



01690
4
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

150 AÑOS.

POSGRADO: DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS

**CLONACION Y CARACTERIZACION DE LOS GENES
QUE EXPRESAN UNA ENTEROTOXINA SIMILAR A LT EN**

Salmonella gallinarum.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JESUS

VAZQUEZ

NAVARRETE

TUTOR

DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACIÓN DISCONTINUA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. 150 AÑOS.

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.**

COMITÉ TUTORAL.

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ (TUTOR).
Profesor e investigador de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
UNAM.

DR. FRANCISCO SUÁREZ GUEMES.
Profesor e investigador de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
UNAM

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL.
Profesora e investigadora de la Facultad de Medicina, UNAM

DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA.
Investigador del Instituto de Biotecnología, UNAM

DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS.
Profesor e investigador de la Facultad de Medicina UNAM.

DRA. EMMA ISABEL MELENDRO LOZANO.
Facultad de Medicina, UNAM.

 **DR. JOSÉ ÁNGEL GUTIÉRREZ PABÉLLO.**
Profesora e investigadora de la Facultad de Medicina Veterinaria
Y Zootecnia UNAM. 

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

La tifoidea aviar (TA) es producida por *Salmonella enteritidis* serotipo *Gallinarum*, altamente contagiosa que afecta a aves de todas las edades. Esta enfermedad causa un impacto económico entre los avicultores del país y su control es una prioridad sanitaria avícola. La TA se caracteriza por producir una diarrea acuosa de color blanco-verdosa, similar a la producida por la toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae* y la toxina termolábil (LT) *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). La toxina CT es codificada por los genes *ctxAB* localizados en el bacteriófago CTX Φ integrado en el cromosoma y tiene un peso molecular de 84 kDa. La toxina LT tiene un peso de 86 kDa y es codificada por los genes *eltAB* localizados en un plásmido. El objetivo del presente trabajo fue identificar, clonar y caracterizar los genes que codifican para una enterotoxina *LT-like* de *S. gallinarum* y estudiar la actividad biológica de su producto recombinante en cultivos celulares y en asas intestinales ligadas. Los genes fueron amplificados del genoma y de plásmidos de *S. gallinarum* mediante una reacción en cadena de la polimerasa. El fragmento amplificado para estos genes fue de 1,275 pb y por separado, el fragmento para el gen *eltA-like* fue de 795 pb, mientras que para el gen *eltB-like* fue de 372 pb. El alineamiento de la secuencia nucleotídica de los genes *eltAB-like* mostró una identidad del 98% con los genes *eltAB* y un 79% con los genes *ctxAB*. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica de los genes *eltAB-like*, mostró una identidad del 93% para LT-A y 95% para LT-B de ETEC. Con respecto a la toxina CT de *V. cholerae*, la identidad fue de 75% para CT-A y 79% para CT-B. El peso molecular de las subunidades *LT-A like* y *LT-B like* de las toxinas recombinante y nativa de *S. gallinarum* fue aproximadamente de 28 kDa y 11 kDa, respectivamente. Las toxinas *LT-like* recombinante y nativa de *S.*

gallinarum, poseen características fisicoquímicas similares a la toxina CT, ya que fue termolábil a 56°C por 15 min, se inactivó con proteinasa K, fue neutralizada con anticuerpos policlonales contra la toxina CT y hemoaglutinó eritrocitos de conejo. La toxina purificada *LT-like* recombinante y nativa de *S. gallinarum* provocó elongación a las 9 h en células CHO y Vero. Las toxinas *LT-like* recombinante y nativa inoculadas en las asas intestinales ligadas de conejo y pollo, provocaron hipersecreción y el promedio del índice de dilatación fue de 3 ml a las 18 h después de la inoculación. Las vellosidades de las asas intestinales de conejo y pollo inoculadas con ambas toxinas de *S. gallinarum*, presentaron una intensa actividad secretora, similar a la presentada por la toxina CT de *V. cholerae* y LT de ETEC.

Este trabajo fue financiado parcialmente por los siguientes proyectos.

- 1. Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la salmonelosis aviar. Fase III. PAPIIT, IN-223398.**
- 2. Desarrollo de herramientas moleculares para el control de la salmonelosis aviar. CONACYT, No.27669-B.**
- 3. Estudio molecular de enterotoxinas similares a LT para el control y la prevención de la salmonelosis aviar. CONACYT. No. 34747-B.**

ABSTRACT

Fowl typhoid is caused by *Salmonella enteritidis* setotype *gallinarum*, it is highly contagious and affects poultry of every age. This disease has economical impact among the poultry producers and its control is of poultry sanitary priority. The disease its characterized by the production of a watery white-greenish diarrhea, similar to the one produced by choleric toxin (CT) of *Vibrio cholerae* and the thermolabile toxin (LT) enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). The CT toxin has a molecular weight of 84 kDa, is encoded by the *ctxAB* genes, which are located in the CTX ϕ bacteriophage integrated into the chromosome. The LT toxin has a molecular weight of 86 kDa and is encoded by the *eltAB* genes harbored into a plasmid. The objective of this investigation was to identify, clone and characterize the genes that encode for an enterotoxin LT-like of *Salmonella gallinarum* and to study the biological activity of its recombinant products in cell culture and intestinal ligated loops. The genes were amplified from the genome and plasmids of *S. gallinarum* plasmids by polimerase chain reaction. The amplified fragment size for these genes was 1,275 bp and were amplified separately; the fragment for the *eltAB* gene had 795 bp, while the one for the *eltB-like* had 372 bp. The nucleotide sequence alignment of the *eltAB-like* genes showed a percentage identity of 98% with the *eltAB* genes that codify for the LT toxin ETEC and a 79% with the *ctxAB* genes that encode for the CT toxin of *V. cholerae*. The aminoacid sequence alignment deduced from the nucleotide sequence from *eltAB-like* genes showed a 93% identity for LT-A and 95% for LT-B from ETEC. As to the CT toxin from *V. cholerae*, the identity was of 75% for CT-A and 79% for CT-B. The molecular weigh of the LT-A-like and LT-B-like subunits from the recombinant toxins and native *S. gallinarum* was approximately of 28 kDa, and 11 kDa respectively. The recombinant LT-

like toxin and native *S. gallinarum*, showed physicochemical characteristics similar to the **CT**-toxin, since it was thermolabile at 56°C for 15min, was inactivated with proteinase **K**, was neutralized with polyclonal antibodies against **CT** toxin and hemagglutinated rabbit erythrocytes. The purified toxin and native *S. gallinarum* caused an elongation at 9h in **CHO** cells and Vero cells. The purified toxin inoculated in rabbit and chicken ileal ligated loops, produced an hypersecretion and a dilatation index of 3ml at 18hs postinoculation average. The inoculated chickens and rabbits ileal loop villi with the recombinant **LT-like** and native *S. gallinarum*, showed an intense secretory activity similar to the one showed by the **CT** toxin of *V. cholerae* an **LT** of **ETEC**.

AGRADECIMIENTOS.

Es una obligación hacer explícito mi reconocimiento y gratitud a las instituciones que han hecho posible que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

A mi apreciable CENID-Microbiología, INIFAP-SAGARPA.

A mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

**Con cariño a mi Instituto de Alergias y Autoinmunidad, Dr. Maximiliano Ruz Castañeda,
A. C., Acambay, Edo. de México.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7

No puedo dejar de mencionar el apoyo que me brindaron mis compañeros y amigos, durante el tiempo que desarrolle este proyecto.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología, INIFAP-SAGARPA.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Alergias y Autoinmunidad DR. Maximiliano Ruíz Castañeda, A. C. Acambay Edo. de México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8

Con mucho amor y cariño:

A mí hijo **Jesús Maximiliano Vázquez Zurita,**

A mis hijas, **Irina Ivonne Vázquez Zurita y Beatriz Gabriela Vázquez Zurita.**

Y a mi esposa Arcelia.

A mis padres: **Juventino Vázquez Camacho**

y

Soledad Navarrete Montesinos

A todos mis hermanos y sobrinos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9

ÍNDICE.

| | Página |
|--|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN. | |
| 1.1. Panorama de la industria avícola nacional.----- | 1 |
| 1.2. Importancia de la tifoidea aviar (TA) en México.----- | 2 |
| 1.3. Características del género <i>Salmonella</i> .----- | 5 |
| 1.4. Factores de virulencia en bacterias del género <i>Salmonella</i> .----- | 6 |
| 1.5. Enterotoxinas LT y CT.----- | 11 |
| 1.6. Plegamiento, ensamblaje y secreción de enterotoxinas.----- | 14 |
| 1.7. Mecanismo de acción de las toxinas CT y LT.----- | 16 |
| 1.8. Genética de las toxinas CT y LT.----- | 18 |
| 1.9. Regulación de los genes <i>ctxAB</i> y <i>eltAB</i> que codifican las toxinas CT y LT.----- | 19 |
| 1.10. Receptores de las toxinas CT y LT.----- | 20 |
| 1.11. La utilización de las toxinas CT y LT como inmunógenos y adyuvantes. ----- | 21 |
| 2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO. ----- | 22 |
| 3. OBJETIVOS. | |
| 3.1. Objetivo general.----- | 23 |
| 3.2. (1-3). Objetivos específicos.----- | 23 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS. | |
| 4.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.----- | 24 |
| 4.2. Extracción y purificación de DNA genómico y de plásmido.----- | 24 |
| 4.3. Identificación de los genes <i>eltAB-like</i> de <i>S. gallinarum</i> por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).----- | 25 |
| 4.4. Secuenciación de los genes <i>eltAB-like</i> de <i>S. gallinarum</i> .----- | 26 |
| 4.5. Clonación, transformación y expresión de los genes <i>eltAB-like</i> de <i>S. gallinarum</i> . ----- | 27 |
| 4.6. Producción de la toxina LT-like recombinante y nativa de <i>S. gallinarum</i> .----- | 28 |

| | |
|---|----|
| 4.7. Purificación de la toxina LT-like recombinante y nativa de <i>S. gallinarum</i> | 28 |
| 4.8. Identificación de la toxina LT-like mediante geles de archilamida..... e inmunotransferencia. | 29 |
| 4.9. Actividad biológica de la toxina LT-like en cultivos celulares (CHO y Vero)..... | 30 |
| 4.10. Características fisicoquímicas de la toxina LT-like de <i>S. gallinarum</i> | 31 |
| 4.11. Actividad biológica de la toxina LT-like en asas ligadas de conejo y pollo..... | 31 |

5. RESULTADOS.

| | |
|--|----|
| 5.1. Identificación de los genes <i>eltAB-like</i> en <i>S. gallinarum</i> | 32 |
| 5.2. Análisis de la secuencia nucleotídica de los genes <i>eltAB-like</i> de <i>S. gallinarum</i> | 35 |
| 5.3. Clonación y transformación de los genes <i>eltAB-like</i> de <i>S. gallinarum</i> | 39 |
| 5.4. Expresión de los genes <i>eltAB-like</i> clonados en el plásmido pJV-001..... | 39 |
| 5.5. Purificación de la toxina LT-like recombinante y nativa de <i>S. gallinarum</i> | 40 |
| 5.6. Actividad biológica de la toxina LT-like recombinante y nativa de <i>S. gallinarum</i> en cultivos celular..... | 42 |
| 5.7. Actividad biológica de la toxina LT-like recombinante y nativa de <i>S. gallinarum</i> en asas ligadas de conejo y pollo. | 43 |
| 5.8. Histopatología del intestino inoculado con la toxina LT-like recombinante y nativa de <i>S. gallinarum</i> | 44 |

| | |
|-------------------|----|
| 6. DISCUSIÓN..... | 46 |
|-------------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| 7. CONCLUSIONES..... | 51 |
|----------------------|----|

| | |
|---------------------|----|
| 8. REFERENCIAS..... | 52 |
|---------------------|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

| | |
|---|----|
| 1. Distribución de la salmonelosis aviar en la República Mexicana..... | 4 |
| 2. Microscopia electrónica de <i>Salmonella enteritidis</i> y <i>S. pullorum</i> | 6 |
| 3. Esquema del <i>Rufflig</i> y sistemas de secreción..... | 10 |
| 4. Modelo de la toxina CT..... | 12 |
| 5. Cristalograma de la holotoxina LT de ETEC..... | 15 |
| 6. Esquema del mecanismo de acción de la toxina CT y LT..... | 17 |
| 7. Arreglo de los genes <i>ctxAB</i> , <i>zot</i> y <i>ace</i> en <i>Vibrio cholerae</i> | 19 |
| 8. Plásmido pCR-TOPO 3.9 y clonas de <i>Escherichia coli</i> DH-10B..... | 27 |
| 9. Genes <i>eltAB-like</i> de <i>Salmonella gallinarum</i> | 32 |
| 10. Genes <i>eltA-like</i> y <i>eltB-like</i> de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1..... | 33 |
| 11. Genes <i>eltAB-like</i> en varias cepas de <i>Salmonella gallinarum</i> | 34 |
| 12. Secuencia nucleotídica de los genes <i>eltAB-like</i> de <i>S. gallinarum</i> FVA-1..... | 36 |
| 13. Secuencia de aminoácidos de los genes <i>eltAB-like</i> de <i>S. gallinarum</i> FVA-1..... | 37 |
| 14. Plásmido donde se clonaron los genes <i>eltAB-like</i> de <i>S. gallinarum</i> FVA-1..... | 39 |
| 15. SDS-PAGE e inmunotransferencia de la toxina LT-like de <i>S. gallinarum</i> | 40 |
| 16. Células CHO y Vero expuestas a la toxina LT-like recombinante y nativa..... | 42 |
| 17. Actividad biológica la toxina LT-like recombinante y nativa de <i>S. gallinarum</i> en asas ligadas de conejo y pollo..... | 43 |
| 18. Histopatológica de asas de ligadas de conejo y pollo con la toxina LT-like..... | 45 |

TABLAS.

| | |
|---|----|
| 1. Oligonucleótidos para identificar y secuenciar los genes <i>eltAB-like</i> | 26 |
| 2. Producción de la toxina LT-like recombinante y nativa..... | 41 |
| 3. Ensayos de actividad biológica de la toxina LT-like recombinante y nativa de <i>S. gallinarum</i> | 44 |

GRÁFICA.

| | |
|---|----|
| 1. Purificación de la toxina LT-like recombinante y nativa..... | 41 |
|---|----|

ABREVIATURAS.

ADP: Adenosindifosfato

AMPe: Adenosina 3'-5' monofosfato cíclico

ALC: Asas ligadas de conejo

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: Adenosintrifosfato

AgI/II: Adhesina de estreptococo

CHO: Células de ovario de hámster chino

CT: Toxina colérica

CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide

CTXØ: Fago lisogénico filamentoso

ctxAB: Genes que codifican para la toxina CT

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DH10Br: *Escherichia coli* transformada con el plásmido pJV-001

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

dNTPs: desoxirribonucleosidos trifosfatos

eltAB: Genes que codifican para la toxina LT de ETEC

eltAB-like: Genes que codifican para la toxina LT-like de *S. gallinarum*

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica

EPEC: *E. coli* enteropatógena

EAggEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

F₁₂: Mezcla de Nutrientes para el cultivo de células CHO.

GD_{1b}: Glicoproteína del intestino

GM₁: Gangliósido de células epiteliales

GMP_c: Guanosina 3', 5' Monofosfato Cíclico

GTP: Guanosintrifosfato

h: Hora

HCO₃: Radicales de bicarbonato

HEPES: Ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N-2-etanosulfónico

ID: Índice de dilatación
IgA: Inmunoglobulina A
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
IPTG: *Isopropylthio-β-D-galactopyranoside*
kb: Kilobase
kDa: Kilodalton
L: Litro
LB: Medio Luria-Bertani
LPS: Lipopolisacárido
LT: Toxina termolábil
LT-like: Enterotoxina de *Salmonella gallinarum*
MgCl: Cloruro de magnesio
mm: Milímetro
min: Minuto
μM: Micromolar
NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido
NaCl: Cloruro de sodio
NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica
ORF: Marcos abiertos de lectura
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: Solución salina amortiguada con fosfato
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pEWD-299: Plásmido con genes *eltAB* de *Escherichia coli*
Proteína G: Familia de proteínas fijadoras de GTP heterotrímicas
pJV-001: Plásmido con genes *eltAB-like* de *S. gallinarum*
Proteínasa K: Proteasa para digerir proteínas
PIB: Producto Interno Bruto
PMSF: Phenyl-methylsulfonyl fluoride
rpm: Revoluciones por minuto
SBR: región de unión salival

SDS: Dodecilsulfato sódico

SPI: Islas de patogenicidad

SLT: Toxina shiga-like

ST: Toxina termoestable

STN: Toxina de *Salmonella typhimurium*

SPF: *Specific-Pathogen-Free*

TA: Tifoidea aviar

CD₄: Glucoproteína transmembranal, monómero de la superficie de células T

TEAN: Solución amortiguadora para proteínas.

UI: Unidades internacionales

Vero: Células de riñón de mono verde africano

VT: Verotoxina letal para células Vero

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Panorama de la industria avícola nacional.

En diferentes áreas de la producción pecuaria, la avicultura es la más dinámica y con mayor desarrollo tecnológico, tan solo en los últimos 5 años ha crecido a un ritmo anual de 5.8% en producción de pollo y 5.3% en huevo. La producción mundial de carne de pollo de 1994 a 2001, mostró un crecimiento de 5.3% y las exportaciones en ese periodo correspondieron a 28.7%, donde el principal productor y exportador es los Estados Unidos. La producción mundial de huevo de 1994 a 2001 correspondió a 4.9%, en promedio anual. En el año 2000 México fue el sexto país productor de huevo y el cuarto productor mundial de pollo, de tal manera que es el tercer consumidor de huevo.¹ La industria avícola nacional genera alrededor de 150 mil empleos directos y 750 mil empleos indirectos, además produce más de 4 millones de toneladas de alimento al año. En el año 2000, la participación de la avicultura en el Producto Interno Bruto (PIB) agropecuario fue de 8.3% y de 33.4% dentro del PIB pecuario. La avicultura en México es la principal industria transformadora de proteína animal y además procesa 11.1 millones de toneladas de alimento balanceado y 7 millones de granos forrajeros anualmente. El valor de venta anual de la producción de huevo en el 2001 fue de 15 mil 021 millones de pesos, la de pollo es de 21 mil 876 millones de pesos. El valor de la producción de pavo es de 384 millones de pesos. El inventario nacional pecuario es de 115 millones de gallinas ponedoras, 208 millones de pollos por ciclo y 801 mil pavos por ciclo.¹

En el 2002, el consumo *per cápita* de huevo fue de 20.9 kg y el estimado de piezas por habitante fue de 355 aproximadamente. Los niños son los principales consumidores de huevo, al ser un alimento con alto valor nutricional. El consumo *per cápita* de pollo fue de 20.06 kg y se estima que para el 2003 sea de 20.09 kg por habitante y para el pavo fue de 1.90 kg. Esto origina que 6 de cada 10 kg de productos pecuarios que consumen los mexicanos son carne de aves y huevo.

De la producción de huevo, el 95% se produce en siete estados: Jalisco, (43%), Puebla (22%), Sonora (8%), Nuevo León (7%), La zona de la comarca lagunera (6%), Yucatán (5%) y Guanajuato (4%).

La producción de carne de pollos, el 80% se concentra en once estados del país: Querétaro, Jalisco y Veracruz con un (11%) cada uno, Puebla (8%), la zona de la

Comarca Lagunera (10%), Nuevo León (7%), Estado de México (6%), Guanajuato (5%), Yucatán (4%), Aguascalientes (7%) y Sinaloa (5%). Los estados de Sonora y Chihuahua son las dos entidades con mayor producción de pavo en el país, con 50% y 40%, respectivamente.

Considerando este incremento en la producción de la industria avícola nacional, el precio de la carne y huevo se han reducido (47%) en los últimos años.¹ El interés por incrementar el consumo de productos pecuarios libres de agentes microbianos potencialmente patógenos para el hombre, obliga a la adopción de prácticas adecuadas de producción y procesamiento.

1.2. Importancia de la tifoidea aviar en México.

La tifoidea aviar (TA) es una enfermedad bacteriana producida por *Salmonella enteritidis* serotipo *Gallinarum*, altamente contagiosa, que afecta a aves de todas las edades y provoca mortalidad. Las aves infectadas presentan varios signos clínicos entre los que se encuentran: depresión, anorexia, deshidratación, plumas erizadas, boqueo, diarrea de color blanco-verdosa. En aves adultas hay una disminución marcada en la producción de huevo e infección del mismo y por lo tanto una baja incubabilidad. La diarrea producida por esta bacteria es de tipo acuosa muy similar a la que produce *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).²

La avicultura nacional se ha destacado como una actividad zootécnica dinámica y avanzada, pasando de ser deficitaria y dependiente en un 100% durante los años cincuentas, a cubrir las necesidades internas del país durante los sesentas.

La salmonelosis aviar ha ocasionado grandes pérdidas económicas en la industria avícola nacional, originadas por costos de tratamientos y vacunación. Por ejemplo, en 1984 en pollo de engorda se presentaron pérdidas por \$ 3,573 millones de pesos; en 1987, el impacto económico anual por la tifoidea aviar o paratifoidea en gallinas reproductoras pesadas se calculó en \$ 80,000 millones de pesos.³

Actualmente, la situación de esta enfermedad en México es de 13 Estados libres, 10 en erradicación y 9 en control incluyendo el Distrito Federal.⁴ Sin embargo, en los últimos años los brotes de tifoidea aviar han disminuido, de tal manera que en abril de 1998 la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural reportó sólo 24 aislamientos de bacterias del género *Salmonella* en varios estados del país dentro de los cuales posiblemente se encuentre involucrada *S. gallinarum* (Fig. 1).

Es interesante mencionar que en los últimos 5 años el Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica sólo reportó 4 focos de *S. gallinarum* procedentes de los estados de Puebla, Hidalgo, Estado de México y Veracruz, como se observa en la figura 1.⁵ Por otro lado, en el caso de *S. pullorum* el país ha sido declarado libre de esta enfermedad, ya que en los últimos 10 años no se ha reportado ningún caso.^{6,7}

Por lo que corresponde a infecciones por bacterias del género *Salmonella* en el humano, la fuente puede ser muy diversa y en este sentido la Secretaría de Salud reportó 67,645 casos de salmonelosis en el año 2002.⁸ Dentro de los casos publicados por la Secretaría de Salud los serotipos más comunes son *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*.⁹ Es interesante mencionar que *S. gallinarum* causa una infección leve en el humano y que el estudio de este serotipo es importante ya que puede ser de utilidad como un modelo de estudio para otras salmonellas, sobre todo si se considera que los fagotipos 2, 4, 8, y 13 de *S. enteritidis*, además de infectar al humano, también se han reportado con frecuencia en aves de postura.¹⁰ Por tal motivo y considerando que el impacto económico que la TA tiene entre los avicultores del país, su control sigue siendo una prioridad sanitaria avícola, llevada a cabo por la Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar a través de la NOM-004-ZOO-1993.¹¹

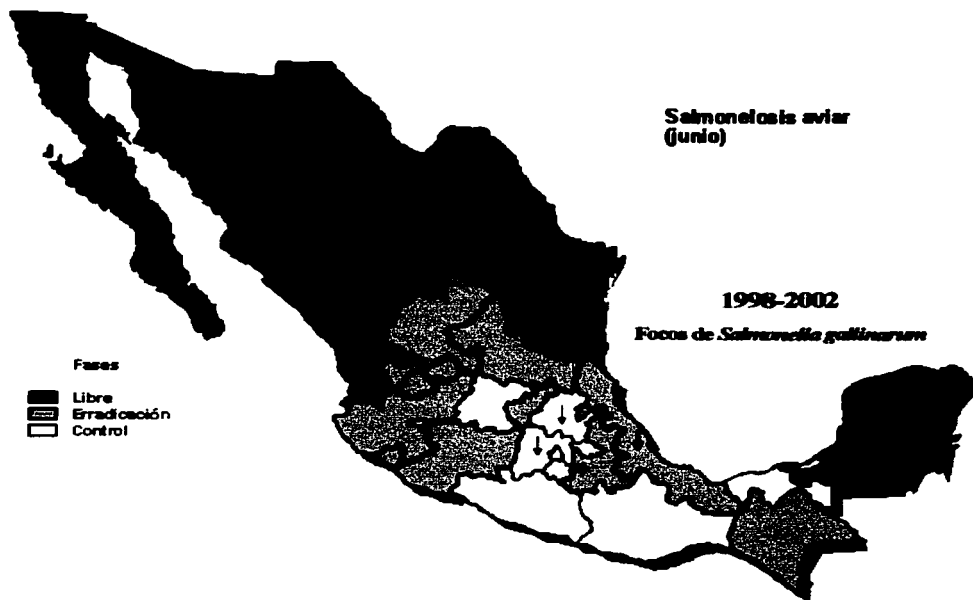


Figura. 1. Distribución actual de la salmonelosis aviar en la República Mexicana. Con flechas rojas se muestran los Estados donde se han presentado los últimos aislamientos de *Salmonella gallinarum*.⁴

1.3. Características del género *Salmonella*.

El género *Salmonella* es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, en los últimos años este género se ha dividido en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, con una subdivisión de *S. enterica* en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*. Sin embargo, según la clasificación de *Kauffmann-White* el agente causal de la TA se considera como *S. enteritidis* serotipo *gallinarum*. Esta bacteria ha recibido varios nombres: *Bacillus gallinarum*, *B. sanguinarum*, *B. typhi gallinarum* *alacalifaciens*, *B. paradysenteriae gallinarum*, *Eberthella sanguinaria*, *Shigella gallinarum*, *S. gallinarum*.¹²

Este microorganismo es un bastón corto de 1 a 2 μm de largo por 1.5 μm de diámetro, es Gram negativo y su fórmula antigénica es: O:1, 9, 12, no forma spora, no presenta cápsula y se considera no móvil.¹³ Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *S. pullorum* porta los genes que codifican para el flagelo (Fig. 2) y que dependiendo de las condiciones en que se cultive, la bacteria puede expresarlo y por lo tanto desplazarse.¹⁴

La bacteria crece con rapidez en caldo nutritivo, triptícase soya, caldo Luria-Bertani (LB), así como otros medios enriquecidos como caldo selenito, tetrionato y también en medios diferenciales como agar MacConkey, sulfato de bismuto, verde brillante, y *Salmonella-shigella*. Este microorganismo es aeróbico, anaeróbico facultativo y crece mejor a 37°C, sus propiedades bioquímicas se caracterizan por metabolizar y acidificar la arabinosa, dextrosa, galactosa, manitol, manosa, ramnosa, xilosa, fructosa, maltosa, dulcitol e isodulcitol sin producción de gas. *S. gallinarum* crece en gelatina, cisteína hidrocloreto y esto sirve para diferenciarla de *S. pullorum*.¹⁵

Este microorganismo es sensible a una gran variedad de agentes químicos y físicos, por ejemplo, muere a 60°C por 10 min, puede permanecer viable en el agua por 20 días, pero muere en aproximadamente 24 h expuesto a la luz del sol. El fenol diluido 1:100, bicloruro de mercurio diluido 1:20,000, así como permanganato de potasio al 1% inactivan al microorganismo en 3 min, mientras que la formalina al 2% lo inactiva en un minuto. Se ha demostrado que *S. gallinarum*, puede permanecer viable hasta 30 semanas en la cama de aves enfermas y aproximadamente 11 días en las heces de los pollos.¹⁶

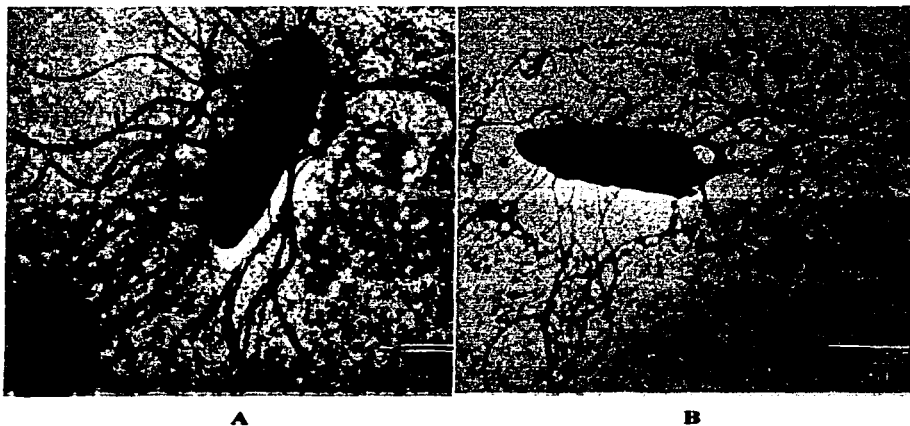


Figura. 2. Microscopia electrónica de *Salmonella enteritidis* (A) y *S. pullorum* (B) aisladas de aves, donde se muestra la presencia de flagelos.¹⁴

1.4. Factores de virulencia en bacterias del género *Salmonella*.

Las bacterias requieren de factores de virulencia para colonizar y sobrevivir a las defensas del huésped y multiplicarse dentro de este. Convencionalmente se ha descrito que la adherencia del género *Salmonella* se lleva a cabo en la mucosa del intestino delgado, así como en las células M. La penetración al cuerpo puede ser a través de las células M de tal manera que el 25% de las bacterias se localizan en las placas de Peyer, lo anterior fue demostrado en cuyes y monos, donde la infección ocurre en el colón. Por otro lado, *Salmonella* puede pasar hacia la lamina propia a través de los enterocitos, provocando una respuesta inflamatoria. Las bacterias son fagocitadas por los macrófagos y neutrófilos, donde se multiplican y son transportadas a través del sistema linfático al torrente sanguíneo.^{12,17}

Para conocer el mecanismo mediante el cual las enterotoxinas de bacterias del género *Salmonella* producen la diarrea, se hicieron mutaciones en los genes *stm* de *S. typhimurium*. Las mutaciones mostraron una marcada disminución de fluido secretado en asa ligadas de ratón, cuando se comparó con cepas silvestre.¹⁸ Por otro lado, en

conejos infectados experimentalmente con *Salmonella*, se encontró una actividad del sistema de la adenil ciclasa en la mucosa intestinal, lo cual sugiere que la secreción de fluido en células intactas del epitelio es causada por enterotoxinas. También se ha demostrado que en infecciones intestinales, *S. typhimurium* y *E. coli* enteropatógena (EPEC) generan la producción de citocinas y otras señales que atraen a los polimorfonucleares, los cuales liberan prostaglandinas que estimulan la actividad de la adenil ciclasa en las células intestinales dando como consecuencia un incremento del cAMP que inhibe la absorción de sodio y la eliminación de cloro por las células, estos cambios asociados a la pérdida de agua originan la diarrea.^{19,20}

La penetración de *S. typhimurium* a la célula huésped está mediada por genes que codifican para un sistema de secreción tipo III que puede inyectar proteínas dentro de la célula. (Fig. 3B). Por otro lado, el plásmido de virulencia de *Salmonella* (*spv*), codifica para una proteína de membrana que ayuda a la proliferación de la bacteria en el sistema mononuclear fagocítico del huésped.^{21,22}

Las bacterias del género *Salmonella*, producen varias adhesinas entre las que se incluyen; fimbrias tipo I codificadas por los genes *fim*, fimbrias codificadas por los genes *pef* localizadas en el plásmido pSLT de 90 kb, la fimbria polar larga codificada por los genes *lpf* y la fimbria delgada agregativa codificada por los genes *agf*.

La fimbria codificada en el plásmido pSLT, media la unión de la bacteria a las microvellosidades de los enterocitos. La fimbria polar larga media la agregación a las placas de Peyer. Similares pili se han encontrado en *E. coli* enteroagregativa (EA_ggEC), donde el pili agregativo pueden agregarse a las vellosidades del enterocito. El gen *rc1* codifica una proteína de superficie que confiere resistencia a *S. typhimurium* contra la acción del complemento, esta proteína actúa como adhesina y puede estar involucrada en la invasión en cultivos celulares.²⁰

Un gran número de patógenos entéricos invaden células de mamíferos, en los cuales el arreglo de la actina forma pseudópodos para englobar a las bacterias. En salmonela este proceso se observa relativamente diferente al de otros patógenos entéricos. La unión de bacterias del género *Salmonella* a células en cultivo, causa cambios en la superficie celular, aparentando una gota de líquido salpicada en una superficie sólida (*ruffling*), con lo cual se inicia la internación de la bacteria (Fig. 3A). El *ruffling* y la internación de la bacteria son acompañadas de rearrreglos de actina, las bacterias se engloban en vesículas al penetrar la membrana celular y los filamentos de actina regresan a su estado normal.²³

Las islas de patogenicidad (SPI) están relacionadas con invasión, sobrevivencia intracelular, apoptosis en macrófagos, toxigenicidad, etc. En *S. typhimurium* se han identificado las islas SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5.

La SPI-1 es un segmento de 40 kb localizado en el centisoma 63 del cromosoma y está flanqueada por los genes *fhIA* y *mutS*. Esta compuesta por 45% de G+C, es conservada en bacterias del género *Salmonella*, juega un papel importante en la invasión de células epiteliales y apoptosis en macrófagos. Esta SPI-1 contiene por lo menos 31 genes, los cuales codifican para el sistema de secreción tipo III, este corresponde a proteínas efectoras, chaperonas y factores de regulación. En salmonella los genes *spa*, *sip*, *prg* son altamente conservados. El grupo de genes *inv* son responsables del *ruffling* sobre la membrana de la célula huésped, todos estos genes (*inv*, *spa*, *prg* y *org*) codifican proteínas para el sistema de secreción tipo III.²⁴

En esta isla también se encuentra el gen *sptP* que codifica para una enzima tirosin fosfatasa, la cual mimetiza la transducción de señales en células eucarióticas. Esta enzima puede jugar un papel importante, alterando la respuesta de las células de la mucosa y esta alteración produce diarrea.²⁵ Otras proteínas que también son inyectadas son SipA y SopE. La proteína SopE activa a las proteínas G de las células huésped, Cdc42 y Rac, que controlan la polimerización de la actina. Cuando SopE activa a las proteínas G, estas inician el proceso de *ruffling*. SipA se une a la actina directamente e inhibe la despolimerización, originando un incremento de la polimerización de esta. En SPI-1 también se encuentran los genes *hilA*, *invF*, los cuales están involucrados en la regulación de otros genes de virulencia en *S. typhimurium*.^{25,26,2,28}

La SPI-2 está localizada a 30.7 min en el cromosoma de *S. typhimurium*, flanqueada por los genes *pykF* y *valV* y tiene un tamaño de aproximadamente 40 kb. Esta isla contiene cuando menos 32 genes que codifica proteínas que son inyectadas dentro de células eucarióticas. Estas proteínas son secretadas a través de un segundo sistema de secreción tipo III y juega un papel importante en la virulencia de *Salmonella*, evitando la fusión del fagosoma y el lisosoma, para que no se forme el fagolisosoma que pueda digerir al microorganismo.^{20,25,26,27,28}

La SPI-3 es un segmento de 17 kb localizado corriente abajo del gen *selC* a 81 min del cromosoma de *S. typhimurium* y esta involucrada en la sobrevivencia dentro del macrófago. El gen *selC* es el sitio de inserción de dos islas de patogenicidad y un retrofago en *E. coli*. Esta isla tiene 10 marcos abiertos de lectura organizados en seis unidades transcripcionales, incluyendo el operón *mgrCB* que codifica una proteína

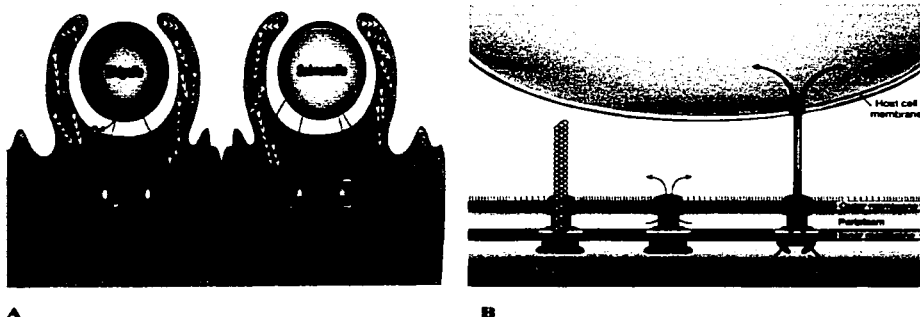
(MgtB) con alta afinidad para el transporte de Mg^{2+} . Esta isla de patogenicidad puede ser importante para que la bacteria sobreviva dentro del fagosoma de células infectadas. Una característica del fagosoma es su deficiencia en Mg^{2+} y éste es esencial para muchas bacterias, de tal manera que ésta puede ser una vía por la cual se reduce la actividad del fagosoma evitando la fusión del fagolisosoma.^{20,24,27,28}

Las islas SPI-4 es un segmento de 25 kb localizado a 92 min corriente abajo de un gen similar al que codifica para el tRNA en el cromosoma de *S. typhimurium*. Tiene 18 marcos abiertos de lectura (ORF) y puede constituir un operón. Esta isla, también está involucrada en la sobrevivencia dentro del macrófago. Se ha encontrado que codifica 11 proteínas a través de los ORF-F y ORF-P. Los productos de los ORF-C, ORF-D y ORF-R, son similares a las proteínas involucradas en la secreción de toxinas.²⁷

La isla SPI-5 es un segmento de 7 kb (isleta) localizada corriente abajo del gen *serT* a 20 min en el cromosoma de *S. dublin* y está involucrada en la enteropatogenicidad. Esta isla codifica seis proteínas, que incluye a SopB el cual es un inositol fosfato fosfatasa que se secreta por Inv-Spa del sistema de secreción tipo III, y PicC que es una pequeña proteína ácida que funciona como chaperona de SopB. En la SPI-5 también se codifica una proteína putativa de membrana, similar a una dipeptidasa de *Lactobacillus*. Los genes *sopB/sigD* y *pipC/sigE* son similares a los genes *tpgD* y *tpgE* que se localizan en el plásmido de virulencia de *Shigella*. Esta isla de patogenicidad se ha reportado en los serotipos *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Choleraesuis*, *Gallinarum* y *Pullorum*. Los genes *sigDE* de la proteína SirA, pero de la proteína Hila. La proteína SirA la transcripción de varios genes en la SPI-1 vía Hila.^{20,27}

Todas las islas de patogenicidad aunado a la identificación de los fagos lisogénicos Gifsy-1 y Gifsy-2, que pueden contribuir a la virulencia, ya que ayudan a la bacteria a sobrevivir durante la fase sistémica de la infección. Pocos genes encontrados en estos fagos Gifsy han sido caracterizados, por ejemplo, se sabe que en *S. typhimurium* Gifsy-2, la DL_{50} se incrementa significativamente. Este fago porta el gen *sod* que codifica para una superóxido dismutasa, enzima que convierte el superóxido tóxico en peróxido menos tóxico, lo cual ayuda a la bacteria para que sobreviva al ataque oxidativo de los macrófagos. El fago Gifsy-2 también porta al gen *grvA* (*Gipsy-related virulence*) y se ha observado que cepas de *S. typhimurium* que carecen de este gen, al ser complementadas son más virulentas. El gen *spvB* codifica una toxina ADP-ribosilada que modifica directamente a la actina e interrumpe totalmente al citoesqueleto. Los genes *spv* son

regulados por *spvR*, el cual es regulado por la proteína RpoS que controla la expresión de muchos genes en la fase estacionaria.²⁰



A
B
Figura. 3. En el esquema A se muestra el rufflig para la penetración de *Salmonella* en la célula huésped. En el esquema B se muestran los sistemas de secreción.²⁹

En *S. gallinarum* pocos factores de virulencia han sido descritos, se ha reportado un plásmido de 85 kb, el cual juega un papel importante en la virulencia de la TA.³⁰ Por otro lado, se han hecho mutaciones funcionales en el sistema de secreción tipo III codificado en las SPI-1 y SPI-2, donde se ha observado que SPI-2 es requerida para que *S. gallinarum* sobreviva dentro del macrófago y se multiplique dentro del sistema mononuclear fagocítico.³¹

Por otro lado, se reportó la presencia de toxinas en el sobrenadante del cultivo las cuales causan daño en conejo.² También han observado que una proteína de 66 kDa del sobrenadante del cultivo y proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum* producen elongación en células CHO. La actividad biológica de estas proteínas es de 1.1 y 1.6 unidades internacionales, respectivamente.³²

Las toxinas producidas por el género *Salmonella* juegan un papel importante en la virulencia de estas bacterias. En este sentido en *S. gallinarum* previamente se reportó un

fragmento de 479 pb, el cual presentó una similitud del 95% con el gen *eltA* de ETEC y del 83% con el gen *ctxA* de *V. cholerae*.³³

Otros factores de virulencia que también se han reportado en el género *Salmonella* son, toxinas similares a la enterotoxina termoestable (ST) reportada en ETEC y a la toxina Shiga-like (SLT). La toxina ST se divide en dos grupos: STa y STb. STa se caracteriza por inducir la acumulación de fluido en el intestino de ratones cuando se administra por vía oral, es resistente a la degradación por pH bajo, proteasas que se encuentran en el intestino y puede ser neutralizada por anticuerpos específicos. ST es producida por cepas de ETEC aisladas de humano, bovino y porcino. El mecanismo de acción de la toxina STa, es la elevación del guanosina 3', 5' monofosfato cíclico (GMPc) en células del epitelio intestinal. Esta toxina es insoluble en metanol y activa en intestino de ratón, ratas, vacas, y conejos. Los genes que codifican estas toxinas STa y STb se encuentra también en un plásmido.^{20,34}

La verotoxina SLT es termolábil y se considera dentro de la familia Shiga, se encuentra presente en cepas de *E. coli* aisladas de enfermedad del edema en cerdos. La toxina es letal para células Vero por lo cual se le denomina verotoxina (VT). Es muy similar en estructura y función a la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae*, tiene un peso molecular de 70 kDa y está compuesta por una subunidad A (polipéptido) de 32 kDa, la cual está unida no covalentemente a la subunidad B, la cual es pentamérica y cada monómero tiene un peso de 7.7 kDa. La toxina SLT produce enfermedad del edema en humanos, diarrea en bovinos y cerdos, así como colitis hemorrágica en vacas. En humanos la toxina SLT también produce el síndrome urémico hemolítico, con daño en el endotelio vascular del órgano blanco, produciendo un edema marcado, hemorragias y trombosis.^{20,34}

1. 5. Enterotoxinas CT y LT.

La toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae* y la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), son moléculas que estimulan la producción del AMPc en las células intestinales, produciendo como consecuencia el síndrome diarreico. Estas enterotoxinas están compuestas por una subunidad A y una subunidad B₅ pentamérica, que se parecen funcional, estructural e inmunológicamente. En *S. gallinarum* se reportó un fragmente de 329 pb el cual presenta una identidad del 95%

con el gen *elt A* de ETEC y 83% con el gen *ctxA* de *V. cholerae* y la secuencia de aminoácidos deducida de este fragmento nucleotídico fue similar en un 88% con LT-A y en un 91% a CT-A.³³ En las toxinas CT y LT, el polipéptido A posee la función enzimática específica que actúa intracelularmente y el polipéptido B sirve de unión a la holotoxina para el receptor que se encuentra en la membrana de las células eucarióticas.^{35,36} La holotoxina CT tiene un peso molecular de 84 kDa y la subunidad A madura tiene un peso molecular de 27.215 kDa. Esta subunidad puede ser proteolíticamente dividida para generar dos cadenas polipeptídicas (A₁ y A₂). El péptido A₁ está constituido por 195 aminoácidos y un peso de 21.8 kDa, el péptido A₂ tiene un tamaño de 45 aminoácidos y pesa 5.4 kDa. Después de partirse proteolíticamente, ambos péptidos siguen unidos por un puente disulfuro antes de internarse en la célula huésped. La subunidad B₅ es una proteína pentamérica compuesta por 103 aminoácidos y tiene un peso molecular de 11.6 kDa. Esta subunidad es la que se une al receptor (Fig. 4).³⁶

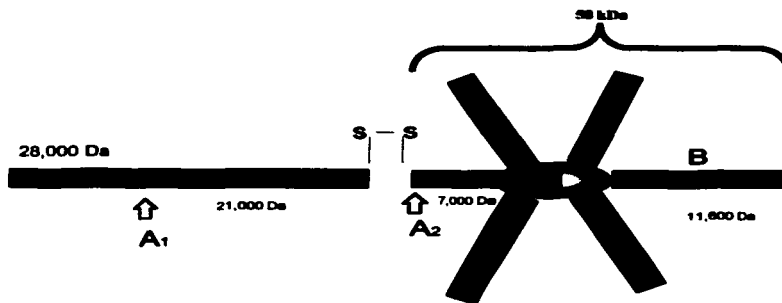


Figura. 4. Modelo de las toxinas CT de *V. cholerae* y LT de *E. coli*, donde se muestran los dos dominios la subunidad A y los 5 monómeros de la subunidad B (JVN).

La familia de toxinas LT se dividen en dos grupos principales, LT-I y LT-II, los cuales cruzan inmunológicamente; sin embargo, LT-I es neutralizada con anticuerpos contra CT. Las enterotoxinas LTs son proteínas heterohexaméricas con un polipéptido A que varía entre 240 y 243 aminoácidos y un polipéptido B de entre 99 y 103 aminoácidos (Fig. 5). Esta subunidad se une fuertemente al gangliósido GM₁ a través de enlaces no covalentes y también de manera débil al GD_{7b}, así como algunas glicoproteínas del intestino. La toxina LT-I es expresada por cepas patógenas de *E. coli* aisladas de humanos y animales, mientras que LT-II se encuentra principalmente en cepas de *E. coli* aisladas de animales. La toxina LT-I tiene dos variantes, LTh-I y LTp-I, debido a que se aislaron de humano y cerdo, respectivamente.^{34,37,38} La holotoxina LT-I tiene un peso molecular de aproximadamente 86 kDa y su estructura por cristalografía fue descrita por Sixma y col. (Fig. 5).³⁹ Esta toxina está compuesta por una subunidad A de 28 kDa la cual contiene el sitio activo, se divide proteolíticamente en el polipéptido A₁ que pesa 21 kDa y el péptido A₂ de 7 kDa. El péptido A₂ se une a la subunidad B₅ pentamérica que tiene un peso promedio de 11.5 kDa cada monómero.^{34,37}

La principal característica de la subunidad B de ambas toxinas (CT y LT), incluye una pequeña estructura N-terminal α -hélice y dos hebras triples antiparalelas de hojas β llamadas hojas I y II. Un puente disulfuro entre los aminoácidos 9 y 86 conecta la hélice N-terminal con la hebra β 5 localizada en el C-terminal a la mitad del monómero. La subunidad B forma un pentámero que interacciona entre la lámina β de un monómero y la lámina II de un monómero adyacente. Cada monómero contiene una gran hélice α central (aminoácidos 59 y 78) y en forma pentamérica las hélices forman un barril, formando en el centro del pentámero un poro con diámetro de 11 a 15 Å (1.1 a 1.5 nm). En el C-terminal del poro formado por el pentámero, se une al péptido A₂ a través de múltiples interacciones. El péptido A₂ es una gran hélice α N-terminal que se extiende fuera del pentámero B e interactúa con la subunidad A₁. Esta molécula forma una estructura similar a un triángulo con una base de 57 Å (5.7 nm), esta estructura es homóloga a la región catalítica de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* y la toxina diftérica (Fig. 5).³⁶

1. 6. Plegamiento, Ensamblaje y Secreción de enterotoxinas.

Existe una gran variedad de trabajos en los cuales se explica el sistema mediante el cual algunas toxinas son transportadas a la superficie de la membrana externa. El plegamiento, el ensamblaje y la vía de secreción de CT y LT se han analizado en gran detalle, de tal manera que CT sirve como un prototipo para otras proteínas secretadas a través del sistema general de secreción o sistema tipo II. Recientemente, se ha demostrado que LT se libera en la superficie de la membrana externa e interactúa con el lipopolisacárido (LPS), formando vesículas que llevan la toxina LT al receptor GM₁, que se encuentra en la célula huésped. Después de sintetizarse, las subunidades A y B₅ de la holotoxina, son ensambladas y transportadas a través de la membrana celular, para ser secretadas en el periplasma después de anclarse los residuos 18 y 21 del péptido señal, respectivamente.^{36,40} La secreción de CT se realiza en tres pasos a través del sistema de secreción tipo II, estos son: 1) translocación a través de la membrana interna, 2) plegamiento en el periplasma 3) la secreción a través de la membrana externa. Las subunidades individuales de la toxina son primero producidas como proteínas precursoras con un típico péptido señal N-terminal. Después de la translocación a través de la membrana citoplasmática vía *sec*, los péptidos señal son removidos y las subunidades son liberadas dentro del periplasma, donde se ensamblan no covalentemente dentro de una holotoxina formada por el complejo AB₅, que es ayudado por la isomerasa disulfuro DsbA (TcpG).^{36,41,43} Únicamente cuando se ensambla el complejo de la toxina, atraviesa la membrana externa en un segundo paso que requiere de VcpD y productos de 12 genes adicionales que participan colectivamente en la secreción de proteínas extracelulares.⁴⁴ El pentámero B₅ lleva la información para la translocación en la membrana externa y la subunidad A es secretada por estar asociada con el complejo B₅.^{36,43}

Este sistema general de secreción está constituido por proteínas conservadas, que son codificadas por un grupo de 13 a 15 genes en un operón que permiten la secreción a través de membrana externa.⁴⁰ Se ha observado que LT se secreta de la misma manera que CT, cuando los genes *elxAB* se clonan en un plásmido e introducen en *V. cholerae*. Sin embargo, se sabe poco sobre el mecanismo por el cual se secreta LT, pues sólo se ha reconocido una proteína para el sistema de secreción tipo II en ETEC H10407 (serotipo:O78:H11). Los amino ácidos de dicha vía secretora, tienen homología con la proteína tipo II de la vía secretora requerida por *V. cholerae* para la secreción de CT.⁴⁵

Por otro lado, se han hecho estudios en *V. cholerae*, con la subunidad B de las toxinas LT-IIa y LT-IIb para demostrar la vía secretora del polipéptido B de ambas toxinas al medio extracelular. Esto sugiere, que la vía de secreción de las toxinas LT-IIa y LT-IIb pueden ser de tipo II, como sucede con el transporte extracelular la toxina CT.⁴⁶

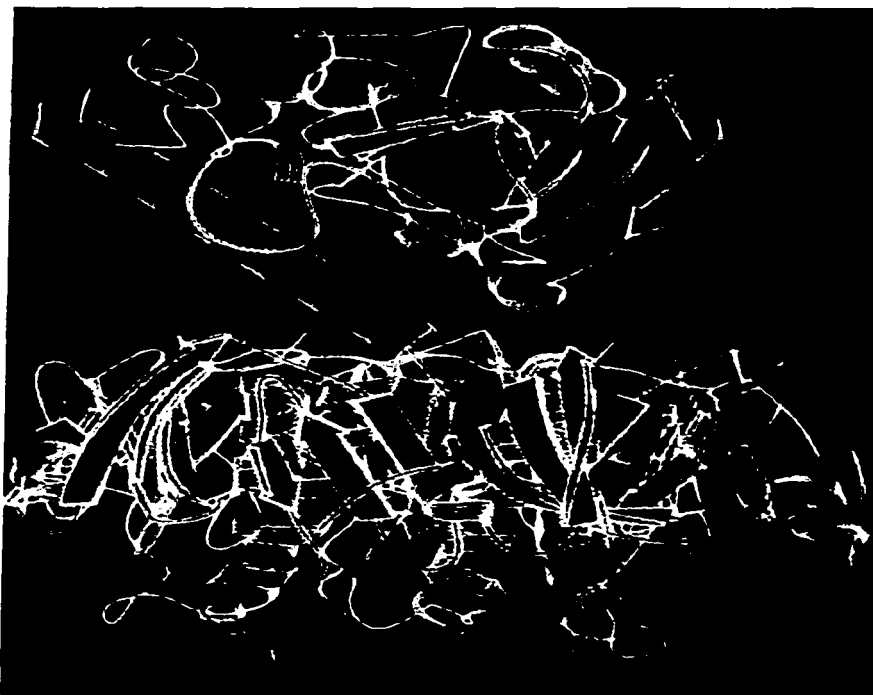


Figura. 5. cristalograma de la holotoxina LT de ETEC. La subunidad A₁, se encuentra en la parte superior y se conecta al pentámero B a través de la estructura helicoidal del péptido A₂.³⁹

1.7. Mecanismo de acción de las toxinas CT y LT.

El de acción de CT y LT es similar, ya que ambas toxinas estimulan básicamente a la adenil ciclasa en las células epiteliales del intestino, dando como resultado una patología que se caracteriza por hipersecreción de electrolitos y agua por las células epiteliales. En el intestino, la subunidad B se une específicamente al oligosacárido del gangliósido GM₁ de la membrana del enterocito. La toxina LT también reconoce los glicoproteínas que se encuentran en los bordes de las vellosidades del intestino (Fig. 6). Estas toxinas se caracterizan por tener las siguientes actividades biológicas: producción de diarrea, acumulación de fluidos en asas ligadas de ratón o conejo, permeabilidad vascular en la piel de conejo, elongación de las células de ovario de hámster chino (CHO) y Vero (African green monkey kidney), además, estas enterotoxinas inhiben la proliferación en células adrenales, aglutinan a los glóbulos rojos de conejo y pueden actuar como adyuvantes de otras moléculas que son poco antigénicas.^{34,36} Los cambios morfológicos en células CHO producidas por estas toxinas también se han observado con lisados y sobrenadante de cultivo de *S. gallinarum*.³²

Las dos toxinas son enzimas que interfieren con la transducción normal de señales en la célula animal, de tal manera que catalizan la transferencia del adenosina difosfato (ADP-ribosa) desde el nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) a la subunidad α de las proteínas G, localizadas en la cara citosólica de la membrana plasmática, bloqueando su actividad GTP_{asa} y de esa forma mantiene la G, permanentemente activa. Esto provoca una continua activación de la adenil ciclasa de las células epiteliales del intestino y un adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) crónicamente elevado, que desencadena una secreción continua de Cl⁻, radicales de bicarbonato (HCO₃⁻) y agua dentro de la luz intestinal. Las holotoxinas CT y LT son introducidas dentro de las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, por la vía de la endocitosis donde A₁ se transloca a través de la membrana vacuolar y pasa a través del aparato de Golgi por un transporte de retroceso. Este polipéptido cataliza la ADP-ribosilación de la arginina 201 de la subunidad α de la proteína G, que es una molécula heterotrimérica y está compuesta de las subunidades α de 39 a 46 kDa, β de 37 kDa y γ de 8 kDa.^{34,47} El ADP que es dependiente del NAD y la proteína G, ADP-ribosilada activa a la adenil ciclasa la cual provoca niveles sobrenormales de AMPc. El AMPc es un mensajero intracelular que regula el transporte en las membranas de varias células epiteliales del intestino y otras enzimas de la célula huésped, por lo cual tiene un efecto sobre el

citoesqueleto. El resultado es un incremento de aniones, predominantemente Cl^- por un efecto directo y HCO_3^- indirectamente por las criptas celulares y un decremento en la absorción de Na^+ y Cl^- por las células. El AMPc tiene un efecto importante sobre el transporte basal y los niveles de calcio intracelular, por lo que una alteración puede incrementar los efectos en el fluido y transporte de iones.^{34,47} Desde otro punto de vista, la principal actividad de CT-A y LT-A dentro de la célula, requiere de varios factores dentro de los cuales se incluyen, agentes reductores, NAD, GTP y proteínas del citosol. Los agentes reductores son requeridos para separar el fragmento A_1 de la holotoxina. El polipéptido A_1 cataliza al NAD por medio de una hidrólisis para dar una ADP-ribosa y transfiere ADP-ribosa del NAD a compuestos de guanidina, así como arginina y a varias proteínas. Varias de esas proteínas solubles y la membrana son requeridas para la ADP ribosilación y activación de la adenil ciclase por CT y LT. También la ADP ribosilación requiere GTP para su activación.⁴⁸ Al elevarse los niveles del AMPc dentro de la célula, hay un incremento en la secreción de iones de Cl^- , Na^+ y agua, dando un efecto osmótico, con pérdida de electrolitos y por lo tanto se produce una diarrea profusa (Fig. 6).^{36,47}

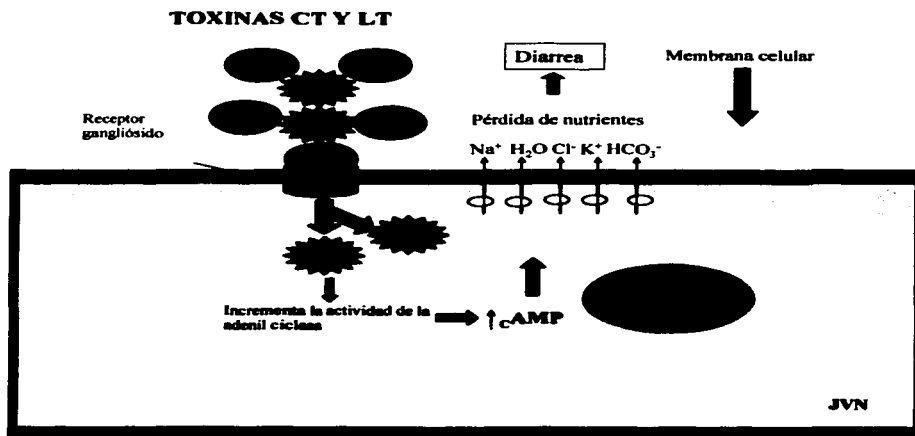


Figura. 6. Esquema del mecanismo de acción de la toxina colérica (CT) y la toxina termolábil (LT) de ETEC.

1.8. Genética de las toxinas CT y LT.

Los genes *ctxAB* y *eltAB*, codifican para las subunidades A y B₂ de las toxinas CT y LT, respectivamente. En *V. cholerae* los genes *ctxAB* están arreglados en un operón, de aproximadamente 7 kb.⁴⁸ Los genes *ctxAB* y *eltAB* tienen una identidad del 78% y la homología en su secuencia de aminoácidos es del 80%. Estudios sobre el origen evolutivo de las toxinas sugieren que los genes *ctxAB* se originaron hace 130 millones de años en *V. cholerae* y después fueron adquiridos por *E. coli*.⁴⁹ En *V. cholerae*, el operón donde se encuentran los genes *ctxAB* se localiza en un fago lisogénico filamentoso (CTXØ) integrado en el cromosoma,^{50,51,52} también se ha encontrado que los genes que codifican la toxina LT-II en *E. coli* se localizan en el cromosoma. Los genes *eltAB* que codifican para la toxina LT-I de ETEC se localizan en un plásmido con un tamaño de aproximadamente 60 Kb.^{53,54,55}

Las dos subunidades de la toxina CT de ETEC son codificadas en dos diferentes marcos abiertos de lectura que se encuentran traslapados. Las dos primeras bases del codón de término (TGA) del gen *ctxA* son las últimas dos bases del codón de inicio del gen *ctxB* (ATG). El gen *ctxA* codifica para un producto de 258 amino ácidos, los primeros 18 residuos son un péptido señal y el producto del gen *ctxB* es de 124 amino ácidos, incluyendo un residuo de 21 amino ácidos que corresponden al péptido señal. Los cistrones A y B poseen sitios de unión al ribosoma inmediatamente corriente arriba de su codón de inicio y la unión del gen *ctxB* se localiza en el extremo 3' de la secuencia del gen *ctxA*. La expresión de la holotoxina, es más eficiente debido a existe una fuerte unión al sitio del ribosoma para la subunidad B.⁵⁶

Se ha reportado que cepas de *V. cholerae* O1 contienen múltiples copias del operón *ctx*. Las cepas clásicas contienen 2 copias del operón, las cuales están separadas en el cromosoma a una distancia desconocida; sin embargo, la cepa el Tor contiene sólo una copia del operón *ctx*, pero aproximadamente el 30% contiene dos o más copias de genes adyacentes. Dentro del operón *ctx* los genes *zot* y *ace* se localizan en la región centro de 4.5 kb, flanqueando esta región, están una o más copias de 2.7 kb llamadas RS1 (Fig. 7). De esta manera recombinaciones entre secuencias RS1 pueden llevar a un duplicado de la región centro, así como una delección y duplicarse. La cepa el Tor de *V. cholerae*, después de tres pases en intestino de conejo, expresa altos niveles de CT y contiene más copias *ctx* que la cepa inoculada originalmente, la amplificación *in vivo* puede ser aumentada por la presencia de un factor de colonización en la región del centro de 4.5 kbs. Las secuencias RS1 codifican un sitio específico transposable que puede insertarse

dentro de una secuencia específica de 18 pb llamada *attRS1*, de tal manera que cepas que carecen de esta secuencia no producen CT. Variaciones en tres posiciones nucleotídicas originan tres genotipos del gen *ctxB*.³⁶

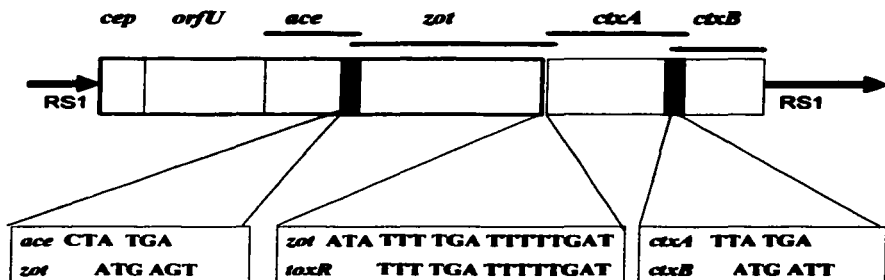


Figura. 7. Arreglo de los genes *ctxAB*, *ace* y *zot* en la región central del fago lisogénico CTXΦ integrado al cromosoma de *V. cholerae*. Los elementos *RS1* se encuentran en ambos lados de la región central.^{36,52}

1.9. Regulación de los genes *ctxAB* y *eltAB* que codifican las toxinas CT y LT.

Bacterias del género *Salmonella*, así como *V. cholerae* y *E. coli*, residen en diferentes ambientes, por ejemplo, en el intestino, en el agua y materia contaminada. Estos ambientes difieren en muchos aspectos, como la temperatura, la osmolaridad y el tipo y los niveles de nutrientes. Esto hace que las bacterias requieran de diferentes genes para su desarrollo. *V. cholerae* tiene un regulón específico para crecer y sobrevivir en el humano, lo cual hace que responda a señales del ambiente. Este regulón está bajo el control de la proteína ToxR (32.527 kDa), que es codificada por el gen *toxR*. Esta proteína es un activador transcripcional, que controla la expresión de la toxina colérica, los pili y proteínas de la membrana externa en *V. cholerae*.^{57,58}

Las expresión de la toxina CT es regulada por varias condiciones ambientales, por ejemplo, cultivos bacterianos incubados a 30°C, producen niveles más altos de toxina que cuando se incuban a 36°C. La temperatura es regulada por la proteína ToxR localizada en el periplasma de la bacteria, que censa las señales medioambientales.⁵⁹ Por otro lado, un medio con pH de 6.6, así como una concentración adecuada de oxígeno favorece la producción de CT.^{58,60} De esta manera, las señales que regulan la expresión del regulón ToxR promueven la expresión de CT. También se sabe que *V. cholerae* y *E. coli* ETEC, requieren de una adecuada concentración de iones en el medio de cultivo para que se exprese una óptima concentración de toxinas CT y LT, lo cual sugiere que la osmolaridad es una señal reguladora. Los aminoácidos como asparagina, arginina, glutamato y serina en el medio de cultivo, también inducen la sobreexpresión de estas enterotoxinas.⁶¹ La osmolaridad del suero sanguíneo, que equivale a 150 mM de NaCl, y la acción de proteasas sobre los aminoácidos pudieran favorecer la colonización por estas bacterias en el epitelio intestinal.^{56,62} Por otro lado, CO₂ a una concentración del 5%, así como sales biliares en los cultivos de *V. cholerae*, incrementan la producción de la toxina CT.

Las señales ambientales regulan la expresión de factores de virulencia en bacterias patógenas, por ejemplo, en bacterias del género *Salmonella*, la osmolaridad, falta de nutrientes, estrés, pH y la microgravedad en la fase de crecimiento, afecta numerosos parámetros de virulencia en este microorganismo.^{62,63}

1.10. Receptores de las toxinas CT y LT.

El receptor de la toxina colérica y la toxina LT es el gangliósido GM₁. La subunidad B_s reconoce a 5 monosacáridos del GM₁ expuestos en la superficie de la membrana celular. La unión polipéptido B_s al receptor GM₁, es a través del triptofano 88 de cada uno de los monómeros del polipéptido, que se une a los carbohidratos del receptor localizado en las células epiteliales del intestino. Se ha observado que sustituciones de una lisina por la arginina 7 causa una desestabilización substancial en el asa que comprende los residuos 47-56 y por lo tanto, ocurre un cambio que evita la unión al sustrato. Por otro lado, la sustitución del aminoácido lisina por la valina 97 inhibe la actividad catalítica de la toxina. En la toxina CT, la lisina de la cadena de aminoácidos de los monómeros de B_s, ocupan un lugar en el interior de la cavidad del receptor, desplazando moléculas de agua.^{37,64,65}

La subunidad pentamérica B₅ de la toxina presenta una actividad similar al de una lectina, para unirse al receptor específico de la membrana de la célula blanco, esta unión es de alta afinidad y estabilidad. La acción de las toxinas CT y LT sobre la célula epitelial, se caracteriza por una fase de intervalo entre la unión de la toxina a los receptores GM₁ de la superficie celular y es el primer signo detectable de toxicidad. Durante esta fase de revestimiento ocurren varios eventos como la polarización de las células epiteliales, incluyendo el tráfico del polipéptido con actividad enzimática de los receptores en la superficie de la célula, al aparato de Golgi y el retículo endoplásmico de la célula.⁶⁵

1. 11. Utilización de las toxinas CT y LT como inmunógenos y adyuvantes.

La inmunidad conferida por proteínas administradas por mucosa es pobre y frecuentemente se recurre a un adyuvante. En este sentido, las toxinas CT y LT son un potente adyuvante mucosal, que se ha usado para inducir inmunidad protectora contra *Helicobacter felis* y *Helicobacter pylori* en ratones. La subunidad LTB tiene una actividad de adyuvante cuando se usa con la ureasa de *H. pylori* por vía parenteral en ratones y se ha observado que hay protección contra *H. pylori* cuando los ratones fueron desafiados, esta inmunización aumenta los títulos de IgG en el suero como cuando se usa hidróxido de aluminio como adyuvante.⁶⁶

Se ha observado que la subunidad A₁ de CT y LT-IIIa coadministradas con la región de unión salival (SBR) de la adhesina Ag/II de *Streptococcus*, inducen una respuesta alta de anticuerpos IgG en plasma e IgA en mucosa de ratones inoculada por vía intranasal. Estas proteínas quiméricas, aumentan significativamente la expresión de células B (B7-2) y proliferación de células T CD4⁺ en ratones.^{67,68}

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.

Considerando que la tifoidea aviar causada por *S. gallinarum* se caracteriza principalmente por causar una diarrea acuosa en las aves, y que origina pérdidas importantes para la avicultura nacional. Es conveniente establecer el mecanismo por el cual *S. gallinarum* produce la diarrea, así como, el sistema que utiliza este microorganismo para penetrar e invadir las células del huésped. En este sentido, previamente Balcázar describió un fragmento en el genoma de esta bacteria, con una identidad del 95% con respecto al gen *eltA* de ETEC y que Urquiza reportó elongación en células CHO expuestas al sobrenadante de cultivo y lisado de *S. gallinarum*. El objetivo del presente trabajo se planteó con la hipótesis de que los genes que codifican para una enterotoxina similar a LT y CT, se encuentran presentes en el genoma de *S. gallinarum*. El desarrollar nuevos métodos que ayuden a esclarecer estos mecanismos de patogenicidad en *S. gallinarum*, pueden ser de utilidad, para llevar a cabo medidas que contribuyan al control y erradicación de este agente infeccioso, aunado a otros serotipos del género *Salmonella*, que causan gran impacto económico entre los avicultores y la salud pública, motivo por el cual, el gobierno mantiene una Campaña Nacional permanente para el control y la erradicación de la salmonelosis aviar.

3. OBJETIVOS.

3. 1. Objetivo general.

Clonar y caracterizar los genes que codifican para la enterotoxina *LT-like* de *Salmonella gallinarum* y determinar la actividad biológica de su producto recombinante *in vitro* e *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos.

3.2.1. Identificar y caracterizar los genes que codifican para la enterotoxina *LT-like* en *Salmonella gallinarum*.

3.2.2. Clonar, transformar y expresar en *Escherichia coli*, los genes que codifican para la enterotoxina *LT-like* de *S. gallinarum* e identificarla mediante el uso de anticuerpos específicos.

3.2.3. Producir y purificar las toxinas *LT-like* recombinante y nativa de *S. gallinarum* para su caracterización y evaluación biológica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

Se utilizaron 11 cepas de *S. gallinarum* aisladas de casos clínicos en México, incluyendo la cepa FVA-1 que se utilizó para la identificación de los genes *eltAB-like* y producción de la toxina nativa *LT-like*. También se utilizaron las cepas: 9184-ATCC (*American Type Culture Collection*) de *S. gallinarum*, 10398-ATCC de *S. pullorum*, fagotipos 2, 4, 8, y 13 de *S. enteritidis* y la cepa IMSS-1 de *S. typhi*.^{69,70} Como cepas controles productoras de LT se utilizaron, ETEC H10407 y ETEC portando el plásmido pDWE-299. Las cepas no productoras de LT fueron, *Yersinia enterocolitica* M1:O:9 y *Brucella melitensis* M16. Todas las cepas, fueron incubadas durante 18 h a 37 °C en una incubadora con agitación orbital a 200 revoluciones por minuto (rpm) (*Lab-line instruments; Illinois, USA*) excepto *B. melitensis* que se incubó durante 72 h. Los medios que se utilizaron para el cultivo de bacterias del género *Salmonella* y *E. coli* fueron, caldo y agar nutritivo (medio "A"). El medio "A" se preparó en 250 ml conteniendo, caldo nutritivo 1.75 g. (*Difco; Detroit, Michigan USA*), extracto de levadura 0.25 g. (*Difco Detroit, Michigan USA*), glicerol 0.5 ml (*J.T. Baker; Xalostoc, Edo. de México*), K₂HPO₄ 0.925 g (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*). y KH₂PO₄ 0.325 g (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*) como lo refiere Vázquez.⁷⁰ Para el cultivo de *B. melitensis* se usó caldo y agar brucella (*Difco Detroit, Michigan USA*) siguiendo la metodología descrita por Ruíz Castañeda.⁷¹

4.2. Extracción de DNA de genómico y de plásmido.

El DNA genómico fue obtenido por extracción con fenol: cloroformo y CTAB (cetyltrimethylammonium bromide). Los megaplásmidos fueron purificados por lisis alcalina, con un sistema de purificación para plásmidos de alta y baja expresión (*Qiagen HiSpeed, Stanford, USA*).^{72,73} El DNA genómico y los plásmidos fueron cuantificado por medio de espectrofotometría en ng/μl, a una densidad óptica de 250 nm (*Ultraspec-3000, Pharmacia Biotech Cambridge England*) y visualizados en geles de agarosa al 1% y 2%, teñidos con bromuro de etidio. Finalmente los DNAs fueron analizados en un

digitalizador de imágenes (*Fluor-S Multimager Sistem. California, USA*) y las extracciones de DNAs fueron conservadas a 4°C para posteriores trabajos.

4. 3. Identificación de los genes *eltAB-like* de *S. gallinarum* por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los genes *eltAB-like* fueron amplificados, a partir de DNA genómico y megaplásmido de *S. gallinarum* FVA-1. También fueron amplificados por separado el gen *eltA-like* y el gen *eltB-like*, en las cepas de *S. gallinarum*. Se usó como control positivo DNA de ETEC-H10407 y como negativo DNA de *Yersinia enterocolitica* 16-M₃O:9.

Los iniciadores utilizados fueron 5'-TGATTGACATCATGTTGCA-3' y 3'-TAGTATAAGTACAGTAGTTGTT-5', diseñados a partir de la secuencia de los genes *eltAB* que codifican para la toxina LT de ETEC (gb-S60731), para amplificar cada gen se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en el Tabla 1.⁷⁴

Las PCR se realizaron en un termociclador (*Gen Amp PCR-9700; New Jersey, USA.*), utilizando un volumen final de 50 µl por reacción. El protocolo fue el siguiente: en un tubo de 200 µl se depositaron 3 µl (10 ng/µl) de DNA, en seguida se adicionaron 47 µl de premezcla, la cual se preparó con 5 µl de amortiguador para PCR 1X, 3 µl MgCl al 1.5 mM (*Roche; New Jersey, USA*), 2 µl de una mezcla de dNTPs 100 µM cada uno (*Amersham Pharmacia Biotech; New Jersey, USA*), 1.5 µl de cada uno de los iniciadores (*Gibco BRL; New York, USA*), 0.5 unidades de DNA polimerasa (*Biocientíficas Universitarias, México D. F.*) y 33.5 µl de H₂O destilada estéril.

La reacción de PCR, inició con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, posteriormente la amplificación se realizó durante 30 ciclos, usando el siguiente programa: desnaturalización a 94°C por 1 min para iniciar el ciclo, alineamiento a 41°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min. Al finalizar los 30 ciclos, la reacción concluyó con una extensión final a 72°C por 15 min.

Los productos del PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con 3 µg de bromuro de etidio (*GIBCO-BRL, New York, USA*), colocando 5 µl de la reacción de PCR con 2 µl de amortiguador para depositar el DNA, preparado según Sambrook y col.⁷² Los fragmentos amplificados fueron observados y analizados con el programa *quantity one* (*Fluor-S Multimager Sistem; California, USA*).

4. 4. Secuenciación de los genes *eltAB-like* de *S. gallinarum*.

Un fragmento amplificado por PCR de 1,275 pb, fue secuenciado con el método de Sanger.⁷⁵ Los iniciadores se diseñaron a partir de la secuencia del los genes *eltAB* que codifican para la toxina LT de ETEC (*gb-S60731*), tres juegos fueron diseñados para secuenciar el gen *eltA* y 2 para secuenciar el gen *eltB* (Tabla 1). La secuenciación se realizó usando 20 ng de DNA por reacción, marcando los oligonucleótidos con digoxigenina (*GIBCO-BRL; New York USA*) y las muestras se procesaron en un secuenciador automático (*ABI-CE1 modelo 310, New York, USA*) en ambos sentidos.

TABLA 1.

OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR Y SECUENCIAR LOS GENES *eltA* y *eltB* DE *Salmonella gallinarum* FVA-1.

| OLIGONUCLEÓTIDOS | SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS | TAMAÑO | GC % | T _m | LOCALIZACIÓN EN LA SEC. <i>gb-S60731</i> |
|--|--|----------------------|----------------------|----------------------|--|
| * <i>eltA</i> ₁ * <i>eltA</i> ₂ | TGATTGACATCATGTTGCA CTTAAGCCTACTTAATAC | 19 19 | 36 36 | 63 63 | 1-19 833-852 |
| <i>eltA</i> ₁ <i>eltA</i> ₂ | CCGTGCTGACTCTAGAACDCC CCGGTGGGAAACCTGCTAATC | 21 21 | 66 57 | 55 51 | 161-181 619-639 |
| <i>eltA</i> ₃ <i>eltA</i> ₄ * <i>eltB</i> ₁ <i>eltB</i> ₂ | GAACAGGAGGTTTCTGGGTT GGGAGCTCCGGTATGACACATA CCGGTTACTTATCTCTC GGCGCAATTGAATTGGGGC | 20 20 18 19 | 50 55 46 50 | 50 52 66 69 | 449-469 889-909 871-888 1177-1195 |
| <i>eltB</i> ₁ * <i>eltB</i> ₂ | ATCTGACCGAGACCAAAA TAGTATAAGTACAGTAGTTGTT | 18 22 | 44 22 | 42 46 | 1138-1148 1253-1275 |

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para identificar y secuenciar los genes *eltAB-like* en *S. gallinarum*, diseñados a partir de la secuencia de los genes *eltAB* que codifican para CT de ETEC reportada por Takashi y col.⁷⁴ *Oligonucleótidos *eltA*₁₋₃ se utilizaron para amplificar el gen *eltA-like* y los oligonucleótidos *eltB*₁₋₂ para amplificar el gen *eltB-like*.

4. 6. Producción de la toxina LT-Ilike y nativa de *S. gallinarum*.

Cuatro litros de cultivo de *Escherichia coli* DH10B portando el plásmido pJV-001. La bacteria fue crecida en medio líquido con casaminoácidos (*Difco laboratories, Detroit M; USA*), suplementado con 100 µg/ml de kanamicina (*SIGMA Chemical; St. Louis Mo. USA*), IPTG 5 µM (*Sigma Chemical, Steinheim Germany*) y 1 ml de trazas de sales. También se preparó toxina a partir de *S. gallinarum* FVA-1 y *E. coli* H10407, usando el mismo medio. La mezcla con trazas de sales se preparó con 5.0% de MgSO₄ (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*), 0.5% de MnCl₂ (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*) y 0.5% de FeCl₃ (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*) disuelto en de H₂SO₄ 0.001 N (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*).⁷⁶ El cultivo se incubó a 37°C con agitación oscilatoria a 200 rpm durante 18 h (*Lab-line instruments; Illinois, USA*). Las células fueron centrifugadas a 6,940 g, a 4°C, en una centrífuga *Beckman* modelo J2-21 con rotor JA-20 (*Beckman Company; CA, USA*). Las bacterias fueron suspendidas con 10 ml de PBS 10 mM (pH 7.4) y posteriormente las células fueron sonicadas en hielo con 8 pulsos de 60 seg cada uno, hasta clarificar la suspensión (*Cole Palmer International, Vernon Hills, USA*). Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 6,940 g durante 15 min y la proteína fue filtrada en una membrana con un poro de 0.45 µ (*Sarsted; Numbrecht, Germany*). Después, la proteína cruda fue tratada con el inhibidor de proteasas PMSF (Phenyl-methylsulfonyl fluoride) (*Sigma Chemical, Steinheim Germany*) y se guardó en refrigeración para su purificación.⁷⁶

4. 7. Purificación de las enterotoxinas LT-Ilike recombinante y nativa de *S. gallinarum*.

La proteína cruda fue aislada del periplasma por sonicado y purificada con el método modificado de Clements y Finkelstein,⁷⁶ a través de una columna de cromatografía inmovilizada con D-galactosa (*Pierce, Illinois, USA*). La columna (1.5 X 15 cm) fue empaquetada con 10 ml de D-galactosa, la cual fue equilibrada con 500 ml de amortiguador TEAN 10 mM a 4°C, preparado con Tris-HCl 50 mM pH 7.4 (*SIGMA Chemical; St. Louis Mo. USA*), NaCl al 0.2 M (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*), NaN₃ al 3 mM (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*) y EDTA al 3 mM (*Sigma Chemical; Steinheim Germany*).⁷⁸ La toxina cruda fue agregada a la columna de D-Galactosa, utilizando 5 ml de la proteína sonicada (21 µg/µl), y fue colectada en 25 fracciones de 1.5 ml cada una. Posteriormente, la enterotoxina fue eluida en 20

fracciones con solución amortiguadora TEAN 10 mM con D-(+)-Galactosa 0.3 M. Las fracciones colectadas de la columna de afinidad fueron leídas en un espectrofotómetro *Ultrospec-3000 (Pharmacia Biotech Cambridge England)*, a una densidad óptica de 280 nm y graficadas. Se concentraron 30 ml de proteína eluida en solución TEAN con D-(+)-Galactosa 0.3 M en una membrana de Amicon YM 30 (*Millipore Corporation, Bedford USA*).⁷⁸

La proteína purificada fue cuantificada por el método de Bradford⁷⁹ y filtrada a través una membrana estéril con poro de 0.22 µm (*Sarstedt, Numbrecht Germany*) para utilizarla en ensayos de actividad biológica y asas ligadas en conejo y pollo.

4. 8. Identificación de la toxina LT-like mediante geles de acrilamida e Inmunotransferencia.

La toxina LT-like recombinante fue diluida con un volumen igual (50 µl/50 µl) de solución amortiguada constituida por Tris-HCl, 0.5 M (*Sigma Chemical; Steinheim Germany*); glicerol, 20% (*J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México*); SDS, 10% (*Sigma Chemical; Steinheim Germany*); 2-β-ME, 1% (*Sigma Chemical; Steinheim Germany*) y azul de bromofenol 0.05% (*Sigma Chemical; Steinheim Germany*) (*Sambrook y col. 1989*). Las muestras de proteína se calentaron a 95°C por 5 min y se depositaron 20 µl (0.8 µg/µl) de proteína en cada uno de los carriles. Posteriormente, las proteínas fueron separadas mediante geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli.⁸⁰ El gel concentrador se preparó al 4% y el separador al 12.5% y fueron corridos a 40 mA y 90 mA respectivamente.⁷³ La transferencia se realizó sobre una membrana de nitrocelulosa de 8 X 10.5 cm (*Amer sham Life Science, USA*). La solución de corrida se preparó con Tris 25 mM (*Sigma-Adrich; Missouri, USA*), glicina al 152 mM (*Sigma-Adrich; Missouri, USA*) y 20% V/V de alcohol metílico.⁷² La transferencia se realizó por 1 h, posteriormente las membranas fueron bloqueadas durante 30 min con leche descremada al 5%, la membrana se lavó 3 veces con 100 ml de solución TBS-T, se agregó anti-CT diluido 1:1000 en TBS-Tween-20 (*Sigma Chemical; Steinheim Germany*) y se dejó incubar toda la noche. La membrana se lavó tres veces, y se agregó anti-IgG de conejo marcados con peroxidasa (*Sigma-Adrich; Missouri, USA*), diluido 1:1000 en TBS-T y la membrana se incubó por 60 min a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con 100 ml de TBS-T y se reveló con 0.060 mg de 4 choro-naphtol (*Sigma-Adrich; Missouri, USA*) 20 ml de metanol y 100/µl H₂O₂

(J.T. Baker; Xalostoc Edo. de México) en 100 ml TBS. La reacción se paró con agua fría, cuando las proteínas fueron visibles.⁸¹

4. 9. Actividad biológica de la toxina LT-like en cultivos celulares (CHO y Vero).

Células CHO (Chinese hamster ovary) y Vero (kidney African green monkey) fueron descongeladas y propagadas en medio F12 y D-MEM (GIBCO Invitroyen Corporation; New Cork, USA) con suero fetal bovino al 10% (GIBCO Invitroyen Corporation; New Cork, USA), con 2% de bicarbonato (GIBCO Invitroyen Corporation; New Cork, USA), 1% L-glutamina (GIBCO Invitroyen Corporation; New Cork, USA) y 1 ml de HEPES como regulador de pH (GIBCO Invitroyen Corporation; New Cork, USA). Las células fueron cultivadas en botellas 250 ml (NUNC; Roskild, Denmark) con 15 ml de medio de F12 para células CHO y D-MEM para las células Vero y se incubaron durante 72 h a 37 °C en un ambiente con 5% de CO₂. Posteriormente, la monocapa de células adheridas a la pared de las botellas (área de 75 cm²), con aproximadamente 1.5X10⁵ células, fueron desprendidas con 1 ml de tripsina al 0.05%. La confluencia de células resuspendida en los medios F12 y D-MEM, fue aproximadamente del 70% (105,000 células).⁸² Los ensayos de actividad biológica de las toxinas se realizaron en placas de 96 pozos, depositando 100 µl de ambas líneas celulares por pozo y se incubaron a 37°C durante 24 h, hasta alcanzar una confluencia aproximada del 70% (700 células). Después se desechó el sobrenadante de las células, y se agregaron 100 µl de los medios F12 y D-MEM, para cada una de las líneas celulares y se expusieron a las toxinas con una concentración inicial de 5 µg (5,000 ng) y después se hicieron diluciones dobles seriadas (1:10) en la misma hilera, quedando las siguientes concentraciones: 500 ng, 50 ng, 5 ng, 500 pg, 50 pg y 5 pg. Las células se expusieron a las toxinas en las microplacas de la siguientes manera: hileras A-B, LT-like recombinante; C-D, LT-like de *S. gallinarum* FVA-1; E-F, LT de ETEC H-10407 y G-H, toxina control CT de *V. cholerae*. Los pozos que corresponden a las columnas 1 y 2 de las microplacas, se utilizaron como control negativo y solo se les agregó medio F12 o D-MEM según la línea celular. Las células fueron observadas cada hora durante 12 h, después se fijaron con metanol y se tificaron con Giemsa al 0.4% (Sigma-Adrich; Missouri, USA) para observarlas en un microscopio invertido y fotografiarlas. Los cambios morfológicos observados en el 50% de las células (aproximadamente 500) examinadas, fueron considerados como 1 unidad de actividad sobre las células.^{82,83,84}

4. 10. Características fisicoquímicas de la toxina LT-like.

Este ensayo se realizó con la finalidad de determinar las características fisicoquímicas de la toxina LT-like, las pruebas se realizaron en microplacas de 96 pozos, utilizando las mismas líneas celulares, con una confluencia aproximada del 70% de células CHO. La toxina LT-like recombinante expresada en *E. coli* (DH10Br/pJV-001), previamente fue calentada a 75°C por 15 min, tratada con 37 µg de proteinasa K (*Amresco; Ohio, USA*) en 100 µl y 25 µg de toxina fueron tratadas con 100 µl de suero contra CT, el cual previamente fue titulado por ELISA (1:10,000). El efecto se observó cada hora hasta las 9 h.⁷⁷

4. 11. Actividad biológica de la toxina LT-like en asas ligadas de conejo y pollo.

Los ensayos de actividad biológica en asas ligadas, se practicaron utilizando el modelo clásico en conejo. El modelo del pollo se implemento por ser el hospedero natural de *S. gallinarum* y previamente este modelo, fue utilizado para evaluar la virulencia de las cepas U2, 323 y FVA-1 de *S. gallinarum*.⁷⁰ Se utilizaron cuatro conejos blancos de la raza Nueva Zelanda de 4 meses de edad, con un peso promedio de 2 Kg.^{77,85} Por otro lado, se utilizaron 4 pollos SPF (*Specific-Pathogen-Free*) de la raza *White Leghorn* de 12 semanas de edad.⁷⁰

Los conejos y pollos fueron anestesiados con 30 mg de ketamina por vía intramuscular, posteriormente fue rasurada y desinfectada la zona de cirugía. El abdomen fue abierto asépticamente y la porción ílica del intestino delgado fue dividido en 5 asas de aproximadamente 15 centímetros por doble ligadura. La dosis fue determinada con base en el peso de los animales.⁸⁶ Cada asa se inoculó con 0.5 ml de toxina (100 µg/ml), de la siguiente manera: 1) control positivo CT (*Sigma-Adrich; Missouri, USA*), 2) control negativo PBS, 3) LT-like recombinante 4) LT-like de *S. gallinarum* FVA-1 y 5) LT de ETEC H.10407. Los conejos y los pollos fueron sacrificados a las 18 h y fue examinada la secreción en cada asa. Se determinó el índice de dilatación (ID) en cada uno de los animales, considerando como positivo un ID igual o mayor 1 ml en los ensayos de asas ligadas.⁷⁷

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de los genes *eltAB-like*.

Ambos genes *eltAB* de *S. gallinarum* fueron amplificados completamente a partir de DNA genómico y de plásmido, este último con un tamaño aproximado de 86 kb. El tamaño del fragmento amplificado fue de aproximadamente 1,275 pb, el cual es similar al tamaño de los genes que codifican la toxina LT producida por la cepa H10407 de ETEC (Fig. 9). Por otro lado, también fueron amplificados cada uno de los genes por separado, con la finalidad de corroborar la presencia de cada uno. El fragmento correspondiente al gen *eltA* fue de 739 pb y los iniciadores utilizados se denominaron *eltA₁* y *eltA₂*, que fueron diseñados a partir de la secuencia del gen *eltA* de la cepa H10407 de ETEC. Un fragmento de 430 pb correspondiente al gen *eltB* fue amplificado, usando los oligonucleótidos denominados *eltB₁* y *eltB₄*, diseñados a partir de la secuencia del gen *eltB*. Los genes amplificados fueron muy similares al tamaño de los genes *eltA* y *eltB* que codifican la toxina LT (Fig. 10. A y B).

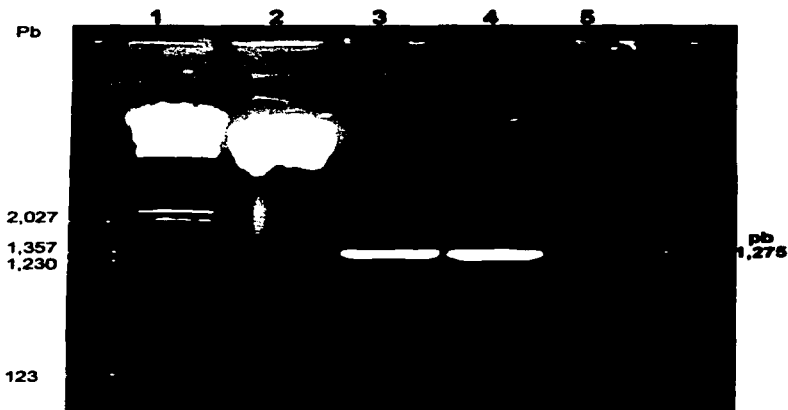


Figura 9. Análisis de los genes *eltAB-like* de *Salmonella gallinarum*, por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA cromosomal: carriles 1 y 2 marcadores de peso molecular (λ DNA/*Hind* III y DNA ladder 123); carril 3, genes *eltAB* de ETEC cepa H10407; carril 4, genes *eltAB-like* de *S. gallinarum* FVA-1; carril 5, *Y. enterocolitica* 16M₃ O:91.

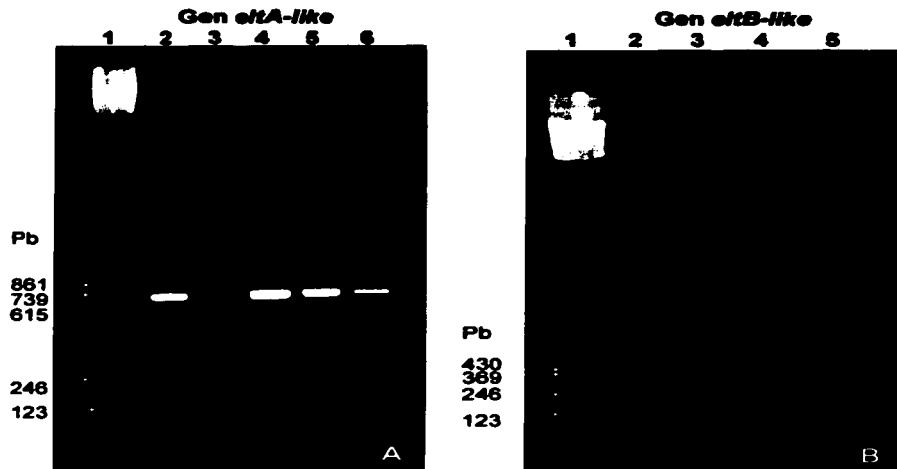


Figura 10. Análisis de los genes *eltA-like* y *eltB-like* de *S. gallinarum*, por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR): **A)** carriles 1 marcador de peso molecular (DNA ladder 123); carriles 2 y 3, gen *eltA* de cromosoma y plásmido de ETEC cepa H10407; carriles 4 y 5, gen *eltA-like* de cromosoma y plásmido de *S. gallinarum* FVA-1; carril 6, gen *eltA* de *S. gallinarum* FVB-323. **B)** carril 1, marcador de peso molecular (DNA ladder 123); carriles 2 y 3, gen *eltB* de cromosoma y plásmido de ETEC cepa H10407; carriles 4 y 5, gen *eltB-like* de cromosoma y plásmido de *S. gallinarum* FVA-1.

Por otro lado, los genes *eltAB-like* también fueron amplificados a partir de DNA genómico de 9 cepas de *S. gallinarum*, una de *S. pullorum* (ATCC-10398), una de *S. typhi* IMSS-1 y 4 cepas de *S. enteritidis* fagotipos 2, 4, 8 y 13 aisladas de casos clínicos en granjas avícolas. De las 9 cepas de *S. gallinarum* se amplificó un fragmento de 1,275 pb, el cual correspondió a los genes *eltAB-like*. Del total de cepas estudiadas, de 7 un fragmento de 739 pb, correspondiente al gen *eltA-like* y de 9 se obtuvo un fragmento de 430 pb correspondiente al gen *eltB-like*. A partir de la cepa vacunal 9R se amplificó un fragmento de 1,275 pb que corresponde a ambos genes *eltAB*.

Los fragmentos que correspondieron a los genes *eltAB-like*, *eltA-like* y *eltB-like* comigraron en geles de agarosa con los fragmentos de las cepas controles de *E. coli* H10407 (gb-S60731) y *E. coli* transformada con el plásmido pEWD299 (gb-M57244), que portan los genes *eltAB* de ETEC (Fig. 11). En 7 cepas de *S. gallinarum* se aisló un

plásmido de aproximadamente 86 kb, a partir del cual también se amplificó un fragmento de 1,275 pb.

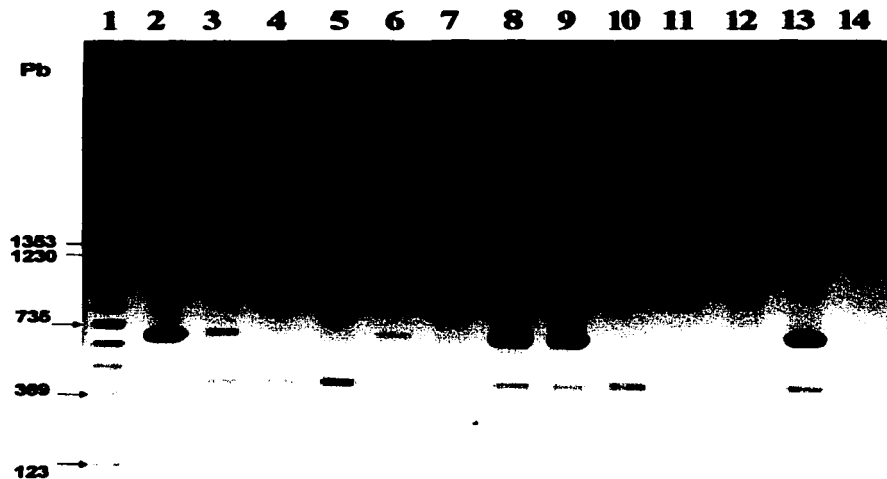


Figura 11. Análisis de los genes *eltAB* (1,275 pb), genes *eltA-like* (739 pb) y *eltB-like* (430 pb) en varias cepas *Salmonella gallinarum*, por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA cromosomal. Carril 1, marcador de DNA *ladder* 123; carril 2, FVA-1; carril 3, U-2; carril 4, 323; carril 5, 383; carril 6, 591; carril 7, 415; carril 8, ATCC-9184; carril 9, 285; carril 10, 347; carril 11, vacuna 9R; carril 12, *S. typhi* IMSS-1; carril 13, *E. coli* ETEC H10407; carril 14, *Y. enterocolitica* 16M3 O: 9.

5. 2. Análisis de la secuencia nucleotídica de los genes *eltAB*-like.

El análisis nucleotídico se realizó con el programa *Omiga* (1.1). En el segundo marco abierto de lectura se encuentra el gen *eltA-like* el cual consta de 795 pb que codifica para una proteína 265 aminoácidos. Este marco abierto de lectura consta de un codón de inicio universal con ATG que correspondió a una metionina, situado en las bases 47-49 y el codón de término que se encuentra en las bases 841-843 (Fig. 12 y 13), éste corresponde a un TGA el cual es una glutamina.

En el primer marco abierto de lectura se localiza el gen *eltB-like* el cual consta de 372 pb que codifican para 124 aminoácidos, inicia con una ATG en las bases 840-842 que corresponde a una metionina y el codón de término se encuentra en las bases 1212-1214 el cual es una TAG que corresponde a una leucina (Fig. 12).

La secuencia de unión al ribosoma se encontró en las bases 176-178 y corresponde a una serina. El alineamiento de la secuencia nucleotídica de los genes *eltAB-like*, fue basado en el *GenBank* (NCBI-BLAST), indicando que tienen una identidad del 98% con los genes *eltAB* que codifican para LT de ETEC y del 79% para los genes *ctxAB* que codifican para CT de *V. cholerae*. La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica, presentó una identidad del 93% para la subunidad LTA y 95% para la subunidad LTB de la toxina LT de ETEC. Con respecto a CT la identidad para CTA fue del 75% y para CTB del 79% (Fig.13).

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS (GENES: *elAB* *like* y *elAB*)
***S. gallinarum* FVA-1 (Superior), *E. coli* H10407 (Inferior).**

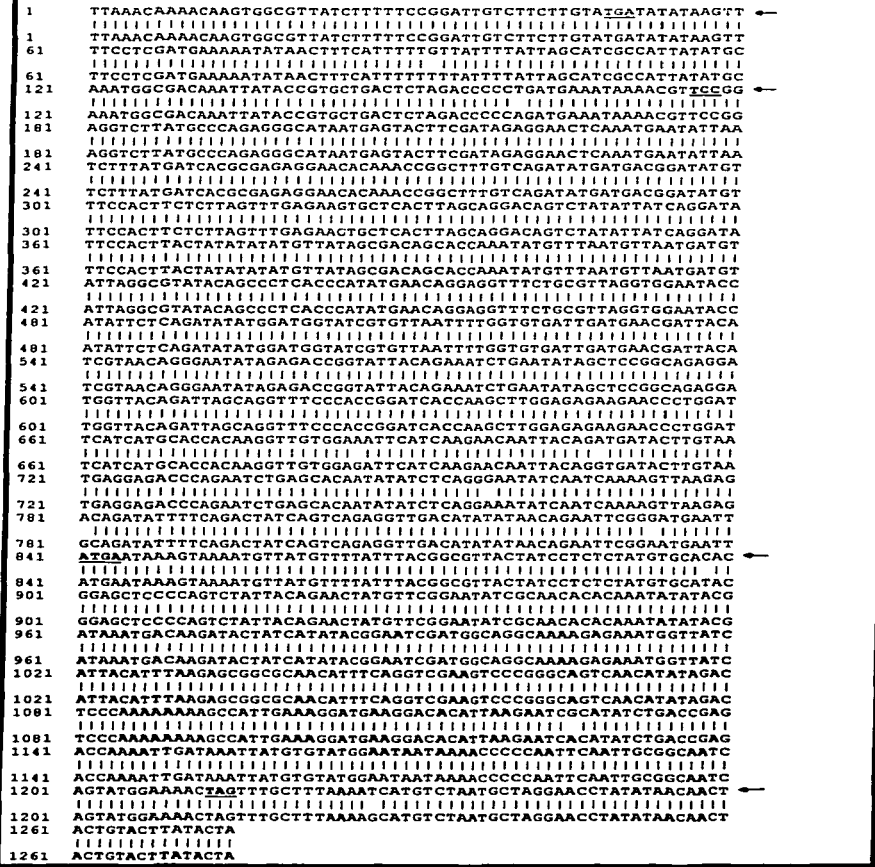


Figura 12. Alineamiento de la secuencia nucleotídica completa de los genes *elAB-like* de *Salmonella gallinarum* FVA-1 con la secuencia de los genes *elAB* de *E. coli* ETEC cepa H10407. En color verde se indican los codones de inicio, en rojo los codones de término y en azul el sitio de unión al ribosoma.

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DEL GEN
elta-LIFE (1-797 pb) DE *S. gallinarum* FVA-1.

CODIGO UNIVERSAL.

TOTAL DE AMINOÁCIDOS: 265. PESO MOLECULAR: 30692.

1 ATGATATATATAAATTTTCTCTCGATGAAAATATATACTTTTCAATTTTGTATTTTATGCA
1 N X T K F S S H E N I T F I V Z L L A
61 TCCCAATATATGCAAAATGCGACAAATTAACCTGCTGCTGCGACCCOCTGTATGA
21 S P L Y A N G D E L L T R A D S R P P D S
121 ATAAACCTTCCGAGGCTTATGCCCGAGGCGCATATGAGTACTTCCGATAGGCACT
41 I K R S G G L N F R G E N H Y F D R G T
181 CAATGAAATATATCTTTATGATCACCGCGAGGACACAAACCGCTTTGTCAGATAT
61 Q M N I N L Y D E A R G T Q T G P V R T
241 GATGACCGATATGTTTCCACTTCTCTTATTTGAAATGCTCTCACTTACAGGCACTCT
81 D D G Y V S T S L S L R S A N L A G Q S
301 ATATTAACAGGATATGCCACTTCTATATATATATGTTATGCGAGCACCAAAATATGTTT
101 Y L S G Y S T T T T V I A T A P H N F
361 AATGTTAATGATATATGAGCGTATACAGCCCTCACCCCATATGACAGCGAGTTCTGCG
121 N V N D V L G V Y S P E P T E Q E V S A
421 TTAGTGGAAATACCATATTTCTCAGATATATGATGOTATGCGTTTAAATTTGCTGTGATT
141 L G G I P Y S Q I Y G W Y R V N F G V I
481 GATGACGATTTACATGCTATCAGGGAATATGAGCGCGGCTATTTCCAGAAATCTGAAATA
161 D E R L E R N R E Y R D R T Y R N L N I
541 GCTCCCGCAGAGGATGCTTACAGATTAACAGCTTCCCAACCGGATCCACCACTTGAGAA
181 A P A E D G Y R L A G F P P D E Q A W R
601 GAAGAACCTGCAATTCATCTGCGCCGACAGGTTTGGAAATTCATGACAGACATPCCA
201 E S P W I E E A P Q G C S S S R T I T
661 GATGACTTGTATATGAGGAGACCAATCTGACACCAATATATCTCAGGGAATGCA
221 D D T C M E S T Q N L S T I Y L R E T O
721 TCAAAATGAGGACCAATTTTCAAGCTATCATGCGAGGTTTCCATATATACAGA
241 S K V K R Q I F S D Y Q S E V D I Y R
781 ATTCGGAATGAAATRS
261 I R D E L

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUCIDA DEL GEN
eltB-LIKE (1-372 pb) DE *S. gallinarum* FVA-1.

CODIGO UNIVERSAL.

TOTAL DE AMINOÁCIDOS: 124. PESO MOLECULAR: 13938.

| | |
|-----|---|
| 1 | ATGAATAAAGTAAAATGTTTATGTTTATTTACGGCCTTACTATGCTCTCTCATGTGCACAC |
| 1 | M N R V K C I V L F T A L L S S L C A R |
| 61 | GGAGCTCCOCCAGTCTATTACAGAACTATGTTGGGATATGCCAAGCACAAATATATAGC |
| 21 | G A P Q S I T E L C S E Y R N T Q I Y F |
| 121 | ATGAATGACAGTACTATCATATACGGATGATGCGCAGCCAAAGAGAAATGTTTATC |
| 41 | I N D K I L S Y T E S M A G K R E M V I |
| 181 | ATTCATTAAAGAGCCGCCAATTCAGGTCGAAAGTCCCGCCAGTCAACATATGAC |
| 61 | I T F K S G A T F Q V E V P G S Q E I D |
| 241 | TCCCAAAAAGAACCCATTGAAAGGATGAAAGGCGCCATTAAAGATGCCATATCTGACCGAG |
| 81 | S Q K K A I E R M K D T L R I A Y L T E |
| 301 | ACCAAAATTGATAAAATATGTATGGAATATGAAACCCOCCATTCAATTCOCCCAATC |
| 101 | T R I D K L C V W H N R T P N S I A A I |
| 361 | AGTATGGAAACTAG |
| 121 | S M E N * |

Figura. 13. Secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica de los genes *eltB-like* de *Salmonella gallinarum* FVA-1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. 3. Clonación y transformación de los genes *eltAB-like* de *S. gallinarum*.

La digestión del plásmido pJV-001 portando los genes *eltAB* (1,276 pb) con *EcoRI*, liberó un fragmento de 1,383 pb que incluye a los genes *eltAB-like* y los extremos del sitio múltiple de clonación. Este fragmento cortado con *EcoRI* en la posición 796, produjo un fragmento de 886 pb y uno de 497 pb donde se encuentran localizados los genes *eltA-like* y *eltB-like*. Esta digestión del fragmento de 1,383 pb indicó que los genes *eltAB-like* fueron clonados (Fig. 14).

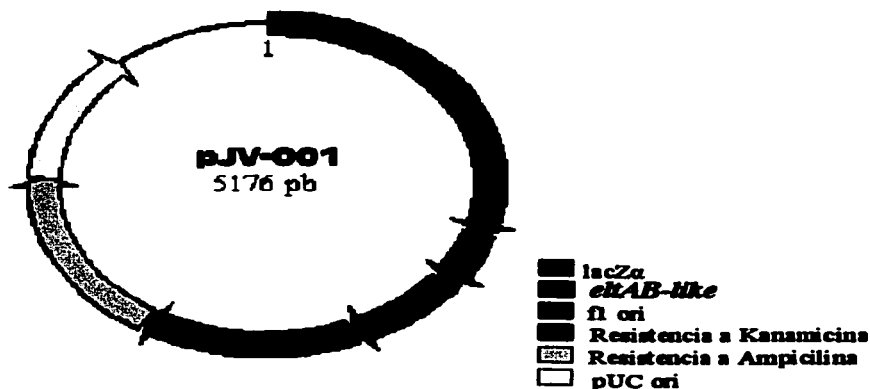


Figura 14. Esquema del plásmido pJV-001 utilizado para clonar los genes *eltAB-like* de *Salmonella gallinarum* FVA-1.

5. 4. Expresión de los genes *eltAB-like* clonados en el plásmido pJV-001.

Los productos de los genes *eltAB-like* fueron analizados por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata (Fig. 15. A), donde se observó una banda de 28 kDa y otra de aproximadamente 11 kDa, a cuales corresponden a las subunidades A y B, respectivamente, de la enterotoxina de *S. gallinarum*. Estas dos bandas fueron reconocidas con anticuerpos policlonales contra CT_{AB} y contra CT_A mediante *Western blot* (Fig. 15. B).

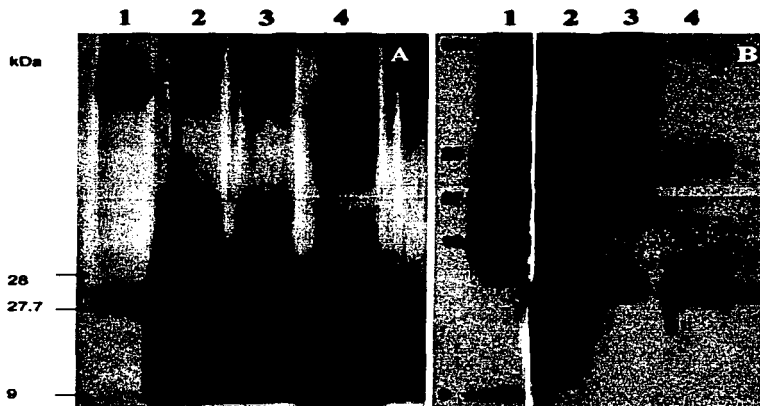


Figura 15. Electroforesis en gel de acrilamida e inmunodetección de la toxina LT-like recombinante de *S. gallinarum*. Panel A) SDS-PAGE al 12% teñido con nitrato de plata: carril 1, MPM; carril 2, toxina CTAB; carril 3, CTA; carril 4, toxina pura LT-like recombinante de *S. gallinarum*. Panel B) inmunotransferencia: carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 y 3 toxina CT-AB y CT-A, respectivamente; carril 4, toxina pura LT-like recombinante de *S. gallinarum*.

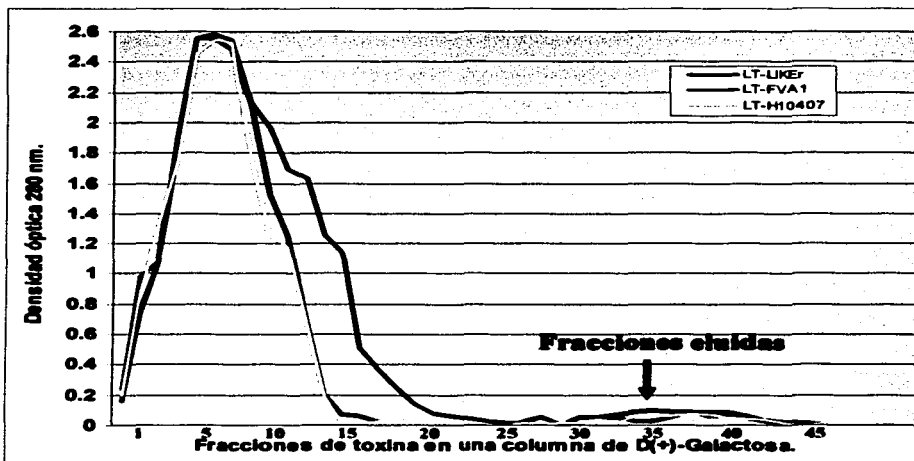
5. 5. Purificación de la toxina LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum*.

De los cuatro litros de cultivo bacteriano preparados para cada cepa, se obtuvo un promedio de 40 ml de toxina cruda LT-like recombinante de *S. gallinarum*, LT-like nativa de *S. gallinarum* y toxina LT de ETEC. La concentración de proteína cruda fue de 21.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la toxina LT-like recombinante, 23.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la toxina nativa de *S. gallinarum* y 43.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la LT de ETEC. En la columna de afinidad las fracciones fueron eluidas a partir de la fracción 25 a la 45 (Graf. 1).

La eficiencia de la columna de afinidad (D(+)-Galactosa), dio un volumen final de 1.8 ml para la toxina LT-like recombinante de *S. gallinarum*, 1.4 ml para la toxina LT-like nativa de *S. gallinarum* y 1.8 ml para la toxina LT de ETEC. La concentración de proteína purificada fue de 0.372 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la LT-like recombinante de *S. gallinarum*, 0.422 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para la toxina LT-like nativa de *S. gallinarum* y 0.778 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para LT de *E. coli* H10407 (Tabla, 2).

Tabla. 2. Producción y Purificación de la toxina recombinante LT-like de *S. gallinarum*, toxina nativa de *S. gallinarum* FVA-1 y *E. coli* H10407. Como referencia se utilizó CT de *V. cholerae* (Inaba O1).

| Bacterias | Cultivo de 18 h. (ml) | Proteína (ml) | | Concentración | |
|-----------------------------|-----------------------|---------------|------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| | | Inicial | Purificada | Cruda $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | Purificada $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| <i>E. coli</i> DH10B/pJV001 | 4000 | 40 | 1.8 | 21.2 | 0.372 |
| <i>S. gallinarum</i> FVA-1 | 4000 | 40 | 1.4 | 23.8 | 0.422 |
| <i>E. coli</i> H10407 | 4000 | 40 | 1.8 | 43.9 | 0.778 |

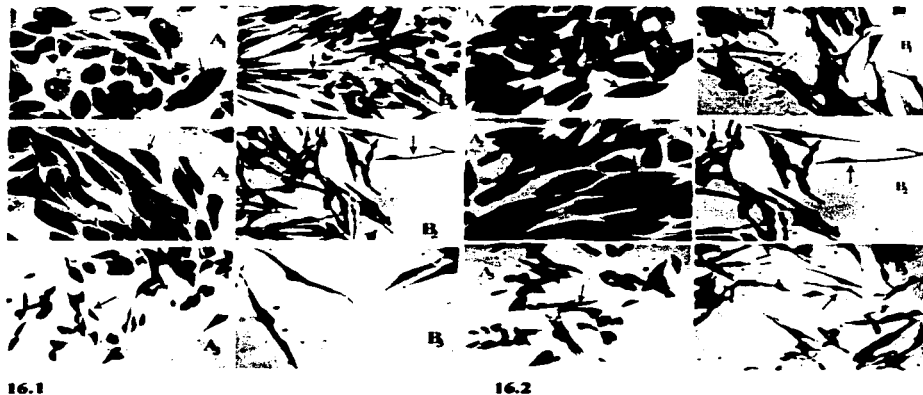


Gráfica. 1. Purificación de la toxina recombinante de *S. gallinarum*, LT-like de *S. gallinarum* y LT de ETEC, en una columna de D(+)-Galactosa.

5. 6. Actividad biológica de la toxina LT-like de *S. gallinarum* en cultivo celular.

Los cultivos de células CHO y Vero se inocularon con 5 $\mu\text{g/ml}$ de la toxina LT-like recombinante y LT-like nativa. A partir de la primera hora ambas líneas celulares sufrieron cambios morfológicos caracterizado por elongación (Fig. 16), los cuales fueron más evidentes a las 4 h con una deshidratación marcada de las células CHO y Vero a las 9 h. En la Fig. 16.1, A₂ se observan los cambios sufridos por las células CHO a las 4 h, aunque la elongación fue más evidente en las células Vero (Fig. 16.1, B₂). La elongación y deshidratación a las 9 h fue más marcada en ambas líneas celulares (Fig. 16.2, A₃ y B₃). La actividad biológica de la toxina LT-like pura recombinante, a una concentración de 500 ng mostró un efecto de elongación muy similar a las toxinas CT y LT usando las mismas concentraciones.

La actividad biológica de la toxina LT-like recombinante sobre los cultivos celulares fue inhibida, al tratar la toxina con anticuerpos policlonales contra CT, calentamiento a 75 °C por 15 min y con proteinasa K, ya que no se observó ningún cambio morfológico. Con estos ensayos se confirmó que la toxina LT-like recombinante posee una actividad biológica similar a la toxina colérica CT (Fig. 16).



16.1

16.2

Figura 16. Células CHO y Vero expuestas a la toxina LT-like recombinante de *S. gallinarum* (16.1) y LT-like de *S. gallinarum* (16.2) Panel A₂, y A₃, efecto de la toxina en células CHO a las 4 y 9 h, A₁ células CHO control, panel B₂ y B₃ efecto de la toxina en células Vero a las 4 y 9 h, B₁ células Vero control.

5.7. Actividad biológica de la toxina LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum* en asas intestinales ligadas de conejo y pollo.

La actividad biológica fue observada por acumulación de fluido a las 18 h en asas del ilion del intestino delgado de conejo y pollo, inoculadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de toxina pura recombinante, toxina LT-like nativa, toxina LT de ETEC y toxina colérica (Fig. 17. A). El volumen promedio de fluido secretado en cada una las asas ligadas de conejos y pollo fue de 45 ml para la toxina LT-like recombinante de *S. gallinarum*, 40.6 ml para LT-like nativa de *S. gallinarum*, 45 ml para la toxina LT de ETEC-H10407 y 46 ml para la toxina colérica CT (Fig. 17. B). El índice de dilatación (ID) para la toxina recombinante de *S. gallinarum* fue de 3.02 ml/cm, el ID de la toxina nativa LT-like de *S. gallinarum* fue de 2.7 ml/cm. El ID para la toxina LT de ETEC fue de 3.04 ml/cm y para CT fue de 3.06 ml/cm. Todas las asas intestinales inoculadas con las toxinas fueron positivas ya que presentaron un ID superior a 1 ml/cm y el ID del control negativo inoculado con PBS fue de 0.2 ml/cm (Tabla 3).

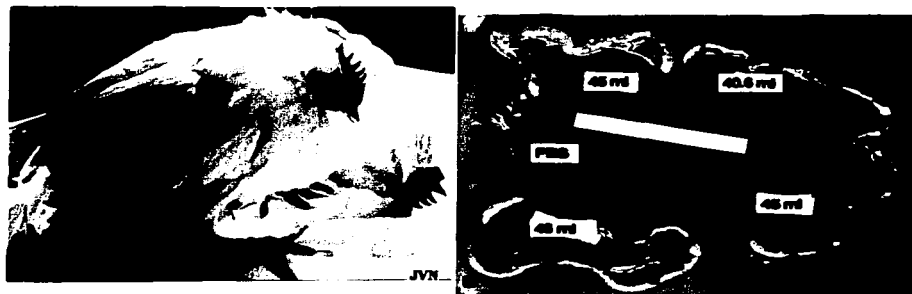


Figura 17. Actividad biológica de la toxina LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum* en asas ligadas de conejo y pollo. A) Pollos SPF, 18 h después de ser inoculados con las toxinas. B) Asas ligadas de 15 cm, con secreción de líquido: a) Toxina CT de *V. cholerae*; b) PBS; c) Toxina LT-like recombinante de *S. gallinarum*; d) Toxina LT-like nativa de *S. gallinarum* FVA-1; e) Toxina CT de ETEC H10407.

TABLA 3. Ensayos de actividad biológica de la toxina *LT-like* recombinante y nativa de *S. gallinarum* en asas ligadas de conejo y cultivo celular.

| Enterotoxina | ID en ALC (ml/cm) | UI/100µl En cultivo celular | CHO % Elongación | Vero % Elongación |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| LT-like^r (SG-FVA.1) | 3.02 ± 1 | 20 | 90 | 100 |
| LT-like (SG-FVA-1) | 2.71±1 | 20 | 90 | 100 |
| LT (ETEC-H10407) | 3.04±1 | 20 | 90 | 100 |
| CT (Inaba O1, control) | 3.06±1 | 10 | 90 | 100 |

ID= Índice de dilatación; ALC= Asas ligadas de conejo; r = Recombinante; UI= unidades internacionales.

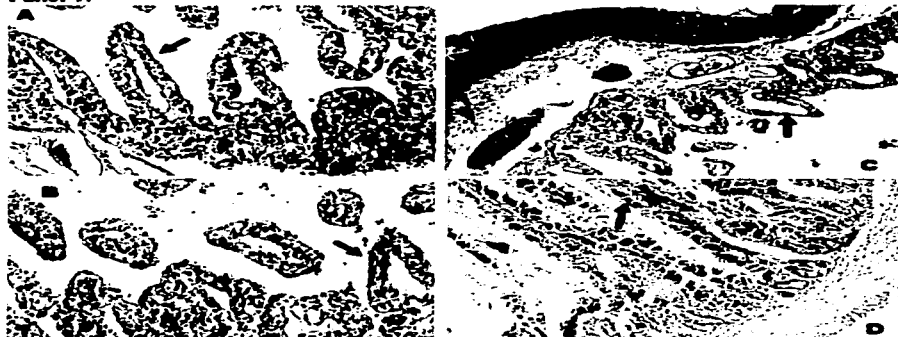
5. 8. Histopatología del intestino inoculado con la toxina *LT-like* recombinante de *S. gallinarum*.

La toxina *LT-like* recombinante provocó una inflamación en el tejido linfático de las asas ligadas de conejo y pollo, se observó un aumento en el volumen del tejido con agregados celulares de linfocitos y polimorfonucleares principalmente (Fig.18: 1 y 2). Las vellosidades de la mucosa presentaron hipersecreción acumulando gran cantidad de líquido dentro de ellas y en la luz del intestino. Sobre la submucosa se encontraron grandes cantidades de neutrófilos y eosinófilos, que ocasionaron una inflamación aguda, posiblemente por la acción de la toxina, como se observa en la Figura 18. Se encontraron los vasos linfáticos congestionados debido a la inflamación. La toxina *LT-like* recombinante de *S. gallinarum*, provocó atrofia y necrosis en las vellosidades, como consecuencia del daño en la permeabilidad de la membrana (Fig. 18.1:A y 2:A).

El daño histológico causado por las toxinas *LT-like* nativa de *S. gallinarum*, LT de ETEC y la toxina colérica CT también mostraron vellosidades atrofiadas y necrosadas (Fig. 18.1:B-C). Es interesante mencionar que las asas ligadas de pollo, tratadas con la toxina *LT-like* recombinante y nativa de *S. gallinarum*, mostraron las mismas alteraciones observadas en las asas de conejo; sin embargo, la atrofia de las vellosidades fue severa con intensa secreción celular (Fig.18.2). Las asas utilizadas como control

negativo no presentaron daño, sólo se observó un ligero cambio autolítico con infiltrado de células mononucleares y el tejido glandular se encontró normal sin cambios (Fig. 18.1:D y 2:D).

Panel 1.



Panel 2.

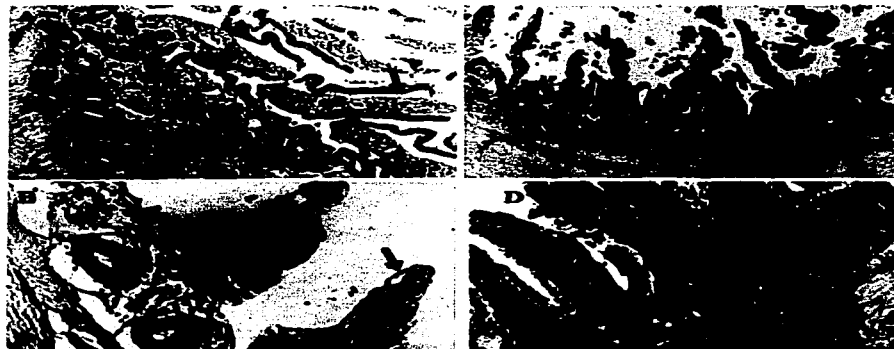


Figura. 18. Cortes histopatológicos de asas de intestino inoculadas con toxinas purificadas. Panel 1: Vellosidades de conejo y panel 2: Vellosidades de pollo. A) Toxina LT-like recombinante de *S. gallinarum*; B) Toxina LT-like nativa de *S. gallinarum*; C) Toxina CT, Control positivo y D) PBS, control negativo.

6. DISCUSIÓN.

Salmonella gallinarum produce algunos productos extracelulares que pueden estar implicados en la patogénesis de la TA.²

Trabajos previos en *S. gallinarum* y *S. pullorum* han reportado la importancia de un plásmido de 85 kb en la virulencia de estas bacterias.^{87,88} En el presente trabajo 7 de las 11 cepas de *S. gallinarum* aisladas de casos clínicos, así como las cepas 9184-ATCC de *S. gallinarum* y 10398-ATCC de *S. pullorum*, presentaron un megaplásmido de aproximadamente 85 kb. Este megaplásmido probablemente está involucrado en el fenómeno diarreico ya que las cepas fueron aisladas de aves infectadas en granjas avícolas. El fragmento de 1,275 pb amplificado a partir de DNA de plásmido de cepas de *S. gallinarum* y *S. pullorum* puede estar asociado a su virulencia. En estudios previos por nuestro grupo, se reportó en *S. gallinarum* la amplificación de un fragmento de 479 pb a partir de DNA genómico, utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen *eltA* que reportó Spicer y Noble.⁸⁹ La secuencia de este fragmento presentó una identidad del 95% con el gen *eltA* que codifica para la subunidad LT-A de ETEC y 83% con el gen *ctxA*. Este último hibridó con DNA genómico de diferentes cepas de *S. gallinarum*.³³

Con base en lo anterior, nosotros amplificamos un fragmento de 1,275 pb el cual codifica una toxina similar a LT a partir del DNA genómico y plásmido, utilizando iniciadores diseñados a partir de la secuencia de los genes que codifican para la toxina LT de ETEC.⁷⁴ En este trabajo los genes que codifican para la toxina LT-like, se encontraron en cromosoma y en plásmido de varias cepas de *S. gallinarum*. Es probable que exista una copia de los genes *eltAB-like* integrada, al cromosoma y en plásmido como sucede en algunas cepas de ETEC, ya que los plásmidos, son elementos genéticos se pueden transferir entre bacterias a través de conjugación.³⁷ El fragmento amplificado de 1,275 pb (Fig. 9) mostró una similitud del 98% con los genes *eltAB* de *E. coli* enterotoxigénica (H10407) y 79% con los genes *ctxAB* de *V. cholerae* (Fig. 12). La alta identidad entre los genes *eltAB-like* de *S. gallinarum* y los genes *eltAB* de ETEC, indica que estos genes han sido transferidos de manera horizontal a más especies y se encuentran muy conservados.

Estos genes también se han encontrado en el genoma de otras *E. coli*.⁵⁴ La secuencia nucleotídica de los genes *eltAB-like* de *S. gallinarum* demostró que están contiguos, como se ha descrito para los genes que codifican para la toxina CT³⁶ y LT de ETEC.⁵⁴

La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica presentó una similitud del 93% y 95% para las subunidades A y B₂ de la toxina LT de ETEC (NCBI, gbs60731) respectivamente, mientras que para las subunidades A y B₂ de la toxina CT de *V. cholerae* fue de 75% y 79%, respectivamente (NCBI, emb.X58785) (Fig. 13). Estos datos indican que los genes *eltAB-like* de *S. gallinarum* codifican para una variante de la toxina LT. La toxina LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum* presentaron una actividad biológica similar a la toxina LT de ETEC y CT de *V. cholerae* en cultivos celulares (Fig. 16) y en asas ligadas de conejo y pollo (Fig. 17). Es interesante mencionar que esta es la primera vez, que se utiliza el modelo de asas ligadas en pollos, para evaluar la actividad biológica de una toxina y el resultado fue similar al de asas ligadas de conejo (Fig. 17. A). En un trabajo previo, Urquiza ³² observo actividad biológica en células CHO, utilizando el sobrenadante de cultivo y lisado de *S. gallinarum*, pero el efecto fue menor al observado por nosotros, probablemente debido a que la toxina estaba más diluida.

Por otro lado, en este trabajo los genes *eltAB-like* fueron amplificados a partir de plásmidos purificados y DNA genómico de *S. gallinarum*, es importante mencionar que los genes que codifican para la toxina LT-II en algunas cepas de *E. coli* enterotoxigénicas se han localizado en ambos DNAs y los genes que codifican para la toxina LT-I en ETEC se localizan en un megaplásmido, mientras que en *V. cholerae* los genes se encuentran en el genoma del bacteriófago filamentoso CTXΦ integrado cromosoma, el cual usa como receptor la toxina co reguladora del pili (TCP).^{36,50,52}

La toxina LT-like de *S. gallinarum* consta de dos polipéptidos, las subunidades A y B₂, las cuales fueron analizadas mediante geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) teñidos con nitrato de plata e inmunodetección (Fig. 15). En resumen, las toxinas LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum* presentaron características fisicoquímicas y biológicas similares a la toxina CT de *V. cholerae*, ya que fueron inactivadas por proteinasa K, anticuerpos contra CT y calentamiento a 56°C. Los cambios morfológicos en las células CHO y Vero en presencia de las toxinas fueron similares a los descritos por Carol y col.,⁹⁰ además la toxina LT-like aglutinó los glóbulos rojos de conejo de manera similar a LT.⁷⁷ En ensayos de inmunodetección, la proteína recombinante LT-like de *S. gallinarum* purificada fue reconocida por anticuerpos anti-CT.^{91,92} Por otro lado, en ensayos de hemoaglutinación utilizando diluciones dobles seriadas, tanto la toxina recombinante LT-like de *S. gallinarum* y la toxina nativa de *S. gallinarum*, hemoaglutinaron eritrocitos de conejo de manera similar a otras toxinas.⁷⁷

Las toxinas CT y LT se localizan en diferentes regiones de la bacteria, por ejemplo, en *E. coli* enterotoxigénica la toxina LT se encontró entre el 80 y 88% en el espacio periplásmico, mientras que existe entre un 9 y 18% en la membrana citoplasmática y tan solo entre un 0.2 al 0.4% en el medio externo. Por otro lado, la síntesis de LT en *E. coli* silvestre es pobre, comparado con la cepa C-600 de *E. coli* transformada con el plásmido pEWD-299.⁹³ Esto puede explicar la dificultad para observar la presencia de estas toxinas en el sobrenadante de los cultivos; sin embargo, el efecto de estas pequeñas cantidades de toxina purificada pueden observarse en cultivos celulares. El índice de dilatación por centímetro de intestino en conejos y pollos, causado por las toxinas LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum* fue muy similar al producido por las toxinas LT y CT (Tabla 3).

Los resultados obtenidos en este trabajo, donde se evaluó la actividad de la toxina LT-like y nativa en cultivos celulares, así como la secreción de líquido en asas ligadas de conejo y pollo, sugieren que esta toxina juega un papel importante en la diarrea de aves infectadas con *S. gallinarum*. En este sentido, nosotros observamos manifestaciones clásicas de TA en los pollos, 18 h posinoculación de las asas intestinales con las toxinas LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum*. Las aves presentaron tristeza, malestar general y diarrea de color blanco-verdosa (Fig. 17.A), como se describe la enfermedad en la literatura.²

Por todo lo anterior, podemos proponer que las toxinas LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum* descritas por nosotros, así como la probable participación de otras toxinas de la familia LT o ST (termo estables), juegan un papel importante en la virulencia de esta bacteria y podrían participar en el proceso de invasión y colonización de las células epiteliales y posteriormente diferentes órganos, ya que producen una intensa inflamación en el tejido epitelial (Fig.18. A y B). En este sentido, se han realizado ensayos en asas ligadas de pollo, como un modelo de invasión de *S. enteritidis*.^{18,94,95,96} Se debe considerar que, a pesar de la gran homología existente entre la toxina LT-like de *S. gallinarum* con la toxina LT de ETEC y CT de *V. cholerae*, es importante la valoración en el modelo especie-específico, ya que los cambios en la secuencia podrían tener un efecto en la inducción de la respuesta inmune respectiva.

La amplificación de los genes *eltAB-like* en cromosoma y plásmido de *S. gallinarum*, podría sugerir que se encuentra una copia en ambos DNAs y que dichos genes, pudieron ser adquiridos por transferencia horizontal. Sin embargo, hacen falta más trabajos de investigación para corroborar su localización.

Por otro lado, se sabe que ciertas moléculas potencialmente inmunogénicas generan una intensa respuesta al ser aplicadas por vía parenteral, esto se ha investigado ampliamente para las enterotoxinas producidas por *V. cholerae* y *E. coli*. En varios trabajos se usaron las toxinas LT o LTB como adyuvante de la ureasa de *Helicobacter pylori*, observándose que la mezcla de ambas toxinas incrementa los niveles de IgG en suero contra la ureasa, cuando son administradas por vía oral.⁶⁶ También se ha observado que el uso de CT y LT-1^a como adyuvante produce niveles altos de IgG específicos contra antígenos que tienen una pobre respuesta inmunogénica.⁶⁶ En la actualidad existen metodologías enfocadas a producir proteínas recombinantes en grandes cantidades donde las toxinas CT y LT no son la excepción. Estas enterotoxinas pueden ser una herramienta importante en el diagnóstico serológico y molecular, así como agentes inmunoestimulantes, en futuras vacunas que prevengan una gran variedad de enfermedades en animales de interés pecuario y como modelo para el humano.

El estudio de factores de virulencia permite plantear el desarrollo de nuevas cepas, con el objetivo de utilizarlas como protección contra infecciones bacterianas de manera más eficiente, o que algunos de los genes caracterizados en este trabajo, pueden ser utilizados para el desarrollo de moléculas acarreadoras, debido a que la toxina puede ser reconocida por receptores y permite liberar intracelularmente dichas moléculas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permite abordar, desde otro punto de vista, algunos de los mecanismos que inducen el desarrollo del síndrome diarreico en las aves infectadas por *S. gallinarum*. Este trabajo ha generado varias interrogantes, las cuales sería conveniente esclarecer con la finalidad de comprender la patogénesis de la tifoidea aviar.

Desde el punto de vista epidemiológico, es importante detectar la presencia de enteroplásmidos en *S. gallinarum* y otras salmonelas aisladas de casos clínicos, con la finalidad de corroborar la presencia de los genes *eltAB-like*. En este sentido, es conveniente definir la localización de ambos genes en el cromosoma o plásmido, dado que pueden jugar un papel importante en la virulencia.

En el aspecto molecular, es conveniente continuar con los trabajos enfocados a definir el mecanismo por el cual esta toxina *LT-like* de *S. gallinarum* es regulada y secretada al espacio extracelular. En este mismo sentido, sería conveniente analizar por cristalografía la estructura de la toxina *LT-like* con la finalidad de que la caracterización sirva de apoyo a futuros trabajos. Por otro lado, sería conveniente estudiar los receptores que son reconocidos por la toxina *LT-like* de *S. gallinarum*, ya que por la alta

homología con las toxinas LT de ETEC y CT de *V. cholerae*, consideramos que pudiera reconocer al gangliósido GM₁. Sin embargo hacen falta otros trabajos que lo corroboren. Desde el punto de vista inmunológico, la toxina LT-like fue reconocida por anticuerpos contra la toxina CT de *V. cholerae*. Por tal motivo, sería conveniente evaluar las propiedades inmunológicas de esta toxina LT-like en un modelo animal, con la finalidad de utilizarla en futuros trabajos. Esta toxina LT-like pudiera tener propiedades de superantígeno como sucede con las toxinas CT y LT, las cuales funcionan como inmunógeno y adyuvante incrementando la respuesta inmunológica de compuestos proteicos con pobre respuesta. Por lo tanto, si la toxina LT-like de *S. gallinarum* tiene dichas propiedades, sería una herramienta muy importante para el diagnóstico y prevención de la tifoidea aviar y otras paratifoideas que afectan aves y humanos.

7. CONCLUSIONES.

1. Se aislaron y caracterizaron los genes *eltA* y *eltB* en *Salmonella gallinarum*, los cuales codifican para una enterotoxina LT-like. Estos fueron amplificados por PCR a partir del DNA genómico y megaplásmidos.
2. El gen *eltA-like* tiene un tamaño de 795 pb y *eltB-like* de 372 pb, están contiguos y tiene un tamaño de 1, 275 pb.
3. El alineamiento de la secuencia nucleotídica de los genes *eltAB-like* mostró una identidad del 98% con los genes *eltAB* que codifican para la toxina LT de ETEC y un 79% con los genes *ctxAB* que codifican para la toxina CT de *V. cholerae*.
4. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica de los genes *eltAB-like*, mostró una identidad del 93% para LTA y 95% para LTB de ETEC. Con respecto a la toxina CT de *V. cholerae*, la identidad fue de 75% para CTA y 79% para CTB.
5. El peso molecular de las subunidades LT-A like y LT-B like de las toxinas recombinante y nativa de *S. gallinarum* fue aproximadamente de 28 kDa y 11 kDa, respectivamente.
6. Se encontró que la toxina LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum*, posee características fisicoquímicas similares a la toxina CT, ya que fue termolábil a 56 °C por 15 min, se inactivó con proteinasa K, fue neutralizada con anticuerpos policlonales contra la toxina CT y hemoaglutinó eritrocitos de conejo.
7. La actividad biológica en cultivos celulares de la toxina purificada LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum*, provocó cambios morfológicos a las 9 h caracterizados por elongación en células CHO y células Vero.
8. La toxina purificada inoculada en asas ligadas iliacas de conejo y pollo, provocaron una hipersecreción y el índice de dilatación fue de 3 ml en promedio y a las 18 h posinoculación.
9. Las vellosidades de las asas iliacas de conejo y pollo inoculadas con la toxina LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum*, presentaron una intensa actividad secretora, similar a la presentada por la toxina CT de *V. cholerae* y LT de ETEC.
10. Los pollos inoculados con la toxina LT-like recombinante y nativa de *S. gallinarum*, presentaron signos clásicos de la diarrea aviar caracterizados por tristeza y diarrea de color blanco-verdosa, como sucede en aves que padecen de forma natural la tifoidea aviar (Fig. 17).

8. REFERENCIAS.

1. Unión Nacional de Avicultores. Compendio de indicadores económicos del sector avícola. UNA. México, D. F. 2002:3-46.
2. Pomeroy BS, Nagaraja KV. Fowl typhoid. In Diseases of Poultry, 9th edn., Edited by . Hofstad MS, Barries HJ, Calnek BW, Reid WM., Yoder HW. Ames: Iowa State University Press. 1991:79-91.
3. Rizo QN. Como está integrada la avicultura nacional. VII Curso sobre control y erradicación de la tifoidea aviar. Monterrey, N. L. México, 1987:2-12.
4. SAGARPA. Campañas Zoonositarias, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. México (DF). 2003.
5. SAGARPA-SINVE. Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiologica, Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Dirección General de Salud Animal. México (DF). 2002.
6. SAGARPA. Diario Oficial de la Federación, México (DF) 17 de Mayo del 2002.
7. USDA, Foreign Agriculture Service. Mexican territory declared free of *Salmonella pullorum*. GAIN Report. #MX2079, (USA)2002.
8. Sistema Nacional de Epidemiología, Vigilancia Epidemiologica Semana 50. Secretaria de Salud. México (DF) 2002.
9. Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilera PP. González AMC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Publica de México 2002;42:490-495.
10. Mancera MA, Vázquez NJ, Heneidi ZA. Situación actual de la *Salmonella enteritidis*, su distribución y posible origen. Proceedings of the forty-fifth western poultry disease conference, Cancún México. 1996:245-246.
11. SARH, Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO 1993. Campaña nacional contra la salmonelosis aviar. Diario Oficial de la Federación, México D. F., septiembre 1994.
12. Clarke RC, Gyles CL. *Salmonella*. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Edited by Carlton L. Gyles and Charles O. Thoen. 2th ed. Iowa State University Press, Ames. 1993:134-153.
13. Pomeroy BS, Nagaraja KV. Fowl Typhoid. Diseases of poultry. Ed. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, and Yoder HW. American Association of Avian Pathologists. Iowa State University Press, Ames. 1991:100-114.

14. Holt P, Chaural LH. Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. J. Clin. Microbiol. . 1997;35:1016-1020.
15. Office International des Epizooties. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. Organisation mondiale de la santé animale, World organization for animal health, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2001:1-13.
16. Tucker JF. Survival of salmonellae in built-up litter for housing of rearing and laying fowls. Br. Vet. J. 1967;123:92-103.
17. Clements M, Eriksson S, Tezcan-Merdol D, Hinton JCD. Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. Ann. Med. 2001;33:178-185.
18. Chopra AK, Huang JH, Xu X-J, Burden K, Nielsel DW, Rosenbaum MW, Popov VL, Peterson JW. Role of *Salmonella* enterotoxin in overall virulence of the organism. Microbial Pathogenesis. 1999;27:155-171.
19. Gianella JA. Importance of the intestinal inflammatory reaction in *Salmonella* mediated intestinal secretion. Infect Immun 1979;23:140-145.
20. Abigail AS, Dixie DW. *Vibrio cholerae* the cause of cholera and *Salmonella* Species. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach.2nd ed. ASM Press. Washington (DC). 2002.
21. Libby SJ, Adams LG, Ficht TA, Allen C, Whitford HA, Buchmeir A, Bossie A, Guiney DG. The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and system infection in the natural host. Infect. Immun. 1997;65:1786-1792. 37.
22. Darwin KH, Miller VL. Molecular basic of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin. Microbiol. Rev.1999;12:405-428.
23. Tthanassi GD, Hultgre SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Current Opinion in Cell Biology. 2000;12:420-430.
24. Winstanley C, Hart A. Type III secretion systems and pathogenicity islands. J. Med. Microbiol. 2001;50:116-126.
25. Meccas J, Strauss RJ. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence: Type III Secretion and Pathogenicity Islands. Emerg. Infect. Dis. 1996;24:270-288.
26. Galán JE, *Salmonella* interactions with Host Cell:Type III Secretion at Work. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2001;17:53-86.
27. Groisman EA, Blanc-Potard AB, Uchiya K. Pathogenicity islands and the evolution of *Salmonella* virulence. Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. Edited by Kaper and Hacker. AMS, Washington, D. C. 1999:127-150.

28. Kubori T, Galán JE. *Salmonella* type III secretion-associated protein InvE controls translocation of effector proteins host cell. *J. Bacteriol.* 2002;184:4699-4708.
29. Donnenberg MS. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature.* 2000;406:768-774.
30. Barrow PA, Lovell MA. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* and *S. typhimurium*. *Infect. Immun.* 1989;57: 3136-3141.
31. Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow P. A. *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infect. Immun.* 2001;69:5471-5476.
32. Urquiza BO. Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum*. Tesis de Maestría. FMVZ-UNAM. México (DF) 1995.
33. Balcázar QJ. Determinación de la existencia de un gen para una enterotoxina LT-like en *S. gallinarum*. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. México (DF) 1993.
34. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbil. Rev.* 1998;11:142-201.
35. Hofstra H, Witholt B. Heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli* kinetics of association of subunits into periplasmic holotoxin. *J. Biol. Chemistry.* 1985;260:16037-16044.
36. Kaper JB, Fasano A, Trucksis M. Toxins of *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* and cholera, molecular to global perspectives. ASM,PRESS. 1994:145-176.
37. Alison D. OB, Holmes K R. Protein Toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. *E. coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology. Editor Frederick C. Neidhardt, 2th ed. Vol. 2. ASM. 1996: 2788- 2802.
38. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 1992;56:622-647.
39. Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, vanZanten BA, Berghuis AM, Hol. GJ. Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography. *Nature London*, 1992;351:371-377.
40. Horstman AL, Kuehn MJ. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J. Biological Chemistry.* 2002;277: 32538-32545.

41. Hirst TR, Holmgren J. Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987;84:7418-7422.
42. Russel M. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein. J. Mol. Biol. 1998;279:485-499.
43. Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis. Infection and immunity. 2001;69:3523-3535.
44. Marsh JW, Taylor RK. Identification of the *Vibrio cholerae* type 4 prepilin peptidase required for cholera toxin secretion and pilus formation. Mol. Microbiol. 1998;29:1481-1492.
45. Tauschek M, Gorrel JR, Strugnell AR, Robins BRM. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. Microbiology. 2002;99:7066-7071.
46. Connell TD, Metzger DJ, Wang M, Jobling MG, Holmes RK. Initial studies of the structural signal for extracellular transport of cholera toxin and other proteins recognized by *Vibrio cholerae*. 1995;63:4091-4098.
47. Rappuoli R, Pizza M. Bacterial toxins. Cellular Microbiology. Editors Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. ASM PRESS. Washington, D. C. 200: 193-220.
48. Mekalanos JJ, DiRita VJ. Signal transduction in the control of cholera toxin expression. Microbial Toxins and Diarrhoeal disease. *Ciba Foundation*. Pitman London 1985:117-137.
49. Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M, Imaoka K, Fujihashi K, Van Ginkel FW, Noda M, Takeda Y, McGhee JR. A nontoxic mutant of cholera toxin elicits TH2-type responses for enhanced mucosal immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997;94:5267-5272.
50. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic Conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996;272:1910-1914.
51. Faruque SM, Asadulghani, Manujendra NS, Abdul Alim ARM, Albert MJ, Nasirul Islam KM, Mekalanos JJ. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTXΦ: Molecular basis for origination of new strains with epidemic potential. Infect. Immun. 1998;66:5819-5825
52. Faruque SM, Asadulghani, Kamruzzaman M, Nandi RK, Ghosh AN, Nair GB, Mekalanos JJ, Sack DA. RS1 Element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as

- a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTX ϕ . *Infect. Immun.* 2002; 70:163-170.
53. Murphy GL, Dallas WS. Analysis of two genes encoding heat-labile toxins and located on a single ent plasmid from *Escherichia coli*. *Gen* 1991;103:37-43.
54. Inoue T, Tsuji T, Koto M, Imamura S, Miyama A. Amino acid sequence of heat-labile enterotoxin from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to that of human strain H10407. *FEMS Microbiol Lett.* 1993;108:157-161.
55. Schlor S, Riedl S, Blab J, Reidl J. Genetic rearrangements of the regions adjacent to genes encoding Heat-Labile enterotoxins (*eltAB*) of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;60:352-358.
56. Mekalanos JJ, Swartz DJ, Pearson GD, Harford N, Groyne F, Wilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature.* 1983;306:551-557.
57. Miller VL, Mekalanos JJ. Genetic analysis of the cholerae toxin-positive regulatory gene *toxR*. *J. Bacteriol.* 1985;163:580-585.
58. Miller VL, Taylor RK. Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell. Press.* 1987;48:271-279.
59. Ottemann KM, Mekalanos JJ. Regulation of cholera toxin expression. *Vibrio cholerae* and cholera: Molecular to global perspectives. ASM, Washington, D.C. 1994:177-185.
60. Evans DJ, Richardson SH. In vitro production of cholera toxin and vascular permeability factor by *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1968;96:126-130.
61. Yvette MM, Patricia AC, Karen S, Ronald KT, Stephen BC. Differential transcription of the *tcpPH* operon confers biotype-specific control of the *Vibrio cholerae* ToxR virulence regulon. *Infect. Immun.* 1999;67:5117-5123.
62. Masaaki W, Yamamoto K. New Medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype el Tor. *J. Clin. Microbiol.* 1985;22:405-408.
63. Mahan M, Schlauch JM, Mekalanos. Environmental regulation of virulence gene expression in *Escherichia*, *Salmonella* and *Shigella* spp., *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology, 2nd ed., vol. 2b ASM Press. Washington, D. C. 1996:2803-2816.
64. Merritt E, Verlinde CH, Fan E, Hol W. AB5 bacterial toxin project. <http://www.bmsc.washington.edu/projects/toxins.html>. 1999.

65. Wimer MS, Holmes RK, Wolf AA., Lencer WI, Jobling MG. Characterization of receptor-mediated signal transduction by *Escherichia coli* type IIa Heat-Labile enterotoxin in the polarized human intestinal cell line T84. 2001;69:7205-7212.
66. Weltzin R, Guy B, William DT, Giannasca P. J., and Monath T. P.. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* Heat-Labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. Infect. Immun. 2000;68:2775-2782.
67. Martin M, Metzger DJ, Michalek SM, Connell TD, Russell MW. Distinct cytokine regulation by cholera toxin and type II heat.labile toxins involves differential regulation of CD40 ligand on CD4⁺ T cell. Infect. Immun.2001;69:4486-4492.
68. Martin M, Hajishengallis G, Metzger DJ, Michalek SM, Connell TD, Russell MW. Recombinant antigen-enterotoxin A2/B chimeric mucosal immunogenes differentially enhance antibody responses and B7-dependent costimulation of CD4⁺ T cells. Infect. Immun. 2001;69:252-261.
69. Vázquez NJ, Suárez F, Quintana JA, Puente JL, Calva E, Verdugo RA. Proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum*: Variabilidad electroforética y potencial en diagnóstico. ANECA. 1993:342-347.
70. Vázquez NJ. Preparación de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la tifoidea aviar. Tesis de Maestría, FMVZ-UNAM. México, (DF) 1995.
71. Ruíz CM. La brucelosis es un problema universal. La prensa Medica de México. México (DF). 1954:17-26.
72. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY). 1989.
73. Freerick MA, Roger B, Robert EK, David DM, Seidman AS, Kevin S. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. (USA). 1994-96.
74. Takashi I, Takao T, Michio K, Imamura S, Akio M. Amino acid sequence of heat-labile enterotoxin from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to that of human strain H10407 FEMSLE. 1993;108:157-162.
75. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977;74:5463-5467.
76. Clements, Finkelstein. Isolation and characterization of homogenous heat-labile enterotoxins whit higt specific activity from *Escherichia coli* cultures. Infect. Immun. 1979;24:760-9.

77. Kamini W, Sujata G, Harminder S, Nair GB, Amit G, Girish S, Harpreet V, Nirmal KG. Purification and characterization of novel toxin produced by *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.* 1999;67:5215-5222.
78. Yoshihiko U, Yoko O, Zaw L, Shinji Y, Junichi Y, Hisao K, Yoshifumi T. Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and Cholera toxin using immobilized. *Microb. Pathogenesis.* 1994;16:71-76.
79. Bradford MA. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein- utilizing the principle of protein-dye binding. 1976.
80. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970;227:680-685.
81. Towbin HA, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1979;76:4350-4354.
- 82 Morgan SJ, Darling DC. Cultivo de células animales. Ed. ACRIBIA, Zaragoza, España. 1995.
83. Pablo AV, John J, Mathewson HL. Dupont, Linda G, Myron M. L. Comparison of two assay methods for patterns of adherence to Hep-2 cells of *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *J. of Clinical. Microb.* 1990;28:882-885.
84. Honda T, RA. Finkelstein. Purification and characterization of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype el Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. *Infect. Immun.* 1979;26:1020-1027.
85. Doyle J, Evans JR, Evans GD, Gorbach SL. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* 1973;8:725-730.
86. Koupal LR, Deibel RH. Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.* 1974 ;11:14-22
87. Barrow PA. Immunity to Experimental fowl typhoid in Chickens Induced by a Virulence Plasmid-Crude Derivative of *Salmonella gallinarum*. *Infect. Immun.* 1990; 58:2283-2288.
88. Christensen JP, Olsen JE, Hansen HC, Bisgaard M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* biovars *gallinarum* and *pullorum* by plasmid profiling and biochemical analysis. *Avian Pathog.* 1992;21:461-470.
89. Spicer EK, Noble JA. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin nucleotide sequence of the a subunit gen. *J. Biological Chemistry.* 1983;257:5716-5721.

90. Sarah V. Dodson JJ, Maurer PS, Holt, Margie DL. Temporal changes in the population genetics of *Salmonella pullorum*. *Avian Disease*. 1999;43:685-695.
91. Carol L. Pickett EM, Twiddy B, Wolfanger B, Randall KH. Cloning of that encode a new heat-labil enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. of Bacteriol*. 1986;165:348-352.
92. Finkelstein RA, Burks MF, Zupan A, Dallas W. Antigenic determinants of the Cholera /Coli family of enterotoxins. *Rev. of. Infec. Diseases*. 1987;9: S490-S502
93. Prasad R, Chopra AK, Peterson JW, Pericas P, Houston CW. Biological and immunological caracteization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *J.M. Pathogenesis*. 1990;9:315-329.
94. Hofstra H, Donerr F, Kingama J, Witholt B. *Escherichia coli* enterotoxin and its relationship to the cell envelop. *Bacterial Protein Toxins*. Academic press, London. 1984;89-98.
95. Chary P, Prasad R, Chopra AK, Peterson JW. Location of the enterotoxin gen from *Salmonella thyphimurium* and Characterization of gen products. *FEMS Microbiology Letters*. 1993;111:87-92.
96. S-Aabo JP, Christensen. MS. Chadfield B, Carstensen TK, Jensen. MB, Olsen JL. Development of an in vivo model for study of intestinal invasion by *Salmonella enterica* in Chickens. *Infect. Immun*. 2000; 68:7122-7125.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTEC