUGO RODRIGUEZ, A., DR. SUAREZ GÜEMES, F., DR. QUINTANA LOPEZ, J.A.).

La tifoidea aviar, ocasionada por *Salmonella gallinarum*, es una de las enfermedades que provoca mayores pérdidas económicas a la industria avícola mexicana. Los mecanismos moleculares mediante los cuales *Salmonella* desencadena la enfermedad, no se han descrito con exactitud. En el presente trabajo se determinó la existencia de un gene para una enterotoxina *LT-like* en *S. gallinarum*. La detección se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos o *primers* sintetizados a partir del plásmido pEWD299 que contiene los genes *elt A* y *elt B*, que codifican para las subunidades LT A y LT B que constituyen la enterotoxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigénica. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los *primers* del gene *elt A* amplificaron fragmentos de ADN de *S. gallinarum* cepas FVA-1 y FVB-383, *S. pullorum* ATCC 10398, *S. worthington* y *S. enteritidis*. El producto amplificado fue hibridado con ADN, cortado con *HindIII*, de *S. gallinarum*, mostrando un reconocimiento con bandas de 20 kb y 3.6 kb. En *S. pullorum* el reconocimiento fue a nivel de 15 kb y 3.6 kb. El producto de PCR obtenido a partir del DNA de *S. gallinarum* fue secuenciado, y el alineamiento nucleotídico entre el fragmento estudiado con el gene *elt A* y con el gene *ctxA* de *Vibrio cholerae*, mostró una similitud del 95% y del 83% respectivamente, mientras que la secuencia deducida de amino ácidos mostró una similitud del 88% con LT A y del 91% con CT A.

INTRODUCCION

Dentro de las áreas de producción pecuaria la avicultura es la más dinámica y tecnificada, pero también una de las más susceptibles a pérdidas económicas por problemas sanitarios³².

En este aspecto, las bacterias del género *Salmonella* son de los agentes etiológicos que mayores problemas ocasionan^{4,30,32}.

El género *Salmonella* pertenece al grupo de bacterias Gram-negativas que se incluye en la Familia *Enterobacteriaceae* y en la tribu *Salmonellae*⁴. Este género comprende aproximadamente 2,200 serotipos,²⁵ de los cuales, los de interés en la industria avícola se pueden dividir en 2 grupos principalmente: el primero, de las salmonelas inmóviles, representado por *Salmonella gallinarum*, productora de la "Tifoidea aviar" (TA) y *S. pullorum* productora de la "pulorosis" o "Diarrea blanca bacilar". Al segundo grupo pertenecen las salmonelas móviles donde las cepas de mayor incidencia son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, las cuales producen las paratifoideas en las aves y "Salmonelosis" o "envenamiento por alimento" en el humano³².

S. gallinarum ha venido ocasionando grandes pérdidas económicas a la avicultura a través de los años. Este problema, lejos de solucionarse se propagó en casi todo el país, tanto a nivel de reproductoras pesadas y semipesadas, como de ligeras³². Por lo anterior, en 1980, se constituyó la campaña contra la salmonelosis aviar con la entonces Dirección General de Salud Animal, la cual se ha enfocado a la prevención, control y erradicación de la TA².

TIFOIDEA AVIAR

La tifoidea aviar (TA) es una enfermedad septicémica que afecta principalmente a pavos, gallina doméstica, codornices, faisanes y gallina de guinea. Se encuentra diseminada en todo el mundo, estando en la actualidad prácticamente erradicada de EUA, Canadá y algunos países de Europa^{19,30,32}.

Etiología

El agente etiológico de la TA es *S. gallinarum* o llamado recientemente *S. cholerae suis* serotipo *gallinarum*²⁶. Es un bacilo Gram-negativo que mide 1-2 μm de longitud y 1.5 μm de diámetro, no esporula, no presenta cápsula, y es inmóvil. Es una bacteria anaerobia facultativa, que crece a 37 C formando colonias pequeñas, circulares y lisas. *S. gallinarum* posee los antígenos somáticos (O) : 1,9,12.

Propiedades bioquímicas

Metaboliza los siguientes compuestos: arabinosa, dextrosa, galactosa, manitol, manosa, ramnosa, xilosa, fructuosa, maltosa, dulcitol e isodulcitol.

Las sustancias que no fermenta son: lactosa, sacarosa, glicerol, salicina y sorbitol. No descarboxila la ornitina, no forma indol, no hidroliza la urea y los nitratos los reduce a nitritos⁴.

Transmisión

Su principal forma de transmisión es vertical o transovárica y se origina por la infección del ovario, que es uno de los sitios predilectos de colonización de *S. gallinarum*. Sin embargo, la transmisión horizontal, de ave a ave por cohabitación o mediante material contaminado y por transmisores mecánicos como ratas, aves de vuelo y moscas,

juega un papel importante en la presentación de la enfermedad^{4,19,30,32}.

Su período de incubación es de 4-5 días dependiendo de la susceptibilidad del huésped, así como de una diferencia de virulencia observada entre las cepas^{19,30}.

El curso de la enfermedad es de 5 días⁴. En las parvadas de aves que nacen infectadas el curso es de 2-3 semanas, con una tendencia a recurrir³⁰.

Signos clínicos

Disminución o cese de la postura, disminución del consumo de alimento, fiebre, diarrea verde-amarillenta, debilidad; frecuentemente aparecen crestas y barbillas pálidas producto de una anemia hemolítica, la cual puede deberse a que la endotoxina de *S. gallinarum*, induce una modificación de los eritrocitos *in vivo* y éstos son destruidos por el sistema reticuloendotelial^{30,33}.

En la fase aguda de la infección algunas de las aves pueden morir entre los 4-10 días de la enfermedad³³. En los pollitos que adquirieron la infección transováricamente, la enfermedad se presenta con mayor severidad. Algunas aves muestran empastamiento fecal en la cloaca o bien un excremento rico en uratos debido al proceso de deshidratación. También existe apatía, anorexia, plumaje erizado y una mortalidad del 5-50% o más, la cual se incrementa después del 5º día de edad, alcanzando su máximo alrededor del 10 día para luego declinar^{4,30,31}.

Las aves en desarrollo a veces no presentan signos clínicos, esto se debe a que la bacteria permanece en estado latente, pero al iniciarse la postura *S. gallinarum* emprende un proceso de rápida multiplicación, donde las aves enfermas morirán después de pocos días del inicio de los signos^{30,33}.

Lesiones

Las lesiones más frecuentemente observadas son: bazo e hígado aumentados de volumen con necrosis multifocal, la superficie del hígado después de una exposición al aire por un tiempo corto, generalmente muestra un resplandor verde bronceado¹⁹; en corazón, molleja y pulmones se pueden presentar nódulos blanquecinos; retención y descomposición de saco vitelino; placas blanquecinas (por hiperplasia linfocitaria) con engrosamiento de la mucosa intestinal, hemorragias intestinales, peritonitis, pericarditis; los folículos ováricos están hemorrágicos, deformes y pendulosos, descoloridos o de color verdoso o negruzcos; y congestión renal.

Las lesiones microscópicas son: hepatitis parenquimatosa necrosante, infartos con necrosis fibrinoide y esclerosis del miocardio, así como múltiples focos de inflamación y necrosis en muchos órganos y tejidos^{30,31}.

La patogénesis de la enfermedad no se ha estudiado a nivel molecular. Aunque en estudios hechos con *S. gallinarum*, Barrow *et al.*, en 1987¹ reportaron la participación que tiene un megaplásmido en virulencia.

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo se realiza mediante la historia clínica, signos y lesiones, pero para el diagnóstico definitivo se requiere del aislamiento e identificación de *S. gallinarum* a partir de cultivos primarios de vísceras (hígado, bazo, ovario, vesícula biliar, tonsilas cecales). En estados crónicos se requiere un estudio bacteriológico más minucioso, mediante la prueba de Williams, que incluye medios selectivos diferenciales. Los estudios serológicos (aglutinación con sangre completa, prueba de aglutinación y

microaglutinación con suero) son de utilidad para la detección de aves portadoras^{30,31}.

Tratamiento

Cualquier tratamiento que se aplique no será 100% satisfactorio³¹, ya que se utiliza para disminuir las pérdidas por mortalidad, pero de ninguna manera impiden la transmisión transovárica, ni eliminan la infección. La administración de sulfaquinolonas y nitrofuranos da buen resultado en el tratamiento de la enfermedad³⁰.

La vacunación, con la cepa 9-R viva se recomienda cuando las aves tienen entre 9-10 semanas de edad. Esto no tiene efecto adverso en la subsecuente producción de huevo. La inmunidad puede desaparecer 5 a 6 meses después de la vacunación¹⁹.

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD BACTERIANA

Se ha descrito que la virulencia de una bacteria está en relación directa a su capacidad invasiva o de producción de toxinas³⁴.

Toxinas bacterianas

La clasificación más usual de las toxinas bacterianas es la diferencia entre endotoxinas y exotoxinas^{34,39}.

Endotoxinas.- Están formadas por el lípido A de los lipopolisacáridos (LPS) y proteínas que conforman la pared de bacterias Gram-negativas, que son liberados al destruirse el microorganismo. Son termo-estables, con poca o nula neutralización por anticuerpos por lo cual no existe capacidad de formar toxoide³⁴.

En aves infectadas experimentalmente con la endotoxina (LPS) de *S. gallinarum* se observa una disminución de temperatura corporal, disminución del peso de la Bolsa de Fabricio y cambios en los parámetros hematológicos y serológicos⁴⁵.

Exotoxinas.- Son proteínas solubles producidas extracelularmente durante el ciclo de vida de la bacteria. Estas exotoxinas se consideran más tóxicas que las endotoxinas. Son termo-lábiles, se puede producir toxoide y neutralizar con anticuerpos³⁴.

Con base en su mecanismo de acción se pueden formar 3 grupos:

1. **Toxinas citolíticas.-** Modifican la membrana celular permitiendo la salida de los componentes intracelulares, dando como resultado la lisis de la célula. Ejemplo: *Clostridium perfringens*.
2. **Toxinas con actividad intracelular.-** Las toxinas con actividad intracelular afectan la actividad metabólica de la célula mediante 2 formas principalmente:

-Activando intracelularmente la adenil ciclasa (toxinas citotónicas) Ejemplos: *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

-Inhibiendo la síntesis de protefnas en el interior de la célula (toxinas citotóxicas) Ejemplo: *Shigella dysenteriae* y *Campylobacter jejuni*³⁹.

3. Toxinas con mecanismo de acción no definido.- Existe una serie de bacterias patógenas que parasitan el tracto intestinal, produciendo exotoxinas a las cuales se les conoce como enterotoxinas. Estas tienen como lugar de acción el intestino³⁴. En *V. cholerae* y ETEC se ha demostrado que las enterotoxinas juegan un papel muy importante en la producción de diarrea durante la infección⁴², y se ha propuesto que uno de los mecanismos por los cuales *Salmonella* produce diarrea es a través de una enterotoxina²³.

ENTEROTOXINAS DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENICA (ETEC)

La patogenicidad de ETEC es mediante 2 factores de virulencia: fimbria que se une a las células intestinales y la producción de enterotoxinas¹⁴. Los genes *elt* que codifican para la síntesis de enterotoxina⁴⁶ en *E. coli* son localizados en plásmidos llamados *plásmidos Ent*²⁷. Los dos tipos de enterotoxinas que produce son: la toxina termo-lábil [*labile toxin* (LT)], la cual es inactivada a 60 C/30 min, y la toxina termo-estable [*stable toxin* (ST)] que es relativamente estable a 100 C/15-30 min pero se destruye en autoclave²³.

LT y ST alteran el metabolismo de las células epiteliales, LT activa la adenil ciclasa y ST activa la guanidil ciclasa¹⁰, permitiendo la salida de líquido al lumen intestinal dando como consecuencia la producción de diarrea³⁴. Ambas enterotoxinas son proteínas compuestas por una subunidad B inmunodominante y una subunidad A¹².

La subunidad LT-B, a su vez, esta constituida de 5 subunidades iguales de polipéptidos, unidas por enlaces no covalentes, cada subunidad B contiene un total de 103 aminoácidos (aa) y su peso molecular es de 11.5 kiloDaltones (kDa)^{8,12}. Esta subunidad se une a los receptores que contienen los oligosacáridos de los gangliósidos GM1 en la superficie de las células susceptibles⁴⁴. La toxina se une entre 5 y 6 moléculas de oligosacáridos, posiblemente una por cada subunidad B¹⁵.

La subunidad A es sintetizada como una cadena polipeptídica y tiene un precursor de 18 aa, por lo que en su fase madura, LT A está constituida de 254 aa, y tiene un peso molecular 27.58 kDa⁴⁶. La subunidad A es introducida a la célula eucariótica, y mediante una reacción ADP ribosilación con nucleótidos de guanina, que

se unen a la proteína Gs, la cual es asociada con la catálisis del adenilato ciclasa dando como resultado un incremento intracelular de los niveles AMP cíclico y el subsecuente desequilibrio electrolítico caracterizado por la producción de diarrea^{10,24,46}.

Con base en reacciones con suero hiperinmune anti-LT, se pueden formar 2 grupos de enterotoxinas: el serogrupo 1 formado por la enterotoxina termo-lábil (LT-I) y la enterotoxina colérica (CT)³⁵. Ambas toxinas son neutralizadas con un suero hiperinmune contra CT⁴⁴. El segundo grupo está formado por el tipo II de enterotoxina termo-lábil (LT-II). Este segundo grupo no es neutralizado con suero preparado contra CT, pero es neutralizado con suero hiperinmune preparado contra LT-II. La actividad biológica de LT-II es 25-50 veces más potente que la de CT y LT-I. Sin embargo, el papel que juega LT-II en la patogénesis de la infección no es muy claro²⁰.

Las extracciones de *ETEC* aislada de humano y porcino, originan variantes de LT-I formando dos diferentes subgrupos antigénicos designados LTh-I (humano) y LTp-I (porcino)⁴⁴, las cuales difieren únicamente en 4 residuos de aa, en las posiciones 4,13,46 y 102 de la región N-terminal¹².

ENTEROTOXINAS DE *Vibrio cholerae*

Durante la infección, *V. cholerae* no penetra a las células epiteliales del intestino, sino que el daño lo produce por medio de la producción de una potente enterotoxina, además, la bacteria se multiplica colonizando gran parte del epitelio intestinal interfiriendo con la capacidad de absorción del colon, dando como resultado una gran pérdida de agua del organismo³⁴.

La enterotoxina colérica (CT) es estructural y funcionalmente relacionada a la enterotoxina LT^{44,46}.

CT está considerada dentro del serogrupo I junto con LT-I por ser neutralizadas con suero hiperhímune contra CT^{21,44}.

CT tiene un peso molecular de 84 kDa y está constituida de 2 subunidades: una subunidad A de 29 kDa y una subunidad B formada de 5 polipéptidos de 11 kDa asociados con uniones no covalentes. Esta tiene la función de unirse a los receptores de las membranas de las células susceptibles³⁴.

Al comparar la secuencia de aa de CT-B con la secuencia de LT-B, 80 de los residuos de CT-B son idénticos, lo cual representa una homología del 79%⁹.

La región A puede ser cortada proteolíticamente en A1 (21.8 kDa) y en A2 (5.5 kDa) unidas por un puente disulfuro donde la región A1 contiene la ADP-ribosiltransferasa que lleva a cabo la actividad enterotóxica¹².

Al parecer, la única función del fragmento A2 es la unión con la subunidad B³⁴.

ENTEROTOXINAS DE *Salmonella* spp.

Los mecanismos de patogenicidad con que *Salmonella* induce diarrea no han sido descritos al detalle, pero parece ser un fenómeno complejo que involucra diversos factores de virulencia²⁴. En varios estudios, se ha demostrado la presencia de una enterotoxina en diferentes especies de *Salmonella*, básicamente en *S. typhimurium* y en *S. typhi*^{5,6,11,36}.

Koupal *et al.*, en 1975,²³ aisló una enterotoxina de *S. enteritidis*, la cual es inactivada con proteasa, lo que indica que está compuesta de protefnas, las cuales son componentes necesarios para la actividad enterotoxigénica.

Así mismo, se ha demostrado que la enterotoxina de *Salmonella* es muy similar a las enterotoxinas CT y LT^{6,23,36,43}.

Se han aislado dos *factores* (enterotoxinas) de permeabilidad de piel de *S. typhimurium*, los cuales se diferencian entre sí, mediante pruebas de estabilidad al calor; el *factor* termo-lábil induce endurecimiento y eritema en piel de conejo⁴². Estas toxinas causan hipersecreción de fluidos y electrolitos en la mucosa intestinal, elongan células de ovario de hamster chino (*CHO*), producen acumulación de fluidos en asas ligadas de intestino de conejo, e incrementan los niveles de AMP-cíclico^{28,43}. Estos efectos son morfológicamente indistinguibles a los que producen CT y LT^{23,42}. Estas actividades son neutralizadas con anticuerpos anti-CT o con gangliósidos, que son los receptores biológicos de CT⁴³.

Sin embargo, algunos autores han argumentado que los mecanismos por los cuales *S. typhi* produce diarrea son diferentes a los mecanismos empleados por *ETEC* y

Shigella spp.³⁸.

Se ha reportado que múltiples fragmentos de ADN de *S. typhimurium* y *S. typhi* cortados con la enzima de restricción *Hind* III exhiben homología con el gene LT-I de *E. coli*, determinado mediante *Southern blot*⁶.

En el Laboratorio del Dr. E. Calva, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se clonó una región de ADN que codifica para una enterotoxina en *S. typhi*, la cual tiene similitudes con CT y LT. Esta enterotoxina también causa secreción de fluidos en asas ligadas en rata, elonga células *CHO* y dió reacción cruzada con LT mediante una prueba de inmuno ensayo enzimático (ELISA)¹¹. El alineamiento nucleotídico de una parte de la región clonada presentó una similitud del 54.3% para LTh-I y 57.2% para LTp-I, con el gene *elt-B* para la subunidad LT-B⁴¹.

Por otra parte, se ha reportado la clonación de un gene *CT-like* en ADN cromosomal de *S. typhimurium*, donde se menciona que el mapa genético de la clonación es muy similar pero no idéntico a los de los genes para las enterotoxinas CT y LT⁵.

Recientemente, Yang y Tan, clonaron y caracterizaron otro gene de la enterotoxina para *S. typhimurium*, y, contrariamente a los reportes previos, este gene que codifica para una enterotoxina se localiza en un plásmido y no en el ADN cromosomal⁴⁹.

Con base en la información anterior se establecieron los objetivos del presente trabajo, enfocados en la búsqueda de un gene para una enterotoxina en *S. gallinarum*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia de un gene para una enterotoxina *LT-like* en *Salmonella gallinarum*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar si las cepas de *Salmonella gallinarum* que se probarán contienen un segmento de DNA que hibride con las sondas que contienen el gene para la enterotoxina LT de *Escherichia coli* y de *Salmonella typhi*.
- Determinar si la secuencia que hibrida se localiza en DNA genómico, en plásmido o en ambos.
- Caracterizar parcialmente la región detectada.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS

-*S. gallinarum* cepa vacunal 9-R (rugosa).

-*S. gallinarum*: cinco cepas de campo, FVA-1, FVB-285, FVB-323, FVB- 383 y FVB-591.

Proporcionadas por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

-*S. gallinarum* cepa de referencia de la *American Type Culture Collection (ATCC)* 9184.

-*Salmonella pullorum* ATCC 10398.

-*Salmonella typhi* IMSS-1 serotipo 9, 12, d, Vi. Cepa mexicana de referencia^{37,48}.

-*Escherichia coli* DH5-*alfa**.

-*Salmonella* spp. grupo C.

-*Salmonella typhimurium* LT2, cepa de referencia SL937.

-*Salmonella worthington* G2 serotipo (1,13,23,z).

-*Salmonella arizonae* cepa INN-1.

PLASMIDOS

-pEWD299: Plásmido recombinante que contiene los genes estructurales para la enterotoxina LT de *E. coli*⁴⁶. Fig.1

-pUC18 de *E. coli***.

-pPF14: Plásmido recombinante que contiene los genes estructurales para la enterotoxina LT-Like de *S. typhi*. Fig.2⁴¹.

-pBR322: Plásmido descrito por Bolívar *et al.*, 1977³.

*(Gibco BRL, Gaithersburg, E.U.A.)

** (Boehringer Mannheim, Germany)

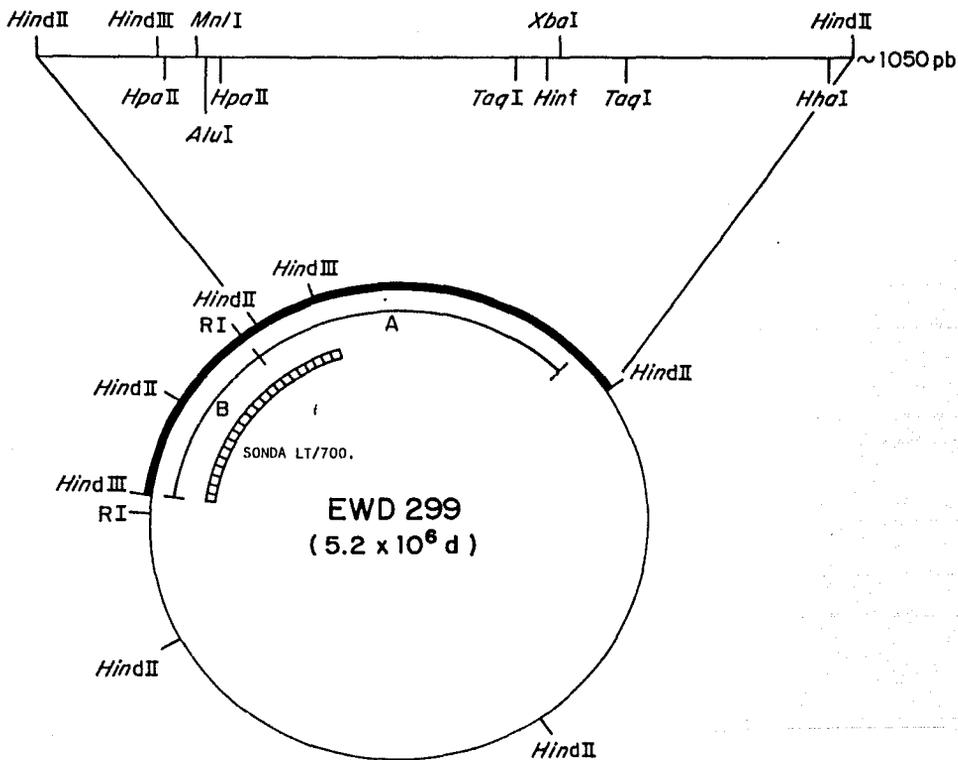


Fig.1 Mapa de Restricción del plásmido pEWD299 que contiene los insertos de los genes *elt A* y *elt B* de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (Spincer, E.K. . *et al.*, 1982) de donde se obtuvo la sonda LT/700.

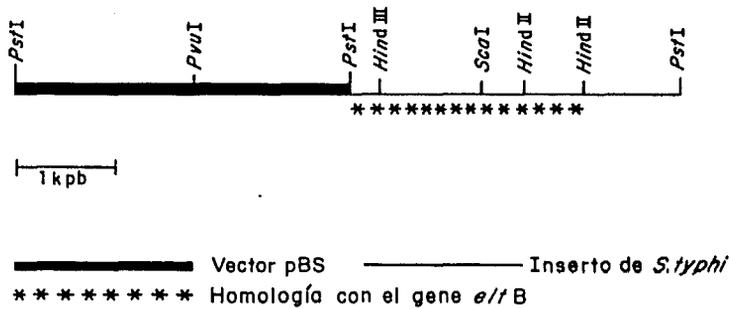


Fig 2 Mapa de restricción del plásmido pFF14 que contiene el inserto de 3.3 kb de *Salmonella typhi*.

MARCADORES DE PESO MOLECULAR

-Bacteriofago *Labda* silvestre.

-*Ladder** .

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

-*Eco* RI, *Hind* III, *Bam*HI I, *Eco* RV**.

-*Sal* I, *Sma* I, *Pst* I, *Sty* I, *Ssp* I**.

-*Pst* I, *Pvu* I***.

OTRAS ENZIMAS

-RNAsa, DNAsa****.

MEDIOS DE CULTIVO

-Medio líquido YT

Triptona 8 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 3 g

Cbp 1000 ml. Se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 min.

*(GIBCO BRL Num. de catálogo 15615-016)

** (Boehringer)

*** (Promega, Madison, E.U.A.)

**** (SIGMA, Saint Louis, MO, EUA)

-Medio Sólido YT-Y

| | |
|----------|-------|
| Triptona | 8 g |
| NaCl | 25 g |
| Agar | 15. g |

Cbp 1000 ml. Se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 min.

MEZCLA LITICA

| | |
|--------------------------------|-------|
| Hidróxido de sodio (NaOH) | 0.2 N |
| Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) | 1% |

TIOCIANATO DE GUANIDINA

| | |
|--|-------|
| Tiocianato | 120 g |
| Acido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M | 40 g |
| Agua | 20 ml |

Se incubó a 65 C hasta que se disolvió el Tiocianato. Se agregaron 10 ml de sarkosil al 10%. Se aforó a 200 ml de agua, y se filtró con membranas* con un poro 0.45 μ M.

SOLUCION AMORTIGUADORA SET 20%

| | |
|----------|--------------|
| Sacarosa | 2 % |
| E D T A | 50 mM. |
| Tris-HCl | 50 mM pH 7.6 |

***(millipore, Massachusetts, EUA)**

SOLUCION AMORTIGUADORA T-E

| | |
|----------|------------|
| Tris-HCl | 10 μ M |
| E D T A | 1 μ M |

SOLUCION AMORTIGUADORA TH-E

| | |
|----------|--------|
| Tris-HCl | 0.05 M |
| E D T A | 0.01 M |

SOLUCION AMORTIGUADORA A

| | |
|-----|---------------------------|
| SDS | 4 % en buffer T-E pH 12.4 |
|-----|---------------------------|

SOLUCION TES

| | |
|----------|---------|
| Tris-HCl | 0.05 M |
| E D T A | 0.005 M |
| NaCl | 0.05 M |

SOLUCION DENHARDT'S

| | |
|------------------------------|---------|
| Ficoll 400 | 10 g |
| Polivinilpirrolidona | 10 g |
| Albúmina sérica bovina (BSA) | 10 g |
| Cbp | 500 ml. |

SOLUCION CITRATO DE SODIO (SSC)

| | |
|-------------------------|-------|
| Cloruro de sodio (NaCl) | 3 M |
| Citrato de sodio | 0.3 M |

SOLUCION DE PREHIBRIDACION

| | |
|--------------------------|--------------|
| Formamida | 30 % |
| Denhardt's | 10x |
| SSC | 5 x |
| Tris-HCl | 50 mM pH 7.5 |
| ADN de esperma de salmón | 0.1 mg/ml |

SOLUCION DE HIBRIDACION

| | |
|--------------------------|-----------|
| Tris-HCl | 50 mM |
| E D T A | 1 mM |
| SDS | 0.1 % |
| Formamida | 30 % |
| Denhardt's | 10 x |
| SSC | 5 x |
| ADN de esperma de salmón | 0.1 mg/ml |

SOLUCION AMORTIGUADORA TAE 50x pH 8

| | |
|------------------|---------|
| Trizma-base | 242 g |
| Acetato de sodio | 136.1 g |
| E D T A | 37 g |
| Acido acético | 73 ml |
| Cbp 1000 ml | |

SOLUCION AMORTIGUADORA DE TBE 10x pH 8.8

Trizma base 130 mM 157.43 g

Acido bórico 40 mM 24.73 g

Na₂ EDTA 28 mM 10.42 g

Cbp 100 ml

ISOTOPOS RADIOACTIVOS

³²P-dCTP*

³²P-dATP **

KITS (Estuches)

Gene Clean II***

dsDNA cicle sequencing system****.

Multiprime DNA labelling system*****.

* (Amersham International plc, Buckinghamshire, Inglaterra) Núm. de Catálogo PB 10205

** (Amersham International plc) Núm. de Catálogo NEG-035C

*** (Bio 101)

**** (GIBCO BRL)

***** (Amersham)

OLIGONUCLEOTIDOS O PRIMERS

Se diseñaron 2 oligodeoxirribonucleótidos homólogos a la secuencia nucleotídica de los genes *elt-A*, y *elt-B* de *E. coli* (ETEC)⁴⁶ y de la secuencia para *LT-like* de *S. typhi*⁴¹. Todos ellos en dirección 5'- 3'.

| Nombre | Secuencia | LN | %G+C | Tm | Origen |
|--------------------|-----------------------------|--------|------|------|------------------|
| <i>elt A-1</i> | CCG-TGC-TGA-CTC-TAG-ACC-CCC | 21mero | 66.6 | 70 C | <i>E. coli.</i> |
| <i>elt A-2</i> | CCG-GTG-GGA-AAC-CTG-CTA-ATC | 21mero | 57.1 | 66 C | <i>E. coli.</i> |
| <i>elt B-1</i> | CGG-CGT-TAC-TAT-CCT-CTC | 18mero | 55.5 | 56 C | <i>E. coli.</i> |
| <i>elt B-2</i> | GCC-GCA-ATT-GAA-TTG-GGG-G | 19mero | 57.8 | 60 C | <i>E. coli.</i> |
| <i>elt-B like1</i> | GCG-GCG-GAA-GGC-TGT-AGA-AAC | 21mero | 61.9 | 68 C | <i>S. typhi.</i> |
| <i>elt-B like2</i> | CGG-CTC-CCT-GTA-GGG-AAG-CCG | 21mero | 71.4 | 72 C | <i>S. typhi.</i> |
| <i>elt A-3</i> | GCG-ACA-GCA-CCA-AAT-ATG | 18mero | 50 | 54 C | <i>E. coli.</i> |
| <i>elt A-4</i> | GGT-GCT-GCT-GCT-ATA-ACA | 18mero | 50 | 54 C | <i>E. coli.</i> |
| <i>elt A-5</i> | GCG-TAT-ACA-GCC-CTC-ACC-C | 19mero | 63.1 | 62 C | <i>E. coli.</i> |

LN.- longitud del oligo.

%G+C.- Porcentaje guanina más citosina.

Tm.- Temperatura media del oligo.

OTROS PRODUCTOS

- Agarosa standad low *
- Glass MAX DNA Isolation Spin Cartridge System**
- Papel de Nitrocelulosa***
- Películas X-omat****
- Sephadex G-75*****
- Acrilamida*
- Urea*
- Bromuro de etidio *****
- New wash*****

*(Bio-Rad laboratories, CA. EUA)

** (Gibco BRL)

*** (Schleicher and Schuell, W. Germany)

**** (Kodak)

***** (Pharmacia Fine Chemicals)

***** (Sigma)

***** (Geneclean, CA. EUA)

EXTRACCION DE D N A

- 1) Se creció la bacteria en 500 ml de medio YT líquido a 37 C, durante 12 hrs con agitación. El cultivo se centrifugó 10 min a 6000 revoluciones por minuto (6 krpm), la pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de buffer T-E y posteriormente se agregaron 5 ml de tiocianato de guanidina más 30µl de RNAsa a una concentración 10 mg/ml.
- 2) La mezcla se incubó 15 min en hielo, se adicionaron 2.5 ml de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló bien y se incubó durante 10 min en hielo.
- 3) Se adicionó un volumen igual de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), la mezcla se agitó 10 min, se centrifugó durante 10 min a 10 krpm, después la fase acuosa fue separada con una pipeta Pasteur. Este proceso se repitió 3 veces.
- 4) Se adicionó un volumen igual de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), la mezcla se agitó 10 min y se centrifugó 10 min a 10 krpm; la fase acuosa se separó con una pipeta Pasteur. Este proceso se repitió una vez más.
- 5) Se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló suavemente y se dejó 12 hrs a -20 C, después se centrifugó 20 min a 10 krpm.
- 6) El sobrenadante se desechó, y se agregaron 5 ml de etanol 70%. Se mezcló suavemente y se centrifugó durante 10 min a 10 krpm. El lavado con etanol 70% se repitió 5 veces.
- 7) El A D N fué secado al vacío, y la pastilla obtenida se resuspendió en 500 µl de agua tridestilada y estéril¹⁷.

EXTRACCION DE DNA DE PLASMIDO.

- 1) La bacteria se creció en 50 ml de medio YT, a 37 C, con agitación a 200 rpm durante 12 hrs.
- 2) El cultivo se centrifugó 10 min a 6 krpm, el sobrenadante se tiró y se agregaron 4 ml de solución amortiguadora SET, 200 µg de RNAsa a una concentración 10 mg/ml, y 8 ml de la mezcla lítica. La mezcla se dejó 5 min en hielo.
- 3) Se adicionaron 6 ml de acetato de amonio 7.5 M, se incubó durante 30 min en hielo y se centrifugó 10 min a 10 krpm.
- 4) El sobrenadante claro se removió a otro tubo nuevo y se adicionaron 9 ml de isopropanol, se incubó 15 min a temperatura ambiente (T.A.), se centrifugó 10 min a 15 krpm, y el sobrenadante se removió a otro tubo nuevo.
- 5) Se adicionaron 9 ml de etanol 70%, se mezcló suavemente, después se centrifugó 10 min a 10 krpm, y se decantó.
- 6) El ADN se secó al vacío y la pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de agua tridestilada y estéril.

EXTRACCION DE PLASMIDOS DE PESO MOLECULAR GRANDE.

(Mayor de 350 x 10 PM)

- 1) La bacteria se creció en 40 ml de medio YT a 37 C en agitación por 12 hrs.
- 2) El cultivo se centrifugó a 10 min a 6 krpm, la pastilla obtenida fue resuspendida en 20 ml de TH-E y se centrifugó 10 min a 6 krpm.
- 3) La pastilla obtenida se resuspendió en 800 µl de T-E; se agregaron 12 ml de solución

amortiguadora A. La mezcla se incubó 20 min a 37 C.

4) Se adicionaron 600µl de Tris-HCl 2 M. El ADN cromosomal se precipitó con 4.8 ml de NaCl 5 M y se incubó durante 4 h a 4 C. Se centrifugó 10 min a 10 krpm, y el sobrenadante se pasó a otro tubo.

5) Al sobrenadante se le agregaron 10 ml de isopropanol y se dejó incubar durante 30 min a -20 C, y posteriormente se centrifugó 10 min a 10 krpm, decantando el sobrenadante.

6) El ADN se secó al vacío y se resuspendió en 30 µl de agua tridestilada y estéril.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La electroforesis en geles de agarosa fue el método usado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN.

Las preparaciones de ADN, tanto cromosomal como de plásmidos, fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando una solución amortiguadora TAE 1x, a 100 volts.

Los geles se tiñeron con una solución de 0.5 µg/ml bromuro de etidio durante 15 seg. El ADN se visualizó con luz ultravioleta (UV) de onda corta con un transluminador*7.

*Ultraviolet Products Inc., San Gabriel, California, EUA

DIGESTIONES DE DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

se llevaron a cabo bajo las condiciones recomendadas por las diferentes compañías proveedoras.

| | |
|---------------------------------|--------|
| -Sol. amortiguadora de reacción | 10 x |
| -ADN | 1 µg |
| -BSA | 10 x |
| -Endonucleasa | 1 µl |
| -Cbp | 20 µl. |

La mezcla se dejó incubando 4-12 h a 37 C.

PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA.

- 1) El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.05 µg/ml. El fragmento deseado se cortó del gel de agarosa en el menor tiempo posible y se colocó en un tubo *ependorf* de 1.5 ml.
- 2) Se adicionaron 2.5 volúmenes de NaI y se calentó 5-7 min a 45-50 C, al disolverse la agarosa se agregaron 5 µl de *Glass Milk* y se incubó 30 min en hielo.
- 3) Se centrifugó durante 5 seg, y se eliminó el sobrenadante, la pastilla fue resuspendida en 500 µl de solución *New wash* y se centrifugó 5 seg a 12 krpm, eliminando el sobrenadante. Este proceso se repitió 4 veces.
- 4) La pastilla se resuspendió en 20 µl de agua tridestilada y se incubó 3 min a 45-50 C. Se centrifugó 30 seg a 12 krpm, y el sobrenadante se recuperó en otro tubo.
- 5) La pastilla se resuspendió en 10 µl de agua tridestilada y se calentó 5 min a 45 C. Se centrifugó 30 seg y se recuperó el sobrenadante.

6) El fragmento purificado se observó en un gel de agarosa al 1%¹⁷.

TRANSFERENCIA TIPO *Southern*

Este fué el método usado para separar ADN en geles de agarosa o de acrilamida y posteriormente transferir a membranas o filtros de nitrocelulosa. Estos filtros se incubaron en presencia de una sonda de ADN marcada con un isótopo radioactivo, la cual hibridó con una secuencia homóloga en el filtro.

El ADN se separó en un gel de agarosa al 1% con 2 cm de grosor, y al finalizar, se tomó una fotografía del gel.

El gel se colocó en una solución HCl 0.25 N durante 5 min. Se pasó a una solución NaOH 0.5 M y NaCl 1 M durante 45 min con agitación.

El gel se pasó a una solución Tris HCl 0.5 M ph 7.5 y NaCl 1.5 M durante 30 min a T.A.. Este paso se repitió 2 veces.

La transferencia se montó durante un período de 15 a 24 hrs empleando como solución de transferencia SSC 6x.

El ADN se fijó al filtro de nitrocelulosa, incubándolo a 80 C al vacío durante 2 h⁷.

MARCAJE RADIOACTIVO DE LA SONDA PARA HIBRIDAR

El marcaje se realizó empleando el estuche *Multiprime DNA labelling system*.

Mezcla de la reacción:

-Agua (Se aforó el volumen final de la reacción a 50µl).

-Templado de ADN (volumen necesario que contenga 25ng.).

-Amortiguador 5x.

Se hirvió en un tubo *eppendorf* durante dos min y se colocó en hielo.

Se añadieron los componentes restantes.

-Iniciador 5x

-dTTP 4 μ l

-dATP 4 μ l

-dGTP 4 μ l

-³²P-dCTP 20 μ Cl/5 carriles ocupados del filtro.

-Enzima 2 μ l.

Se incubó la reacción durante 3 h a T.A.. La mezcla se pasó a través de una columna de Sephadex G-75 para retener la marca no incorporada. La radioactividad incorporada se determinó en una alícuota del volumen final, en un contador de centello*.

H I B R I D A C I O N

El filtro se colocó en 20 ml de solución de pre-hibridación, en una bolsa de plástico sellada, durante 3 h a 42 C.

Posteriormente el filtro se colocó en 20 ml de solución de hibridación y se le adicionó la sonda marcada radioactivamente. Se dejó incubar durante 24 h a 42 C.

El filtro se lavó con una solución 0.5x SSC y 0.1% de SDS durante 15 min a T.A. con agitación después se pasó a una solución 0.5x SSC durante 15 min.

*(Beckman Instruments, Inc., CA., U.S.A.).

El filtro se secó a T.A. y se expuso en un contenedor de películas de rayos X. La película se reveló después de una exposición de 12-16 h.

Para disminuir la marca inespecífica se lavó el filtro con una solución 0.5 SSC y 0.1% SDS a 65 C/15 min.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Mezcla de la reacción:

| | |
|---|-------------|
| -Amortiguador | 10 μ l |
| -dATP | 2 μ l |
| -dGTP | 2 μ l |
| -dTTP | 2 μ l |
| -dCTP | 2 μ l |
| -Primer A | 30 pmol |
| -Primer complementario | 30 pmol |
| -Templado de ADN | 100 ng |
| -Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa | 0.5 μ l |
| -Agua (Se aforó el volumen final de la reacción a 100 μ l). | |
| -Aceite mineral | 70 μ l |

La reacción se sometió a los siguientes parámetros:

| Temperatura (C) | Tiempo (min) | ciclos (Núm.) |
|--------------------|-----------------|------------------|
| 92 | 5 | 1 |
| 92 | 1 | |
| Tm | 1 | |
| 72 | 1 | 30 |
| 72 | 15 | 1. |

El producto amplificado se observó en un gel de poliacrilamida al 6%.

MARCAJE DEL OLIGONUCLEOTIDO PARA LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA

El marcaje se realizó empleando el estuche *dsDNA cycle Sequencing System*.

Marcaje del oligo:

| | |
|---------------------------------------|-------------|
| -Solución amortiguadora de la quinasa | 1 μ l |
| -Oligo (1 pmol) | 1 μ l |
| - ³² P-dATP (0.5 μ Ci) | 0.5 μ l |
| -Enzima T4 polinucleotido quinasa | 1 μ l |
| -Cbp | 5 μ l |

1. Se incubó la reacción 30 min a 37 C.
2. Se reincubó la reacción durante 5 min a 55 C.
3. La reacción se centrifugó 3 seg y se colocó en hielo.
4. Se realizó la siguiente reacción:

| | |
|--------------------------|-----------|
| -Oligonucleótido marcado | 5 μ l |
|--------------------------|-----------|

- Sol. amortiguadora *Taq* DNA polimerasa 4.5 μ l
- DNA templado (50 fmol) 5 μ l
- Enzima *Taq* DNA polimerasa 0.5 μ l

5. Se mezcló bien, se centrifugó 3 seg y se colocó en hielo.

6. En un tubo *eppendorf* se pusieron 2 μ l de Terminador Mix de cada nucleótido (guanina, timina, adenina, citocina).

7. Se adicionaron 8 μ l de la reacción a cada tubo

8. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), con las siguientes constantes:

| Temperatura (C) | Tiempo (seg) | Ciclos (Núm.) |
|--------------------|-----------------|------------------|
| 93 | 30 | |
| Tm | 30 | |
| 70 | 60 | 20 |
| 93 | 30 | |
| 70 | 60 | 10 |

9. Se añadió el colorante para detener la reacción.

10. La muestra se calentó 5 min a 90 C.

11. Las muestras se separaron en un gel de acrilamida/urea 8M a 70 watts.

12. El gel se colocó en un sistema de secado con vacío por 1 h.

13. Se expuso el gel en un contenedor de película de rayos X.

14. La película se reveló después de una exposición de 12-16 h.

RESULTADOS

UTILIZACION DE LA SONDA LT/700

El plásmido pEWD299 (Fig. 1) fue digerido con *Hind* III, generando dos bandas de un peso molecular aproximado de 7.1 kb y 0.7 kb. El fragmento de 700 pb contiene la subunidad B (590 pb) y parte de la subunidad A (110 pb)⁴⁶.

El fragmento de 0.7 kb, al cual se le dominó sonda LT/700, se hibridó con ADNs, cortados con *Eco* RI, de *S. gallinarum* cepas FVB-323, FVB-285, FVB-591, ATCC 9184, mostrando dos bandas positivas con todas (Fig. 4), a excepción de la cepa ATCC 9184 que se caracteriza por la ausencia de plásmido.

Cuando se cortaron los ADNs de las cepas anteriormente mencionadas con *Hind* III, se observó una banda predominante de 2.5 kb, la cual hibridó con la sonda LT/700 del plásmido pEWD299 (Fig. 3).

Con base en el peso molecular, en el tamaño de la banda positiva a la hibridación, así como en la ausencia de hibridación de la cepa ATCC 9184, la cual carecía del plásmido de 2.5 kb, se dedujo que la hibridación se llevó a cabo con los plásmidos.

Sin embargo, cuando se realizó la hibridación de la sonda LT/700 contra los plásmidos de *S. gallinarum* y *S. pullorum* se observó una señal positiva, pero las cepas FVB-323 y FVB-383 presentaron dos señales más intensas y de mayor peso molecular, que no correspondían a los plásmidos (Fig. 5).

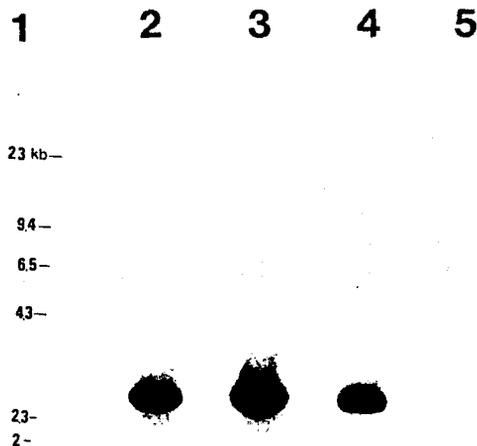


Fig. 3 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* de la sonda LT/700 contra ADN cortado con *Hind* III de *Salmonella gallinarum* cepas FVB-323 (carril 2), FVB-591 (carril 3), FVB-285 (carril 4), ATCC 9184 (carril 5). En el carril 1 se señalan los pesos moleculares, a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

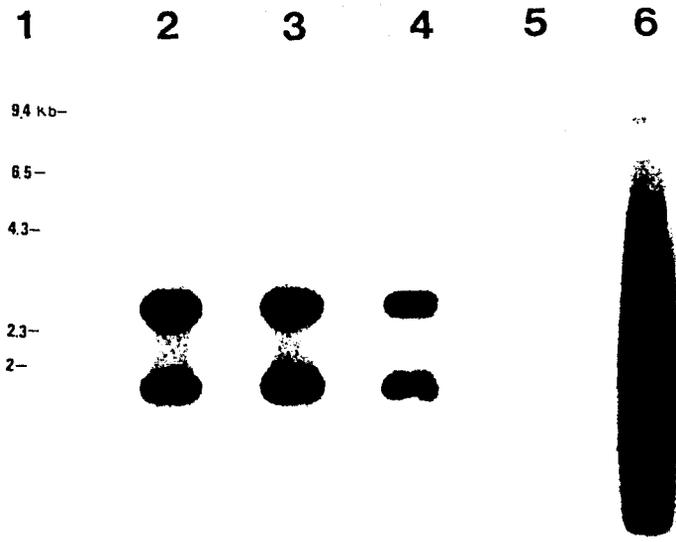


Fig. 4 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* de la sonda LT/700 contra ADN cortado con *Eco* RI de *Salmonella gallinarum* cepas FVB-323 (carril 2), FVB-591 (carril 3), FVB-285 (carril 4), ATCC 9184 (carril 5). Plásmido pEWD299 cortado con *Hind* III (carril 6). En el carril 1 se señalan los pesos moleculares, a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

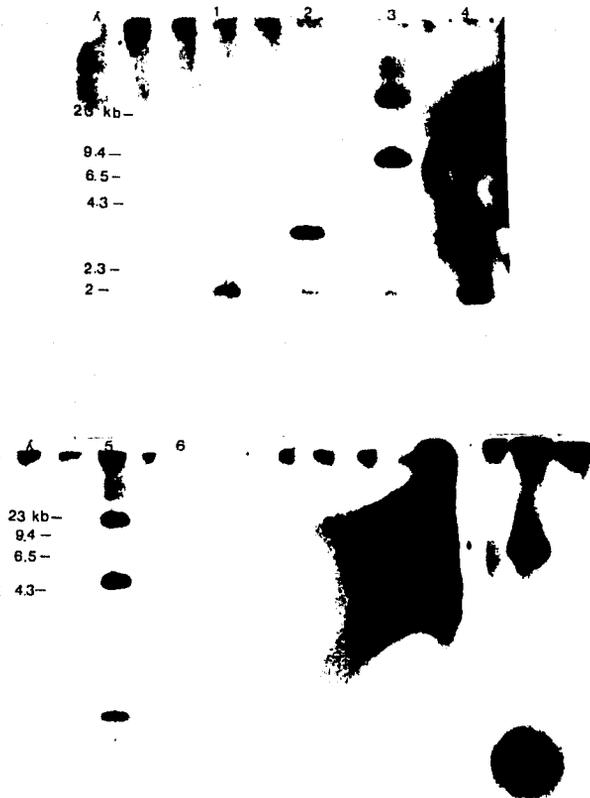


Fig. 5 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* de la sonda LT/700 contra ADN de plásmidos de *Salmonella gallinarum* cepas FVA-1 (carril 1), FVB-383 (carril 3), FVB- 323 (carril 5), ATCC 9184 (carril 6). *Salmonella pullorum* ATCC 10398 (carril 2). En el carril 7 se incluyó el plásmido pEWD299 cortado con *Hind* III. Los pesos moleculares se obtuvieron a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

Para determinar si las señales de hibridación de mayor peso molecular, observadas en la Fig.5, correspondían a plásmidos de mayor peso molecular, se purificaron plásmidos de peso molecular grande de *S. gallinarum* y *S. pullorum*. Estos plásmidos fueron hibridados con la sonda LT/700, incluyendo al plásmido pUC18, como control negativo. Los resultados de esta hibridación mostraron que los plásmidos de peso molecular pequeño retienen la sonda radioactiva inespecíficamente (Fig. 6 y 7). Otra demostración de esto se realizó hibridando ADN y plásmidos de *S. gallinarum* y *S. pullorum* con el plásmido pBR322 (Fig. 8 y 9). Al mismo tiempo se determinó que la sonda LT/700 no estaba contaminada con vector, ya que éste es un derivado de pBR322.

UTILIZACION DE LA SONDA *elt B-like* DE *S. typhi*.

Para llevar a cabo la hibridación con el gene *elt B-like* para la enterotoxina *LT-like* de *S. typhi*, se utilizó el plásmido pFF-14 (Fig. 2), digerido con las enzimas de restricción *Pst* I y *Pvu* I, dando origen a 3 bandas, de 1.5, 1.8 y 3.3 kb, aproximadamente. La banda de 3.3 kb contiene los genes para la síntesis de la subunidad B de la enterotoxina. Este fragmento fue hibridado con ADN, cortado con *Eco* RI, de *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. typhi* (Fig.10) incluyendo al plásmido pFF-14 como control positivo y al plásmido pUC18 como control negativo. La hibridación mostró un reconocimiento con el ADN de las diferentes salmonelas. Sin embargo, el resultado obtenido, aunque positivo, no indicaba necesariamente que la hibridación era con el gene *elt-B-like* en vista de que la sonda contenía ADN adicional de *S. typhi*. También se observó una hibridación con pUC18, lo cual sugirió un atrapamiento inespecífico.

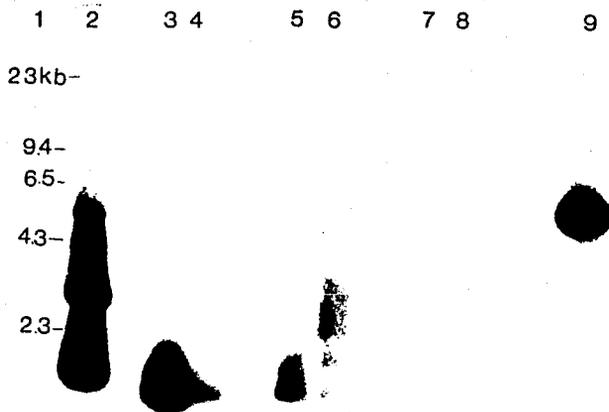


Fig. 6 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* de la sonda LT/700 contra ADN de plásmido (peso molecular grande) de *Salmonella gallinarum* cepas FVA-1 (carriles 3 y 4) y FVB-383 (carriles 7 y 8) y de *Salmonella pullorum* ATCC 10398 (carriles 5 y 6). En el carril 2 se incluyó el plásmido pUC18 y en el carril 9 el plásmido pEWD299 digerido con *Hind* III. En el carril 1 se señalan los pesos moleculares, a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

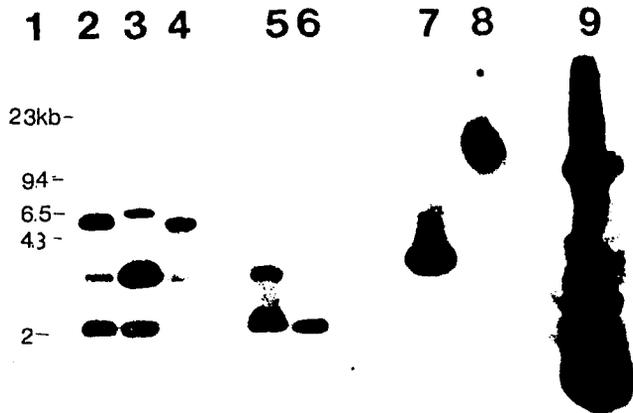


Fig. 7 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* de la sonda LT/700 contra ADN cortado con *Eco* RI de *Salmonella pullorum* (carril 2); *Salmonella gallinarum* cepas FVB- 383 (carril 5); Plásmidos cortados con *Hind* III de *Salmonella gallinarum* FVB-383 (carril 6); y *Salmonella pullorum* ATCC 10398 (carril 4). Plásmidos sin cortar de *Salmonella pullorum* (carril 3); Plásmido pUC18 (carril 7). *Escherichia coli* DH5-*alfa* (carril 8). Plásmido pEWD299 cortado con *Hind* III (carril 9). En el carril 1 se señalan los pesos moleculares, a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

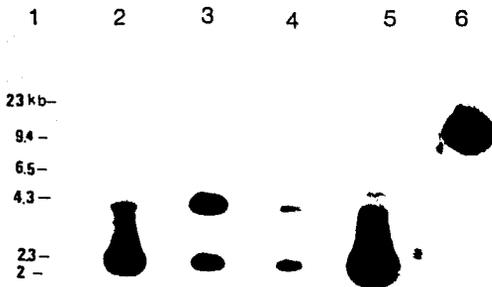


Fig. 8 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* del plásmido pBR322. contra ADN de plásmido de *Salmonella gallinarum* cepas FVA-1 (carril 2), FVB-383 (carril 4), y 9-R (carril 5); y *Salmonella pullorum* ATCC 10398 (carril 3). En el carril 6 se incluyó el plásmido pEWD299 digerido con *Hind* III. Los pesos moleculares, se obtuvieron a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

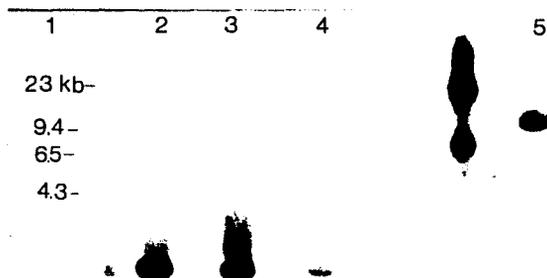


Fig. 9 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* del plásmido pBR322 contra ADN de plásmidos de *Salmonella gallinarum* cepas FVB-323 (carril 2), FVB-591 (carril 3), y FVB-285 (carril 4). En el carril 5 se incluyó el plásmido pEWD299 digerido con *Hind* III. Los pesos moleculares se obtuvieron a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

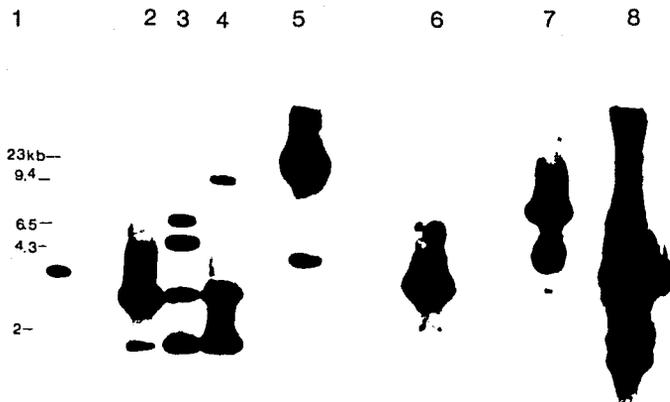


Fig. 10 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* del fragmento de aproximadamente 2.9 kb de la digestión del plásmido pFF-14 con *Puv* I y *Pst* I, contra ADN cortado con *Eco* RI de *Salmonella gallinarum* cepas FVA-1 (carril 2), y FVB-383 (carril 4); *Salmonella pullorum* ATCC 10398 (carril 3); y *Salmonella typhi* IMSS-1 (carril 5). Plásmido pEWD299 cortado con *Hind* III (carril 7). Plásmido pUC18 (carril 6). Plásmido pFF14 cortado con *Puv* I y *Pst* I (carril 8). En el carril 1 se señalan los pesos moleculares, a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

UTILIZACION DE OLIGONUCLEOTIDOS O PRIMERS

Para eliminar toda posibilidad de contaminación de la sonda LT/700 con el vector, se sintetizaron oligonucleotidos homologos a la secuencia de los genes *elt A*, y *elt B* de ETEC, y *elt B-like* de *S. typhi*. Los *primers* de *elt A* y *elt B*, se diseñaron a partir de la secuencia nucleotídica reportada por Spicer *et al.*,⁴⁶. Los *primers* del gene *elt B-like* se diseñaron a partir de la secuencia que probablemente codifica para la subunidad B⁴¹. Estos *primers* fueron utilizados para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La utilización de los *primers* de los genes *elt B* y *elt B-like*, no amplificaron el ADN de *S. gallinarum* y *S. pullorum*. Sin embargo, los resultados de la PCR fueron positivos para *S. gallinarum* cepas FVA-1 y FVB-383, y *S. pullorum* ATCC 10398, cuando se utilizaron los *primers elt A-1* y *elt A-2* (Fig. 11). El producto amplificado de 479 pb, a partir de ADN de *S. gallinarum* FVA-1, se utilizó como sonda para hibridar ADN y plásmidos, cortados con *Hind* III, de *S. gallinarum* y *S. pullorum*, incluyendo como control positivo al plásmido pEWD299, así como el producto de PCR de los diferentes ADNs de *S. gallinarum* y *S. pullorum*. Como control negativo se incluyó ADN, cortado con *Hind* III, de *E. coli* no enterotoxigénica y al plásmido pUC18. El resultado obtenido fue positivo con ADN de *S. gallinarum*, con bandas de aproximadamente 20 kb y 3.6 kb, y con ADN de *S. pullorum* con bandas de aproximadamente 15 kb y 3.6 kb (Fig. 12).

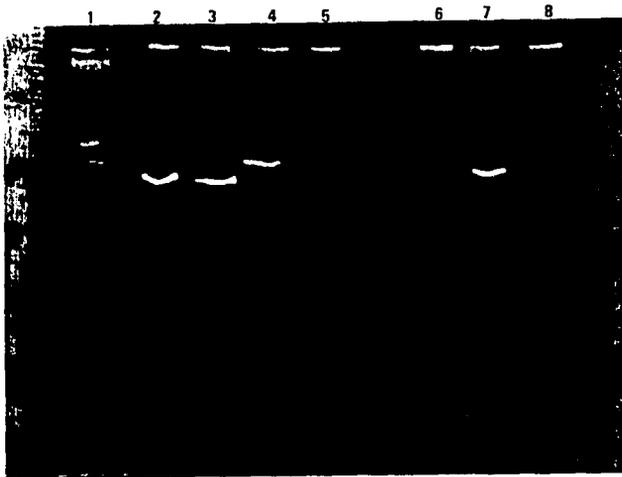


Fig. 11 Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ADN de *Salmonella gallinarum* cepas FVA-1 (carril 2), y FVB-383 (carril 4); *Salmonella pullorum* (carril 3); *Salmonella typhi* (carril 5); *Escherichia coli* DH5-alfa (carril 6); y Plásmido pEWD299 (carril 7). En el carril 8 se incluyó una reacción sin ADN. En el carril 1 se muestran los pesos moleculares a partir de *ladder* de 1 kb.

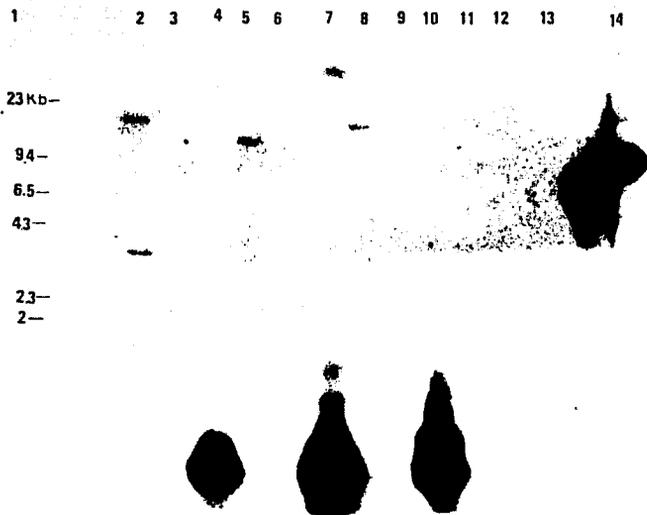


Fig. 12 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* del producto amplificado de *Salmonella gallinarum* FVA-1, con los oligonucleótidos *elt A-1* y *elt A-2*, contra ADN cortado con *Hind* III, de *Salmonella gallinarum* cepas FVA-1 (carril 2) y FVB-383 (carril 8), *Salmonella pullorum* ATCC 10398 (carril 5), *Salmonella typhi* IMSS-1 (carril 13), *Escherichia coli* DH5-alfa (carril 11). Plásmidos cortados con *Hind* III de *Salmonella gallinarum*, cepas FVA-1 (carril 3) y FVB-383 (carril 9), *Salmonella pullorum* ATCC 10398 (carril 6); Plásmido pEWD299 cortado con *Hind* III (carril 14); Plásmido pUC18 (carril 12). En los carriles 4, 10 y 7 se incluyeron los productos amplificados a partir del ADN de *Salmonella gallinarum*, cepas FVA-1 y FVB-383, y de *Salmonella pullorum* ATCC 10398, respectivamente. En el carril 1 se señalan los pesos moleculares a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.

El producto amplificado mediante *PCR*, a partir de *S. gallinarum* FVA-1, fue hibridado con ADN de *S. gallinarum* FVA-1 cortado con diferentes enzimas de restricción, *Bam* HI, *Eco* RV, *Sal* I, *Sma* I, *Pst* I, *Sty* I, *Ssp* I, para determinar el polimorfismo de restricción del fragmento (Fig. 13). Con ninguna de las enzimas empleadas se detectó un fragmento único.

Al utilizar ADN de diferentes salmonelas como templado para realizar *PCR* con los *primers* del gene *elt A* (*elt A-1* y *elt A-2*), se observó un producto de amplificación, a partir del ADN de *S. enteritidis* y *S. worthington* (Fig. 14). Este resultado indicó que las especies positivas comparten similitud génica a ese nivel.

El producto amplificado mediante *PCR*, a partir del ADN de *S. gallinarum* FVA-1, fue secuenciado y alineado con los fragmentos correspondientes de los genes *elt A* de *ETEC* y *ctxA* de *V. cholerae*, mostrando una similitud de 95 y 83%, respectivamente (Fig. 15, tabla 1).

Así mismo, se comparó la secuencia deducida de amino ácidos con las reportadas para las subunidades LT-A de *ETEC* y CT-A de *V. cholerae*, mostrando similitudes del 88 y del 91% respectivamente (Fig. 16, tabla 1).

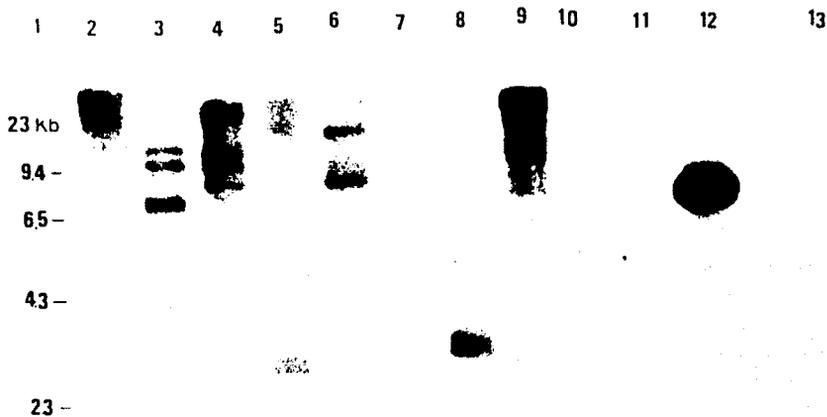


Fig. 13 Autorradiograma de la hibridación tipo *Southern* del producto amplificado de *Salmonella gallinarum* cepa FVA-1, con los oligos *elt A-1* y *elt A-2* contra ADN de *Salmonella gallinarum* FVA-1 cortado con *Bam* HI (carril 2y9), *Eco* RV (carril 3), *Sal* I (carril 4), *Sma* I (carril 5), *Pst* I (carril 6), *Sty* I (carril 7), *Ssp* I (carril 8), y de *Escherichia coli* DH5-*alfa* cortado con *Hind* III (carril 11); plásmido pUC18 cortado con *Hind* III (carril 10), y plásmido pEWD299 cortado con *Hind* III (carril 12). En el carril 1 se señalan los pesos moleculares a partir del fago lambda digerido con *Hind* III.



Fig. 14 Producto obtenido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN de *Salmonella pullorum* (carril 2), *S. enteritidis* (carril 3), *S. typhi* IMSS-1 (carril 4), *S. typhimurium* LT2 (carril 5), *S. arizonae* (carril 6), *S. worthington* (carril 7), *S. gallinarum* FVA-1 (carril 10) y el plásmido pEWD299 (carril 7). En el carril 9 se indujo una reacción sin ADN. En el carril 1 se muestran los pesos moleculares a partir de *ladder* de 1 kb.

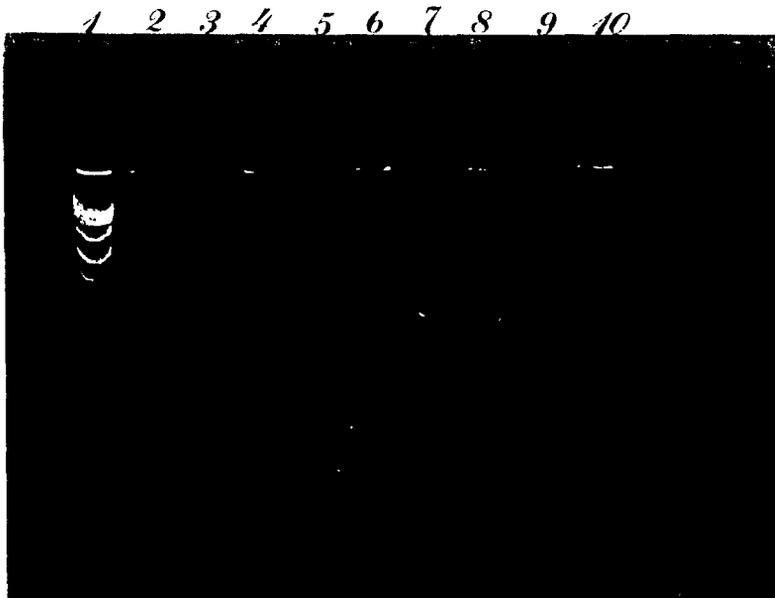


Fig. 14 Producto obtenido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN de *Salmonella pullorum* (carril 2), *S. enteritidis* (carril 3), *S. typhi* IMSS-1 (carril 4), *S. typhimurium* LT2 (carril 5), *S. arizonae* (carril 6), *S. worthington* (carril 7), *S. gallinarum* FVA-1 (carril 10) y el plásmido pEWD299 (carril7). En el carril 9 se indujo una reacción sin ADN. En el carril 1 se muestran los pesos moleculares a partir de *ladder* de 1 kb.

| | | |
|---------------------------|---|-----|
| <i>E. coli</i> eltA | T A T T G A G T A C T T G A T A G A G G A C T C A A A T G A A T A T T A A T C T T T A T G A T C | 50 |
| <i>V. cholerae</i> ctxA | A A T T G A G T A C T T T G A C C G A G G A C T C A A A T G A A T A T C A A A C T T T A T G A T C | 49 |
| <i>S. gallinarum</i> eltA | T A T T G A G T A C T T G A T A G A G G A C T C A A A T G A A T A T T A A T C T T T A T G A T C | 50 |
| Consensus | T A T T G A G T A C T T T G A T A G A G G A C T C A A A T G A A T A T T A A A C T T T A T G A T C | 50 |
| | | |
| <i>E. coli</i> eltA | A G C C A G A G G A A C A C A F A C G G C T T T G T C A G A T A T G A T G A G G A T A T G T T | 100 |
| <i>V. cholerae</i> ctxA | A T G C A G A G G A A C T C A C A C G G T T T T G T T A G C A C A G A T G A T G G A T A T G T T | 99 |
| <i>S. gallinarum</i> eltA | A G C C A G A G G A A C A C A F A C G G C T T T G T C A G A T A T G A G G A T A T G T T | 100 |
| Consensus | A T G C A G A G G A A C A C A F A C G S M T T T G T A G R Y A T G A T G A W G A T A T G T T | 100 |
| | | |
| <i>E. coli</i> eltA | T C C A C T C T C T T A G T T T G A G A A G T G C C A C T T A G C A G G C A S T A T A T A T T | 150 |
| <i>V. cholerae</i> ctxA | T C C A C T C A A T T A G T T T G A G A A G T G C C A C T T A G T G G G C A A A C T A T A T T | 149 |
| <i>S. gallinarum</i> eltA | T C C A C T T C T T T A G T T T G A G A A G T G C C A C T T A G C A G G A C A S T C T A T A T T | 149 |
| Consensus | T C C A C T C T C H T T A G T T T G A G A A G T G C C A C T T A G Y R G G C A R W T A T A T T | 150 |
| | | |
| <i>E. coli</i> eltA | A T C H G G A T A T T C A C T T A T A T A T A T C G T T A T A G C A A A T C A A A T | 190 |
| <i>V. cholerae</i> ctxA | G T C H G G T C A T T C A C T T A T A T A T A T G T T A T A G C C A C T G C A C C A A C | 198 |
| <i>S. gallinarum</i> eltA | A T C H G G A T A T T C A C T T A T A T A T A T G T T A T A G C G A C A G C A C C A A A T | 198 |
| Consensus | R T C H G Y M A T T C M A C T T A T A T A T A T C G T T A T A G C S A C W G C A C C A A A Y | 200 |
| | | |
| <i>E. coli</i> eltA | A T G T T T A A A G T T A A T G A T G T A A T T A G G G D A T A C A G C C C T A C C A T A T G A | 240 |
| <i>V. cholerae</i> ctxA | A T G T T T A A A G T T A A T G A T G T A A T T A G G G D A T A C A G C C C T A C C A T A T G A | 248 |
| <i>S. gallinarum</i> eltA | A T G T T T A A A G T T A A T G A T G T A A T T A G G G D A T A C A G C C C T A C C A T A T G A | 248 |
| Consensus | A T G T T T A A A G T T A A T G A T G T A A T T R G G E M A T A C A G C C C T A C C A T A T G A | 250 |
| | | |
| <i>E. coli</i> eltA | A C A G A G A G T T C T G C T T A G G T G G A T T C C A T A T T C T C A G A T A T A T G G A T | 290 |
| <i>V. cholerae</i> ctxA | A C A G A G A G T T C T G C T T A G G T G G G A T T C C A T A C T C C A A A T A T A T G G A T | 298 |
| <i>S. gallinarum</i> eltA | A C A G A G A G T T C T G C T T A G G T G G A T T C C A T A T T C T C A G A T A T A T G G A T | 298 |
| Consensus | A C A G A G A G T T C T G C T T A G G T G G A T T C C A T A T C M C A R A T A T A T G G A T | 300 |
| | | |
| <i>E. coli</i> eltA | G G T A T C G T G T T A T T T T G G T G T G A T T G A T G A | 321 |
| <i>V. cholerae</i> ctxA | G G T A T C G A G T T C A T T T T G G G G T G C T T G A T G A | 329 |
| <i>S. gallinarum</i> eltA | G G T A T C G T G T T A T T T T G G T G T G A T T G A T G A | 329 |
| Consensus | G G T A T C G A G T T A T T T T T G G K G T G A T T G A T G A | 331 |

A=adenina, G=guanina, C=citocina, T=tiamina.

R=A ó G, Y=C ó T, M=A ó C, K=G ó T, S=C ó G, W=A ó T, H=A ó C ó T.
B=C ó G ó T, V=A ó C ó G, D=A ó G ó T, N=A ó C ó G ó T.

Fig. 15 Alineamiento nucleotídico del producto amplificado mediante PCR a partir del ADN de *Salmonella gallinarum* FVA-1, alineado con los fragmentos correspondiente de los genes *elt A* de *Escherichia coli* enterotoxigénica (*ETEC*) con y *ctxA* de *Vibrio cholerae* mostrando similitudes de 95 y 83% respectivamente.

| | | |
|---------------------------|----------------------------------|-----|
| <i>E. coli</i> LT-A | NEYFDRGTQM NINLYDHARG TQTGFVRMDD | 30 |
| <i>S. gallinarum</i> LT-A | NEYFDRGTQM NINLYDHARG TQTGFVRMDD | 30 |
| <i>V. cholerae</i> CT A | SEYFDRGTQM NINLYDHARG TQTGFVRHDD | 30 |
| Consensus | NEYFDRGTQM NINLYDHARG TQTGFVRMDD | 30 |
| | | |
| <i>E. coli</i> LT-A | GYVSTSLSLR SAHLAQOMIL SGMS-LTIYI | 59 |
| <i>S. gallinarum</i> LT-A | GYVSTSLSLR SAHLAQOSIL SGMSITYIYV | 60 |
| <i>V. cholerae</i> CT A | GYVSTSLSLR SAHLVQOIIIL SGHSTYIYV | 60 |
| Consensus | GYVSTSLSLR SAHLAQO IL SGMSITYIYV | 60 |
| | | |
| <i>E. coli</i> LT-A | V--IANMFNV NDVLGVYSPH PMEQEVSALG | 87 |
| <i>S. gallinarum</i> LT-A | IATAFNMFNV NDVLGVYSPH PMEQEVSALG | 90 |
| <i>V. cholerae</i> CT A | IATAFNMFNV NDVLGAYSPH PDEQEVSALG | 90 |
| Consensus | IATAFNMFNV NDVLGVYSPH PMEQEVSALG | 90 |
| | | |
| <i>E. coli</i> LT-A | GIPYSQIYGW YRVNFGVLD | 106 |
| <i>S. gallinarum</i> LT-A | GIPYSQIYGW YRVNFGVLD | 109 |
| <i>V. cholerae</i> CT A | GIPYSQIYGW YRVHFGVLD | 109 |
| Consensus | GIPYSQIYGW YRVNFGVLD | 109 |

Fig. 16 Alineamiento de los amino ácidos deducida a partir del producto de amplificación obtenido mediante PCR a partir del ADN de *Salmonella gallinarum* FVA-1, mostrando una similitud del 91% y 88% con los fragmentos correspondientes de las subunidades CT A de *Vibrio cholerae* y LT A de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), respectivamente.

| | <i>E. coli elt A</i> | <i>V. cholerae ctxA</i> |
|--|----------------------|-------------------------|
| <i>S. gallinarum elt A</i> (nucleótidos) | 95 % | 83 % |
| <i>S. gallinarum elt A</i> (amino ácidos) | 88 % | 91 % |

Tabla 1 Porcentaje de similitud en nucleotidos y amino ácidos del fragmento secuenciado del gene *elt A-like* de *Salmonella gallinarum* comparado con los genes *elt A* de *Escherichia coli* enterotoxigénica y *ctxA* de *Vibrio cholerae*.

DISCUSSION

Preliminarmente, cuando se utilizó la sonda LT/700 contra ADN cortado con *Hind* III, de diferentes cepas de *S. gallinarum* y de *S. pullorum* se observó una hibridación de 2.5 kb en las diferentes cepas utilizadas excepto en *S. gallinarum* ATCC 9184 (Fig. 3).

Nuestras observaciones demostraron (Fig. 5) que cuando se hibridaron los plásmidos de *S. gallinarum* y de *S. pullorum*, de peso molecular pequeño con la sonda LT/700, se puede retener la marca de manera inespecífica. Lo anterior se comprobó mediante la hibridación de los plásmidos contra el plásmido pBR322 (Fig. 8). Sin embargo, con la sonda LT/700, se observaron hibridaciones que no correspondieron a los plásmidos como es el caso de las cepas FVB-383 y FVB-323 (Fig. 5), en donde se apreciaron hibridaciones a un nivel de 9.4 kb y 23 kb con la cepa FVB-383 y 5 kb, 23 kb aproximadamente con la cepa FVB-323. Estas hibridaciones fueron más potentes que la de los plásmidos, aún al lavar el filtro bajo condiciones más estrictas. Además, estas señales no se observaron cuando se hibridó con el plásmido pBR322. Lo cual indicó que existía un reconocimiento diferente al de la sonda LT/700.

El hecho de que solo en dos cepas se observaron estas hibridaciones, sugiere que se podría deber al grado de pureza de la separación del ADN cromosomal con el ADN de plásmido²².

Previamente, Barrow *et al.*, en 1987¹, habían demostrado la contribución de un plásmido de peso molecular grande (85 kb) en la virulencia de *S. gallinarum*, por lo cual se planteó el aislamiento de plásmidos de peso molecular grande para determinar si hibridaban con la sonda LT/700. Los resultados obtenidos indicaron que la sonda

radioactiva fue atrapada inespecíficamente por los plásmidos de peso molecular pequeño, para lo cual se utilizó un plásmido de 2.68 kb, pUC18, como control negativo.

Por otra parte para eliminar la posibilidad de que la sonda LT/700 estuviera contaminada con el vector pBR313 y éste estuviera hibridando con el plásmido pUC18, se sintetizaron *primers* a partir de la secuencia de los genes *elt A*⁴⁶ y *elt B*⁹.

Alternativamente, para comprobar la existencia de una enterotoxina similar a la toxina de *S. typhi*¹¹, se utilizó el plásmido pFF-14 que codifica para la subunidad B de la enterotoxina LT-like⁴¹. La digestión de pFF-14 con *Pst* I y *Pvu* I generó tres bandas de 1.5, 1.8 y 3 kb. La hibridación de la banda 3 kb con el pUC18 en la Fig. 10 se pudo deber, parcialmente a que la sonda pudiera estar contaminada con el vector. La hibridación observada con el ADN de las diferentes salmonelas pudo ser causada por un reconocimiento de ADN tanto para la síntesis de la subunidad B como para ADN críptico, debido a que la sonda contiene ADN que no pertenece al gene de la enterotoxina⁴¹.

Por lo tanto, para descartar que la sonda estuviera contaminada con el vector, así como de ADN diferente al deseado, se sintetizaron oligonucleicos o *primers* a partir de la secuencia de la subunidad B de la enterotoxina LT-like en *S. typhi*⁴¹.

Los resultados fueron negativos cuando se utilizaron los *primers* de la subunidad *elt B* de ETEC y *elt B LT-like*, de *S. typhi*, lo cual sugiere que *S. gallinarum* puede tener afinidad con otro tipo de receptor celular, como es el caso de las enterotoxinas lábiles al calor LT IIa y LT IIb¹⁶ de *E. coli*, que a pesar de ser muy similares a CT y LT-I²⁰, las homología encontradas en estos genes son para la región del gene A, que catalizan la

actividad enzimática¹⁸. Además, se ha reportado que *S. typhi* no se une a los receptores gangliósidos GM1 en ELISA¹¹.

La utilización de los *primers elt A-1* y *elt A-2* permitió la amplificación por PCR de un producto en *S. gallinarum* y *S. pullorum* (Fig. 11 y 14). Estos *primers* sobreponen el codon para un ácido glutámico en la posición 112 N-terminal, lo cual es importante para la expresión de la actividad biológica⁴⁷.

El perfil de hibridación del producto amplificado a partir de *S. gallinarum* contra ADN de *S. gallinarum* y *S. pullorum* fue muy parecido. Esto confirma, de manera puntual, las grandes similitudes que existen entre ambas bacterias^{1,20}. Así mismo, se observó una débil señal con el ADN de *S. typhi*, por lo cual no se descarta que exista una similitud, aunque no muy alta contra el gene correspondiente.

Las hibridaciones fueron detectadas a nivel de 20 y 3.6 kb, lo cual sugiere que el gene puede ser localizado en ADN cromosomal, debido a que no se observó señal en los plásmidos (Fig. 12), lo cual podría ser similar a *V. cholerae* y *Salmonella typhimurium*, que presentan el gene para la enterotoxina en ADN cromosomal⁶ a diferencia de ETEC que se localiza en plásmido²⁷. Así mismo, la señal de aproximadamente 2.5 kb que se detecta con la sonda LT/700, si podría tratarse de una señal positiva, pero encubierta por la retención inespecífica de la marca ocasionada por los plásmidos.

El *primer elt A-1* utilizado para la amplificación del gene *elt-A like*, lleva los nucleótidos para una arginina, la cual es muy conservada en los genes de las toxinas CT, LT y en la toxina de *Bordetella pertussis*. La alteración de éste aa, reduce la actividad enzimática de la toxina²⁴.

El segmento del gene *elt A-like* de *S. gallinarum* fue secuenciado y alineado con los genes *elt A* y *ctxA*. La secuencia nucleotídica y la deducción de aa, se muestran en las Fig. 15 y 16. La secuencia de 329 pb que corresponden a 109 aa, presentaron un porcentaje del 80% entre los tres genes.

Las bases 186-195 del gene *elt A-like* de *S. gallinarum* no están presentes en el gene *elt A*, pero tienen un porcentaje del 78% de similitud con el gene *ctxA*.

La secuencia de aa indica que el fragmento amplificado de *S. gallinarum* tiene una mayor similitud con *ctxA* (Fig. 16, Tabla 1) que con *elt A*. El cambio de porcentaje de similitud de nucleótidos en aa del fragmento secuenciado de *S. gallinarum* con los genes *elt A* y *ctx*, se debe principalmente al inserto (186-195) que se comparte entre *elt-A like* de *S. gallinarum* y *ctxA* (Fig. 15). Además, algunos cambios puntuales con *ctxA* y no con *elt A* son en codones con diferencias en el tercer nucleótido, los cuales sintetizan para un mismo aa.

Se observó que el fragmento amplificado de *S. gallinarum* codifica para un ácido glutámico en los nucleótidos 145-147, el cual es importante en *elt A* para la actividad enterotoxigénica de la bacteria⁴⁷. En *ctxA* la secuencia es diferente, pero a pesar de la diferencia nucleotídica, este codón también codifica para el ac. glutámico.

La mayor conservación de *elt-A like* con *ctxA* es a nivel de aa, así como el hecho de que ambos genes están en ADN cromosomal, a diferencia de lo que sucede con *E. coli*, donde solo algunas cepas, las *ETEC*, llevan el gene, pero en plásmidos²⁷. Esto sugiere que *elt-A like* de *S. gallinarum*, a nivel filogenético, podría estar más cercano a CT-A que a LT-A.

La importancia de la participación de una enterotoxina en la patogénesis de la enfermedad, radica en que las toxinas son candidatos atractivos para su uso potencial como antígenos, ya que muchas de ellas son excelentes inmunógenos, como sucede en el caso de las vacunas polivalentes recombinantes en contra de cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* K-88, K-99 y 987P, que son usadas para prevenir de manera eficaz la adherencia, colonización bacteriana, así como la enfermedad en los lechones⁷.

Sin embargo, es necesario llevar a cabo la secuenciación completa del gene *elt-A like* y determinar si codifica para un producto proteico con actividad biológica, ya que recientemente en un trabajo paralelo con lisados celulares de *S. gallinarum* FVA-1 se determinó que existe actividad enterotóxica en ensayos de asa intestinal ligada de rata.

Por otra parte, también es importante la búsqueda y definición del gene que codifica para la subunidad B.

CONCLUSIONS

-*Salmonella gallinarum* presenta una secuencia nucleotídica homóloga con un fragmento del gene *elt A* de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y con el gene *ctxA* de *Vibrio cholerae*.

-El segmento de 479 pb, amplificado por PCR, a partir de ADN de *Salmonella gallinarum* hibridó con bandas de 20 kb y 3.6 Kb, cuando el ADN fué cortado con *Hind III*.

-El alineamiento nucleotídico del fragmento amplificado de *S. gallinarum* mostró una similitud del 95% con el gene *elt A* y del 83% con el gene *ctxA*.

-La secuencia deducida en aa del fragmento amplificado de *S. gallinarum*, mostró una similitud del 88% cuando se comparó con la proteína LT-A y del 91% con CT-A.

LITERATURA CITADA

1. Barrow, A.P. and Simpson, M.J.: Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect. Immun.* 55:388-392 (1987).
2. Becerril, F. M.: Técnicas de diagnóstico oficiales para *Salmonella* y Newcastle. Curso sobre Diagnóstico de Laboratorio para la Campaña de Enfermedad de Newcastle y Salmonelosis Aviar. ANECA. México, D.F., 1993.
3. Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.C., Bayer, H.W., Crosa, J.H. and Falkow, S.: Construction and characterization of new vehicles.II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113 (1977).
4. Calnek, B.W. and Barnes, H.: Diseases of Poultry. 9th Ed. *Iowa State University Press*, U.S.A., 1991.
5. Chopra, A.K., Houston, C., Peterson, J.W., Prasad, R. and Mekalanos, J.: Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin Gene.J. *Bacteriol.* 169:5095-5100 (1987).
6. Chopra, A.K., Peterson, J.W., Houston, C.W., Pericas, R. and Prasad, R.: Enterotoxin-associated DNA sequence homology between *Salmonella* species and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. lett.*, 77 :133-138 (1991).
7. Current protocols in molecular biology, Vol. I y II edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Green, Wiley, Interscience.(1990)
8. Dallas, W.S., Gill, D.M. and Falkow, S.: Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. *J. Bacteriol.*, 139:850-858 (1979).
9. Dallas, W.S. and Falkow, S.: Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature*, 28:499-500 (1980).
10. Eidels, L., Proia, R.L. and Hart, D.A.: Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.*, 47:596-620 (1983).
11. Fernández, M., Sierra-Madero, De la Vega, H., Vázquez, M., López-Vidal, Y., Rufz-Palacios and Calva, E.: Molecular cloning of a *Salmonella typhi* LT-like enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.*, 2:821-825 (1988).
12. Finkelstein, R., Burks, M., Zupan, A., Dallas, W. and Chaim, J.: Epitopes of the cholerae family of enterotoxins. *Rev. Infect. Dis.*, 9:544-561 (1987).

13. Finkelstein, R.A., Burks, M.F., Zupan, A., Dallas, W.S., Chaim, O.J. and Ludwig, D.S.: Antigenic determinants of the cholera/coli family of enterotoxins. *Rev. Infect. Dis.*, 9:5490-5502 (1987).
14. Finlay, B.B. and Falkow, S.: Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.*, 53:210-230 (1989).
15. Fishman, P.H., Moss, J. and Osborne, J.C.: Interaction of cholera gen with the oligosaccharide of ganglioside GM1: evidence for multiple oligosaccharide binding sites. *Biochem.*, 17: 711-715 (1978).
16. Fukuta, S., Magnani, J.L., Twiddy, E.M., Holmes, R.K. and Ginsburg, V.: Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect. Immun.*, 54:1748-1753 (1988).
17. García, V.M.G., Zarate, P.S.E., Calva, M.E. y Berruecos, V.J.M.: Ingeniería Genética Molecular en Medicina Veterinaria. *Universidad Nacional Autónoma de Chiapas, México*, 1991.
18. Gill, D.M. and Richardson, S.H.: Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 141:64-70 (1980).
19. Gordon, R.F.: Enfermedades de las Aves. *El Manual Moderno*. México, D.F., 1980.
20. Holmes, R.K., Twiddy, E.M. and Pickett, C.L.: Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 53:464-473 (1986).
21. Honda, T., Tsuji, T., Takeda, Y. and Miwatani, T.: Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 34:337-340 (1981).
22. Kado, C.I. and Liu, S.T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145:1365-1373 (1981).
23. Koupal, L.R. and Deibel, R.H.: Assay characterization and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.*, 11:14-22 (1975).
24. Labet, Y., Christopher, W.C. and Cieplak, W. Jr.: Effect of site-directed mutagenic alterations on ADP-ribosyltransferase activity of the A subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.*, 59:2870-2879 (1991).
25. Le Minor, L.: Bergery's Manual of Systematic Bacteriology, edited by Kregg, N.R. & Holt, J.G. (*Willimas & Wilkins, Baltimore*) 2:427-458 (1984).

26. Macario, A.J.L. and Conway, d' M. E.: Monoclonal Antibodies Against Bacteria. Vol. III, *Academic Press., INC, U.S.A., 1986.*
27. Mazaitis, A. J., Maas, R. and Werner, M.: Structure of a naturally occurring plasmid with genes for enterotoxin production and drug resistance. *J. Bacteriol., 145:97-105 (1981).*
28. Molina, N.C. and Peterson, J.W.: Cholera toxin-like toxin released by *Salmonella* species in the presence of mitomycin C. *Infect. Immun., 30:224-230 (1980).*
29. Moseley, S.L. and Falkow, S.: Nucleotide sequence homology between the heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* deoxyribonucleico acid. *J. Bacteriol., 144:444-446 (1980).*
30. Mosqueda, A. y Lucio, B.: Enfermedades comunes de las Aves Domésticas. *Fac. de Med. Vet. y Zoot., UNAM., México, D.F., 1985.*
31. Mosqueda, T.A.: Salmonelosis en pollo de engorda. I Jornada Médico-Avícola. México, D.F., 1990. Depto. de Aves. *Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México, (1990).*
32. Padrón, N.M.: Control y prevención de la tifoidea aviar en aves reproductoras pesadas. II Jornada Médico Avícola. México, D.F., 1991. *Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM. México, D.F., 1991.*
33. Padrón, N. M.: Bacteriología y serología diagnóstica de tifoidea aviar. Memorias del curso sobre diagnóstico de laboratorio para la campaña de enfermedad de Newcastle y Salmonelosis aviar. México, D.F., 1993. *ANECA., México, (1993).*
34. Suárez, G.F.: Mecanismos de patogenisidad bacteriana. En: Bacteriología general principios químicos biológicos. Editado por Pérez, M.J., Suárez, G.F. y Flores, C.R. 363-399. *Fac. Med. Vet. y Zoot., UNAM, México, D.F., 1990.*
35. Pickett, C.L., Twiddy, E.M., Belisle, B.W. and Holmes, R.K.: Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol., 165:348-352 (1986).*
36. Prasad, R., Chopra, A.K., Chary, P. and Peterson, J.W.: Expression and characterization of the cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin. *Microbiol. Pathogen. 13:109-121 (1992).*
37. Puente, J.L., Verdugo-Rodríguez, A. and Calva, E.: Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol. Microbiol., 5:1205-1210 (1991).*
38. Roy, S.K., Speelman, P., Butler, T., Nath, S., Rahman, H. and Stoll, B.J.: Diarrhea associated with typhoid fever. *J. Infect. Dis., 151:1138-1143 (1985).*

39. Ruttler, J.M.: Bacterial toxins as virulence determinants for veterinary pathogens: an Overview. In: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. Edited by: Roth J.A., 213-227. *American Society of Microbiology*, Iowa State University, U.S.A., 1988.
40. Sadruddin, F.H. and Jiwa: Probing for enterotoxigenicity among the *Salmonellae*: an evaluation of biological assays. *J. Clin. Microbiol.*, 14:463-472 (1981).
41. Sánchez, L. F.: Caracterización del gene de la enterotoxina de *Salmonella typhi*-SE. Tesis de Licenciatura. *Universidad Autonoma del Estado de Morelos*, Cuernavaca., Morelos, 1991.
42. Sandefur, P.D. and Peterson, J.W.: Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 14:671-676 (1976).
43. Sandefur, P.D. and Peterson, J.W.: Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. *Infect. Immun.*, 15:988-992 (1977).
44. Shinji, F., Magnani, J.L., Twiddy, E.M., Holmes, R.K. and Ginsburg, V.: Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. LT-I, LT-IIa and LT-IIb. *Infect. Immun.*, 52:1748-1753 (1988).
45. Smith, I.M., Licence, S.T. and Hill, R.: Hematological, serological and pathological effects in chicks of one or more intravenous injections of *Salmonella gallinarum* endotoxin. *Res. Vet. Sci.*, 24:154-160 (1978).
46. Spicer, E.K. and Noble, J.A.: *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Biol. Chem.*, 257:5716-5721 (1982).
47. Tsuji, T., Inone, T., Miyama, A., Okamoto, K., Honda, T. and Miwatani, T.: A single amino acid substitution in the A subunit of *Escherichia coli* enterotoxin results in a loss of its toxic activity. *J. Biol. Chem.*, 256:22520-22525 (1990).
48. Verdugo-Rodríguez, A., López-Vidal, Y., Puente, J.L., Ruíz-Palacios, G.M. y Calva, E.: Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 12:248-253 (1993).
49. Yang, M.K. and Tan, M.S.: Characterization and cloning of enterotoxin gene of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. Roc.*, 13:109-118 (1989).