



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

COMPARACION ENTRE LA VIRULENCIA DE UNA  
MUTANTE EN LA FORMACION DE FAGOSOMAS  
GIGANTES DE *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium  
Y LA CEPA SILVESTRE EN EL MODELO DE FIEBRE  
TIFOIDEA MURINA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
ATZIRI CORONA ROMERO



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m. 346268



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.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios  
Vocal: QFB. Norma Angélica Castellanos Chávez  
Secretario: Dra. Celia Mercedes Alpuche Aranda  
1er suplente: Profra. Norma Trejo Medina  
2° suplente: Profra. María del Carmen Urzua Hernández

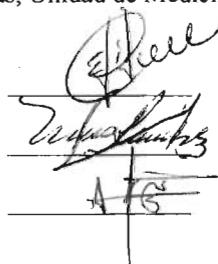
Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología Clínicas, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM.

Asesor: Dra. Celia Mercedes Alpuche Aranda

Supervisor Técnico: M en C. María de la Luz Ramírez Aguilar

Sustentante: Atziri Corona Romero



The image shows three horizontal lines with handwritten signatures and initials written over them. The top signature is cursive and appears to be 'C. Alpuche'. The middle signature is also cursive and appears to be 'M. de la Luz Ramírez'. The bottom signature consists of the initials 'A.C.R.' written in a stylized, blocky font.

*A mis padres...  
... a Nirani...  
... a Irving*

*¡Con todo mi cariño y agradecimiento!*

## Agradecimientos

---

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres por darme la vida y por todo el amor que siempre me han tenido, por enseñarme a luchar honestamente por lo que deseo hasta conseguirlo, quiero expresarles cuanto los quiero y decirles que gracias a ellos soy quien soy en estos momentos y que gracias a ellos he conseguido todo lo que tengo, incluyendo este sueño. Son un gran ejemplo a seguir en mi vida. Quiero que sientan cada triunfo mío como si fuese suyo, este triunfo es de ustedes, ¡los quiero mucho!.

Gracias Nirani por todo tu apoyo en mi vida, siempre has estado ahí para ayudarme cuando lo he necesitado y tú bien sabes que si tengo que compartir este triunfo con alguna persona esa eres tu, mil gracias por todo hermana, ¡te quiero mucho!.

Irving, gracias por todo tu amor y toda tu comprensión en los momentos difíciles durante mi carrera, gracias por aguantarme y por aconsejarme cuando lo necesité, gracias por ayudarme y apoyarme para realizar este sueño, bien sabes que si tuviera que compartir el crédito de este trabajo con alguien también estarías tú junto con Nirani. ¡Te amo!

Quiero agradecer a la familia Mejía Romero por todo su cariño y por ser siempre un apoyo durante mi carrera y durante mi vida, ¡los quiero mucho!.

Mauricio, gracias por tener siempre palabras de aliento y un motivo por el cual estar contento, gracias por tu apoyo y por escucharme cuando realmente lo necesitaba, no cabe duda de que las personas llegan a tu vida en el momento preciso, ¡gracias!.

Quiero agradecer a la Dra. Celia Alpuche por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio a su cargo.

Mary, muchas gracias por todo el tiempo que me dedicaste, por compartir conmigo tus valiosos conocimientos, por tus palabras de aliento en los momentos apropiados, bien sabes que sin tu ayuda este trabajo jamás se hubiera llevado a cabo. Te agradezco de manera infinita me hayas permitido encontrar en ti, además de una maestra, a una valiosa amiga, ¡muchas gracias!

Quiero agradecer de una manera muy especial al Biólogo Francisco Martínez E., por su colaboración en la realización de este trabajo. Francisco, sólo tú sabes todo lo que me ayudaste, te agradezco infinitamente el tiempo que me dedicaste, el interés que mostraste al proyecto a pesar de que no tenías nada que ganar más que compartir conocimiento. Bien sabes que sin tu ayuda aún estaría intentando cortar y teñir tejidos sin éxito.

Edith, muchas gracias por todas tus atenciones, en verdad me ayudaste y me apoyaste mucho durante mi estancia en Centro Médico.

Gracias al Dr. Enrique Blanco por su apoyo en la parte histopatológica de este trabajo.

Comadre, sabes perfectamente mis sentimientos hacia ti, siempre fuiste un gran apoyo durante la carrera pero lo fuiste aún más durante la realización de este trabajo, muchas gracias, te quiero mucho.

Compadre, gracias por permitirme compartir contigo los años de escuela y también por ser un apoyo durante la realización de este trabajo, muchas gracias por tu amistad.

Joanna, gracias por todo tu apoyo y por tu amistad, por tener siempre una sonrisa para regalar, te quiero mucho.

Quiero agradecer a Rodolfo Pastelín y a Norma Castellanos por toda su paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo, por hacerme amar la microbiología, por permitirme formarme a su lado, gracias por ser unos excelentes profesores y por todo el apoyo que mostraron durante la realización de este proyecto.

Quiero hacer un agradecimiento especial a Rocío López, por permitirme ser su alumna y amiga, por hacerme amar la bacteriología, ¡mil gracias!

Marcia, Araceli y Margarita, gracias por su apoyo en este proyecto, agradezco el entusiasmo que mostraron y su respuesta siempre que yo acudí a ustedes para pedir ayuda, ¡gracias!

Quiero agradecer de una manera muy especial a Jorge Moreno y a María de la Luz Castillo por todo su cariño durante todos estos años, por todo su apoyo durante mi carrera y durante la realización de este trabajo, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, ¡muchísimas gracias!

Gracias a todos los K's, siempre han sido una inspiración para seguir adelante con entusiasmo y alegría, encontrando siempre un motivo por el cual reír, ¡gracias!

Quiero agradecer a todas las personas culpables de este logro, si es que omití a alguien, gracias a todos mis amigos y a todos mis profesores de la facultad.

Resumen	1
Introducción	2
Resultados Preliminares	8
Justificación	10
Hipótesis y Objetivos	11
Materiales y Métodos	12
Cepas Bacterianas y Medios de Cultivo	12
Determinación de la Dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> )	12
Colonización a Hígado y Bazo	14
Determinación del Número de Células MAC+ con Bacterias Dentro	15
Resultados	17
Discusión de Resultados	20
Conclusiones	26
Apéndice de Figuras	27
Referencias	36

LB	Luria Bertani
Kn	Kanamicina
Cam	Cloramfenicol
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
DL <sub>50</sub>	Dosis a la cual muere el 50% de la población en estudio
MPC	Macropinocitosis
FG	Fagosomas Gigantes
SPI-I.	Isla de Patogenicidad 1 de <i>Salmonella</i>
LPS	Lipopolisacárido
Tn $\phi$ hoA	Transposón con el gen de la fosfatasa alcalina
TTSS	Sistema de Secreción Tipo Tres
SPI-2	Isla de Patogenicidad 2 de <i>Salmonella</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CS	Cepa Silvestre
XP	Sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
S.S.	<i>Salmonella-Shigella</i>
PBS	Solución Reguladora de Fosfatos

El género *Salmonella* es un miembro de la familia Enterobacteriaceae, que está compuesto por bacilos Gram-negativos, en su mayoría patógenos, facultativos e intracelulares y causan enfermedades que van de gastroenteritis autolimitada hasta severas infecciones sistémicas tanto en humanos como en animales. La fiebre tifoidea o entérica es una enfermedad sistémica grave provocada en humanos por *Salmonella enterica* Serovar Typhi y en ocasiones por *S. paratyphi*, que se caracteriza por la diseminación de la bacteria desde el epitelio intestinal hasta órganos como el hígado y el bazo, siendo el principal mecanismo de entrada la inducción de macropinocitosis en enterocitos y células epiteliales del intestino delgado. *Salmonella typhimurium* causa en el ratón una enfermedad muy parecida a la fiebre tifoidea en humanos, por lo cual el modelo animal en ratones susceptibles es ampliamente usado para el estudio de esta patogenia.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar si la capacidad de producir macropinocitosis en macrófagos por *Salmonella* es importante para la producción de fiebre tifoidea murina para lo cual se determinaron las  $DL_{50}$  para la cepa mutante 1284 en comparación con la cepa silvestre. Con el fin de evaluar si la fagocitosis por macropinocitosis es importante para la invasión sistémica el análisis de  $DL_{50}$  se realizó por vía oral y por vía intraperitoneal, empleando el método descrito por Reed y Muench. Como parte complementaria a este estudio se observó la colonización a hígado y bazo de la mutante 1284 con incapacidad para inducir macropinocitosis en comparación con la cepa silvestre.

Los resultados obtenidos nos indican que la  $DL_{50}$  para la 1284 fue mayor comparada con la CS, ya que la dosis de bacterias requerida para causar el 50 % de mortalidad para la mutante es alrededor de 1000 veces mayor que en el caso de la CS, por vía oral. Por vía intraperitoneal, la  $DL_{50}$  de la 1284 fue aproximadamente 10 veces mayor que para la CS, con lo cual se puede establecer que la mutante 1284 es menos virulenta que la CS. En cuanto a la colonización a hígado y bazo se observó que la bacteria en general es detectada en estos órganos después de las 48 horas de inoculación y que la mutante con defecto en macropinocitosis se detectó en menor cantidad en estos órganos en comparación con la CS. Sin embargo, aún la mutante con defecto de ser fagocitada por macropinocitosis es capaz de colonizar hígado y bazo, aunque al parecer no lo suficiente para producir la muerte del animal en comparación con la CS. Por medio de las tinciones con inmunofluorescencia se puede observar que el macrófago al parecer no es el principal reservorio de *Salmonella* al encontrarse un bajo porcentaje de las bacterias dentro de estas células.

En conclusión se puede observar que la cepa mutante 1284 es menos virulenta que la cepa silvestre debido al aumento en la  $DL_{50}$  para la mutante por ambas vías probadas, además de que los datos de colonización corroboran ese hallazgo al encontrarse que llega una menor cantidad de bacteria a estos órganos, se replica menos en ellos y que el macrófago parece no ser el principal reservorio de *Salmonella*. Por lo que puede concluirse que la macropinocitosis y la formación de fagosomas gigantes es un mecanismo esencial para la virulencia de *Salmonella* en este modelo de infección y favorece la diseminación a órganos blanco como hígado y bazo.

### INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* es un miembro de la familia Enterobacteriaceae, está compuesto por bacilos Gram-negativos con magnitudes de 2-3µm X 0.4-0.6 µm aproximadamente. Son patógenos facultativos e intracelulares<sup>2</sup> y causan enfermedades que van desde gastroenteritis autolimitada hasta severas infecciones sistémicas tanto en humanos como en animales. El género *Salmonella* fue descrito a principios del siglo XX por el bacteriólogo estadounidense Theobald Smith, recibiendo el nombre por su jefe David Salmon. Actualmente, el género *Salmonella* consiste de una sola especie y muchos serogrupos, dicha especie ha sido denominada *Salmonella enterica*<sup>3,4</sup>. La fiebre tifoidea o entérica es una enfermedad sistémica grave provocada en humanos por *Salmonella enterica* Serovar Typhi y en ocasiones por *S. paratyphi*, se caracteriza por la diseminación de la bacteria desde el epitelio intestinal hasta órganos como el hígado, el bazo y médula ósea<sup>2,5-7</sup>

El género *Salmonella* es el agente causal de diferentes infecciones, predominantemente intestinales, conocidas como salmonelosis. La salmonelosis humana puede dividirse en dos síndromes más frecuentes:

- 1.- La fiebre entérica, que incluye la fiebre tifoidea causada por *S. typhi*, y la fiebre paratifoidea que es patológica y clínicamente similar a la tifoidea pero con síntomas menos fuertes, causada por *S. paratyphi* A, B, o C. La fiebre entérica implica una infección sistémica, debido a la invasividad de la bacteria.
- 2.- La gastroenteritis o envenenamiento por alimentos, la más común de las infecciones, es causada por muchos serotipos. Este tipo de infecciones no son acompañadas de una infección sistémica, salvo los casos en que se infecte a individuos inmunocomprometidos. Los serotipos más comunes en esta patogenia son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*.

También puede ocurrir, sobre todo para la fiebre tifoidea, que pueda establecerse la condición de portador asintomático. Por otra parte, aunque con menos frecuencia, esta bacteria puede producir infección en cualquier sitio del cuerpo humano, como es el caso de meningitis, infecciones óseas, endocarditis etc.

La fiebre tifoidea prevalece principalmente en países en vías de desarrollo<sup>8</sup>, donde normalmente significa un reto para las autoridades en salud pública. Hay aproximadamente 17 millones de casos anuales con casi 600,000 muertes, principalmente en Asia y África. Las más altas incidencias se encuentran en Indonesia y en algunos puntos del sureste asiático, como Papua Nueva Guinea, en donde puede alcanzar niveles de  $10^3$  por cada 100,000 habitantes. En México, la incidencia es cien veces menor a la de Indonesia, o sea de 10 por cada 100,000 habitantes. De hecho, de 1989 a 1993, la incidencia disminuyó a la mitad, coincidiendo con las campañas del sector salud para la prevención del cólera<sup>3</sup>. En países desarrollados como Estados Unidos está prácticamente erradicada, aunque muchos viajeros que retornan de zonas endémicas como Asia, África o América Latina provocan hasta 800 casos al año con aproximadamente 3 muertes.<sup>4</sup> A todo lo anterior puede añadirse el hecho de la aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos usados para la profilaxis de esta patogenia.<sup>9</sup>

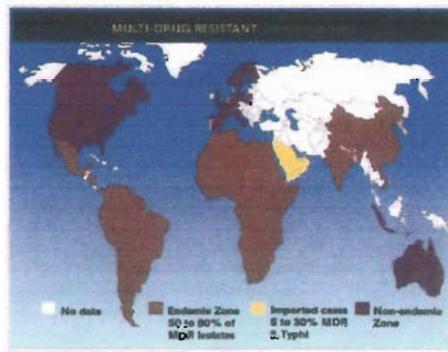


Figura 1. Zonas endémicas de fiebre tifoidea en el mundo.

**Patogénesis.** La ruta de entrada natural es por vía oral. *Salmonella* tiene que pasar por el tracto gastrointestinal atravesando barreras naturales, comenzando con la acidez del estómago y llegando después al lumen del intestino delgado, penetra en la mucosa intestinal invadiendo y destruyendo células epiteliales especializadas localizadas en las Placas de Peyer, conocidas como células M.<sup>2,7,10,11</sup> La *Salmonella* entra a estas células mediante un proceso que induce el ruffling en la membrana de la célula para posteriormente ser internalizada una vez que este ruffling se fusione para formar fagosomas<sup>12</sup>. Cuando la bacteria ha atravesado el epitelio intestinal entra en contacto con células fagocíticas (macrófagos) y es capaz de sobrevivir y replicarse dentro de estos.

Se ha observado que la interacción de macrófagos cultivados *in vitro* con *S. typhimurium* induce la formación de ruffles en la membrana, los cuales son dependientes de la polimerización de actina. Las bacterias son introducidas en vacuolas que se forman a partir de estos ruffles. El proceso mediante el cual *Salmonella* entra a la célula es conocido como macropinocitosis (MPC) que es una forma de endocitosis no mediada por receptores acompañada de un ruffling de la membrana celular<sup>13-15</sup>. Estos fagosomas son conocidos como “Fagosomas Gigantes” (FG), debido a que su tamaño es inusualmente grande (aproximadamente 2-6µm) y además porque la bacteria parece nadar libremente en ellos.

En 1982 Loeffler describió al agente causal de la tifoidea murina, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*), siendo la infección con esta bacteria, en el ratón susceptible, muy parecida a la que se presenta en el ser humano por *S. typhi*. Las lesiones internas en el ratón, así como también la distribución de la bacteria en el tejido del animal eran muy similares a las observadas en humanos, por lo cual se decidió implementar al ratón infectado con *S. typhimurium* como el modelo para el estudio de esta patogenia<sup>1,4,16,17</sup>. Los ratones infectados muestran una severa patología en el intestino, adelgazamiento de la mucosa intestinal, infiltrado de mononucleares, disminución del tamaño de las microvellosidades, etc. Se observa hiperplasia del tejido linfoide, trombosis capilar, hemorragia y ulceraciones en las Placas de Peyer<sup>16</sup>.

Es de suma importancia entender los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria pues mediante ellos tiene la capacidad para modificar su microentorno y entonces favorecer así su sobrevivencia en el hospedero. Como un patógeno intracelular, *Salmonella* posee factores de virulencia que le permiten invadir, replicarse y persistir dentro de células eucarióticas de su hospedero.<sup>17</sup> Gran parte de la maquinaria genética de *Salmonella* involucrada en la virulencia se encuentra codificada en secuencias de ADN presentes en ella, denominadas Islas de Patogenicidad (SPI). Las SPI son elementos de ADN que contienen muchos genes y pueden ser heredados por transmisión vertical.<sup>15</sup> El Sistema de Secreción Tipo Tres (TTSS) está encargado de la traslocación de proteínas bacterianas hacia el citoplasma de la célula del hospedero<sup>18</sup>, está compuesto por más de 20 proteínas y está regulado a nivel transcripcional así como post-transcripcional. Este sistema de secreción requiere del contacto directo con la célula efectora para desencadenar la traslocación de las proteínas. Se habla entonces de 2 tipos de TTSS, uno codificado en la Isla de Patogenicidad 1 (SPI-1) ubicado en el centisoma 63, y otro codificado en la Isla de Patogenicidad 2 (SPI-2) ubicado en el centisoma 31. Dentro de la Isla de Patogenicidad I (SPI-1) se encuentran codificados los genes involucrados en la invasividad de esta bacteria para células epiteliales, mientras que en la SPI-2 se encuentran codificados aquellos genes necesarios para la sobrevivencia intracelular e infección sistémica de *Salmonella*.<sup>12</sup> Consistentemente con su función, a diferentes estadios de la infección, la expresión de estos dos sistemas varía, es decir, los genes codificados en la SPI-1 son expresados por *Salmonella* en el lumen del intestino delgado, mientras que aquellos correspondientes a la SPI-2 se expresan solamente después de que ha entrado en las células del hospedero.<sup>4,12</sup> Dentro de las proteínas traslocadas por el TTSS codificado en SPI-1 tenemos a SipB, SipC y SipD, que son requeridas para la traslocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática de células eucarióticas, pero no únicamente tienen esa función, pueden llegar a tener funciones efectoras y no sólo de traslocación; tenemos otras proteínas involucradas en la invasión vía unión a actina, estas son SipA y SipC, la proteína SopB estimula la reorganización de actina del citoesqueleto, SopE y SopE2 estimulan igualmente rearrreglos de actina involucrados en la invasión a células epiteliales por esta bacteria, con

lo cual podemos decir que estas tres últimas proteínas están involucradas en el ruffling de la membrana.<sup>4,12</sup> Sabiendo que el TTSS codificado en la SPI-2 es activado después de la entrada de la bacteria a la célula y que éste además facilita su replicación en ella, es necesario saber que las proteínas traslocadas por este sistema interfieren con varios procesos celulares de tráfico endocítico, lo cual le permite a *Salmonella* evadir las estrategias de defensa de la célula del hospedero y sobrevivir dentro de ésta.<sup>19</sup>

Se ha encontrado evidencia de que cepas de *S. typhimurium* con mutaciones en genes del TTSS codificado en la SPI-1 presentan atenuación en la virulencia únicamente si son administradas por vía oral, pues al ser administradas por vía intraperitoneal son igual de virulentas que la cepa silvestre<sup>20,21</sup>, esto nos da un indicio de la importancia de este sistema en la virulencia y el progreso de la infección. De la misma manera, se han encontrado mutantes en genes del TTSS codificado en la SPI-2 que pueden invadir perfectamente, pero son deficientes en sobrevivencia y en replicación intracelular, y por lo tanto en la evolución de la patogenicidad a infección sistémica.<sup>17</sup>

La fagocitosis de microorganismos patógenos se lleva a cabo, generalmente, por un proceso denominado endocitosis mediada por receptores, el cual involucra la interacción directa de ligandos bacterianos y receptores celulares, lo que conlleva a la captación de la bacteria por parte de la membrana celular y a la posterior formación de un fagosoma. Se ha visto que los receptores de la membrana celular involucrados en este proceso pueden ser de varios tipos: receptores para Fc, receptores para moléculas del complemento, receptores para carbohidratos y moléculas celulares de adhesión.<sup>15</sup>

A diferencia de lo mencionado anteriormente, la fagocitosis de *S. typhimurium* por macrófagos se lleva a cabo de una manera poco convencional, tanto por el mecanismo de entrada como por la morfología del fagosoma formado. Posterior al contacto con la membrana de la célula hospedera la entrada de la bacteria se da por un mecanismo denominado macropinocitosis (MPC), proceso que es inducido también por factores de

crecimiento en diferentes células eucarióticas<sup>11,22</sup>. Esto ocurre muy rápidamente, en cuestión de minutos o incluso segundos, se caracteriza por rearrreglos localizados del citoesqueleto y ruffling de la membrana.<sup>14,15</sup> Las vesículas formadas como resultado de este proceso se denominan Fagosomas Gigantes (FG) debido a su gran tamaño (2-5µm). La formación de FG promueve la sobrevivencia de *Salmonella* mediante la dilución de compuestos lisosomales tóxicos o atenuación de factores que dañen a la bacteria, incluyendo dentro de éstos, la atenuación en la acidificación del fagosoma.<sup>15</sup>

Muchos factores implicados en la sobrevivencia intracelular están controlados por un sistema regulador llamado *PhoP/PhoQ*. *PhoP* y *PhoQ* son miembros de un grupo de sistemas reguladores de dos componentes que permiten a la bacteria sensar y responder a señales ambientales alterando la expresión a nivel genético. *PhoQ* es una proteína integral de membrana que responde a señales transfiriendo un fosfato a un residuo conservado de la región amino-terminal de *PhoP*. *PhoP* fosforilado se une a promotores para inducir o reprimir la expresión de más de 40 genes, denominados genes activados por *PhoP* (*pag*) y genes reprimidos por *PhoP* (*prg*) respectivamente. La actividad de cinasa de *PhoQ* puede ser reprimida por el incremento en la concentración de iones divalentes en el medio tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  lo que conlleva a un cambio estructural en la proteína y con esto se abate su capacidad de fosforilar, con lo que se reprime la expresión de los genes *pag*. Los productos resultantes de la expresión de los genes *pag* se han visto implicados de una manera importante en la patogénesis de *Salmonella*, incluyendo sobrevivencia dentro de macrófagos, inducción de FG, incremento en la resistencia a péptidos catiónicos y al pH bajo. Estos genes se han visto involucrados en la modificación del lipopolisacárido (LPS) mediante cambios estructurales del lípido A, lo cual ayuda a la bacteria a tener una mayor resistencia a los péptidos catiónicos antimicrobianos del hospedero.<sup>15,23,24</sup>

Dos tipos de mutaciones en el sistema *PhoP/PhoQ* han sido ampliamente usadas para su estudio, la mutación donde no se tiene *PhoP* (*PhoP<sup>-</sup>*) en la que no se pueden reprimir los genes *prg* y la mutación de *PhoP* constitutiva (*PhoP<sup>c</sup>*) en la que se tiene una expresión

constitutiva de los genes *pag* y una represión máxima de los genes *prg*, ambas mutantes son avirulentas en el modelo murino, con lo cual se demuestra la importancia de la regulación de este sistema para la patogénesis de *Salmonella*.<sup>23</sup> Se ha descrito que la cepa PhoP<sup>c</sup> tiene una atenuación en la inducción de macropinocitosis y en la formación de fagosomas gigantes<sup>13</sup>, esto podría estar indicando que posiblemente algún gen *prg* está implicando como inductor de la MPC, pero éste aún no se conoce y debe ser uno que no se encuentre codificado en la SPI-I.

**Resultados preliminares.** En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se construyó un banco de 2000 mutantes en genes que codifican para proteínas de membrana externa o proteínas secretadas de *Salmonella typhimurium* mediante mutagénesis aleatoria con el trasposón *TnphoA*. De estas mutantes se seleccionaron 500 y fueron probadas para identificar aquellas deficientes en la inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes mediante tinciones con Diff-Quick y fluorescencia en macrófagos murinos. Fueron seleccionadas las que mostraron tener un defecto en este fenotipo, quedando 3 cepas denominadas 627, 628 y 1284. Éstas fueron candidatas para estudios posteriores de sobrevivencia en macrófagos murinos, así como ensayos de citotoxicidad y de Southern Blott para verificar el número de inserciones de *TnphoA* en el genoma. Con los estudios desarrollados se encontró que estas cepas tenían defecto en la entrada, sobrevivencia y muerte en macrófagos murinos. Por los experimentos de Southern Blott se encontró que las cepas 627 y 628 tenían más de una inserción del trasposón en el genoma, hecho que no ocurrió con la cepa 1284 en la cual se demostró que existía una sola inserción del *TnphoA* en el genoma. Con esto, la cepa 1284 fue candidata para estudios posteriores.

De este estudio realizado en nuestro laboratorio se supo que la mutante identificada presentaba una atenuación en la inducción de MPC y en la formación de FG y que fue menos citotóxica en macrófagos murinos, todos estos experimentos fueron realizados *in-vitro*, por lo cual era necesario corroborar los resultados obtenidos en el modelo de estudio

de esta patogenia, es decir, *in vivo*, para lo cual se realizaron los experimentos que se discuten más detalladamente en el presente trabajo.

La fiebre tifoidea causada por *Salmonella typhi* sigue siendo un problema de salud pública en países en vías de desarrollo y a pesar de los programas de prevención se siguen teniendo casos de fiebre tifoidea que, aunado al incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos de uso común, hace que el resultado no sea satisfactorio, produciéndose decesos. Así mismo la gastroenteritis producida por Serovares de *Salmonella enterica* no Typhi se encuentran entre las primeras dos a tres causas de gastroenteritis asociada a alimentos. A pesar de que existen varios tipos de vacunas contra *Salmonella enterica* Serovar Typhi no existe una ideal con alta inmunogenicidad duradera, además de que todas son contra fiebre tifoidea y no existe protección contra la gastroenteritis producida por serotipos no Typhi. Por esta razón es de suma importancia continuar con el estudio de la patogenia de la infección por esta bacteria desde el punto de vista de bases moleculares, para con esto tener mejores armas para la prevención y tratamiento de esta enfermedad.

### **Hipótesis:**

La inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes es determinante y parte esencial en la virulencia de *Salmonella typhimurium* para causar fiebre tifoidea en el modelo murino.

### **Objetivo general:**

Comparar la virulencia de una cepa mutante deficiente en la inducción de macropinocitosis y fagosomas gigantes con la cepa silvestre en el modelo de fiebre tifoidea murina.

### **Objetivos particulares:**

- 1.- Determinar la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) para *Salmonella typhimurium* Cepa Silvestre y la mutante 1284 por vía oral e intraperitoneal en el modelo murino.
- 2.- Describir las diferencias en la colonización de *Salmonella typhimurium* Cepa Silvestre y la mutante 1284 en hígado y bazo.
- 3.- Determinar la presencia de *Salmonella typhimurium* Cepa Silvestre y la mutante 1284 dentro y fuera de macrófagos en cortes de hígado, bazo e íleon de ratón por medio de tinciones con inmunofluorescencia.

## **CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO**

Las cepas utilizadas en este estudio fueron *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ATCC 14028 Cepa Silvestre con virulencia completa<sup>25</sup> y *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium 1284, Cepa Mutante, con atenuación en la inducción de MPC y formación de FG<sup>26</sup>. El crecimiento de las bacterias en medio líquido se realizó en medio Luria Bertani (LB) adicionado de antibióticos, Kanamicina (Kn) 25µg/mL y Cloramfenicol 15µg/mL (Cam), para la mutante 1284 y sin ellos para la Cepa Silvestre a 37°C y en condiciones de aereación. El ajuste de la concentración de bacterias crecidas en caldo se realizó por espectrofotometría mediante la determinación de la densidad óptica a 600nm, se midió una dilución 1:10 de la bacteria hasta obtener un valor de 0.3, el cual corresponde a 10<sup>9</sup> UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/mL de acuerdo a una curva de crecimiento desarrollada previamente en nuestro laboratorio. El crecimiento de las bacterias en medios sólidos se realizó adicionando los marcadores requeridos para cada caso a una temperatura de incubación de 37°C.

## **DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL<sub>50</sub>)**

Para la infección se emplearon ratones del género femenino de la cepa BALB/c , de 6 a 8 semanas de edad, sanos y de peso similar. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Para el experimento se crecieron las bacterias en caldo (LB) para la cepa silvestre (CS) y adicionado de cloramfenicol (Cam) 15µg/mL y kanamicina (Kn) 25µg/mL para la cepa mutante 1284, manteniendo a 37 °C en aerofilia y con rotación en un Roller Cell-production Prum Bellco Glass, hasta alcanzar la fase logarítmica tardía. El número de bacterias se determinó en un espectrofotómetro Espectronic Génesis 5 mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm y el número de bacterias viables en el inóculo se

determinó por cuenta en placa de las UFC/mL, sembrando las diluciones correspondientes en agar LB adicionado de Cam, Kn y el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato BCIP de AMRESCO (XP) a una concentración de 40mg/mL<sup>27</sup> para el caso de la 1284 y XP solamente para la CS. Para la infección por vía oral se inocularon grupos de 6 ratones, administrando dosis de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  bacterias en 0.3mL de vehículo para la CS; para la mutante 1284 se administraron dosis de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  bacterias en 0.3 ml de vehículo. La inoculación oral se hizo con dos horas de ayuno previo del animal, usando una aguja de punta roma esférica de acero inoxidable estéril, con la cual aseguramos la administración directa al estómago, el vehículo empleado fue  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sodio) 0.1M para neutralizar la acidez gástrica<sup>1</sup>. Como control se incluyó un grupo de 6 ratones inoculados en las mismas condiciones, pero administrándoles únicamente el vehículo, sin bacteria. En todos los grupos se hicieron coprocultivos previos como control y posteriores a la inoculación y después diariamente hasta el fallecimiento de los animales con el fin de determinar la presencia de la bacteria. Los cultivos se hicieron en agar *Salmonella-Shigella* (S.S.) de DIFCO adicionado de Cm y Kn para la mutante 1284 y sin antibióticos para la CS para así asegurar la recuperación de la cepas inoculadas. Se confirmó el aislamiento de *Salmonella typhimurium* mediante la realización de pruebas bioquímicas de acuerdo al esquema establecido para esta especie<sup>28</sup>, además mediante serotipificación por el método de aglutinación en placa utilizando sueros antisalmonella del grupo B (somático). Los animales se observaron cada 24 horas durante 10 días registrando el estado individual y la fecha de muerte. El cálculo de la  $DL_{50}$  se hizo de acuerdo al método establecido por Reed y Muench<sup>29</sup>.

Para la inoculación por vía intraperitoneal, se crecieron y ajustaron las bacterias en la forma descrita anteriormente para vía oral. Grupos de 6 ratones fueron inoculados empleando jeringas de insulina, con dosis de  $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  y  $10^4$  bacterias para la CS y de  $10^2$ ,  $10^3$  y  $10^4$  bacterias para la mutante 1284, en 0.3mL de vehículo. Como control se incluyó un grupo de 6 ratones el cual se inoculó únicamente con el vehículo, 0.3mL de agua estéril libre de pirógenos. Los animales fueron observados cada 24 horas durante 10 días registrando datos

de enfermedad y fecha de muerte. El cálculo de la  $DL_{50}$  se hizo de acuerdo al método establecido por Reed y Muench<sup>29</sup>.

### COLONIZACIÓN A HÍGADO Y A BAZO

Se infectaron grupos de 6 ratones del género femenino, cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, sanos y de peso uniforme, proporcionados por el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. La infección se realizó por vía oral siguiendo la metodología mencionada anteriormente para el ajuste e inoculación de la bacteria por vía oral con la CS y con la mutante 1284, empleando para ambos casos una dosis de  $10^5$  bacterias en 0.3 mL de  $\text{NaHCO}_3$ <sup>1</sup>. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a las 48, 72 y 120 horas posteriores a la administración, obteniendo previo sacrificio, hemocultivos y coprocultivos. Los hemocultivos se sembraron en agar LB adicionado de Kn, Cam y XP para el caso de la mutante, y XP solamente para la CS. Los coprocultivos fueron sembrados en agar SS adicionado de Kn y Cam para la mutante 1284 y sin antibióticos para el caso de la CS y el grupo control. Se realizó la confirmación del aislamiento de *Salmonella typhimurium* mediante la realización de pruebas bioquímicas de acuerdo al esquema establecido para esta especie<sup>28</sup>.

De los grupos de 6 ratones, 3 fueron empleados para el estudio de colonización a hígado y bazo y 3 fueron empleados para los estudios de inmunofluorescencia.

Una vez sacrificado el ratón se disectó el hígado y el bazo en condiciones de asepsia, se pesaron en una balanza Sartorius BL610, fueron colocados en PBS adicionado de gentamicina para matar todas las bacterias que se encontraran extracelulares<sup>30</sup> y finalmente se depositaron en 4mL de agua destilada estéril, para con esto propiciar la lisis de las células que tenían en su interior a la *Salmonella* y que ésta fuera liberada<sup>31</sup>. El órgano fue homogenizado, se hicieron las diluciones pertinentes sembrándose alícuotas de 100 $\mu$ L del homogenizado y de éstas en agar LB adicionado de XP, Cam y Kn para la mutante

1284 y XP solamente para la CS y el grupo control. De esta forma se determinaron las UFC/g de órgano<sup>31</sup>. Se confirmó la identidad de *Salmonella typhimurium* mediante la realización de pruebas bioquímicas de acuerdo al esquema establecido para esta especie<sup>28</sup>.

### **DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS MAC+ CON BACTERIAS DENTRO.**

En condiciones de asepsia se disectaron el hígado, el bazo y las Placas de Peyer (PP) del íleon terminal de cada ratón<sup>32-34</sup>. El órgano se incluyó en Tissuetek OCT y se conservó a -20°C para hacer estudios de cortes de tejidos mediante inmunofluorescencia<sup>32,35</sup>. Para los estudios con inmunofluorescencia se hicieron cortes en un criostato MINITOME, con un grosor de 3µm. Fueron depositados en laminillas silanizadas Silane-Prep Slides Sigma-Aldrich y fijados con acetona fría por un periodo de 15 minutos. Con este tratamiento los tejidos pudieron ser almacenados en refrigeración a 4°C para su uso posterior en tinciones.

Para realizar las tinciones con inmunofluorescencia, se emplearon los cortes tratados de la manera mencionada. En cajas de Kopleing se eliminó el Tissuetek de los tejidos sumergiendo las laminillas en PBS por un periodo de 10 minutos, una vez terminado este tiempo se hizo el bloqueo de dichos tejidos empleando inmunoglobulinas humanas a una concentración de 100µg/mL durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Terminado este tiempo se adicionó el anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal antisalmonella hecho en conejo a una dilución de 1:5000, se incubó a 37°C durante 1 hora en cámara húmeda. Se colocó el anticuerpo secundario, anticuerpo monoclonal anti-conejo conjugado con TRITC Sigma-Immunochemicals y se incubó durante una hora a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad. Al terminar esta incubación se hicieron lavados con PBS-albúmina 0.2% para eliminar el anticuerpo que no reaccionó, se adicionó el anticuerpo que nos sirvió como marcador celular, α-MAC1 (obtenido de sobrenadante de la línea celular TIB128 a una dilución de 1:50), se incubó durante una hora a 37°C en cámara húmeda y oscuridad, se hicieron lavados con PBS-albúmina 0.2%. Se aplicó un anticuerpo secundario α-rata conjugado con FITC de DAKO a una dilución de 1:1000 y se incubó durante una hora a

37°C en cámara húmeda y oscuridad. Al término del tiempo de incubación se hicieron lavados con PBS-albúmina 0.2% y sin dejar que los tejidos se secaran, fueron montados, empleando para ello un líquido de montaje especial para inmunofluorescencia, Vecta-Shield de Vector Laboratory. Entre cada adición de anticuerpo se bloquearon los tejidos con inmunoglobulinas humanas a una concentración de 100µg/mL durante una hora. Las laminillas fueron observadas en un microscopio Nikon Eclipse con el objetivo de inmersión 100X. Las laminillas fueron leídas contando las bacterias encontradas en toda la superficie del tejido y determinando cuántas de éstas se encontraban dentro de células MAC positivas.

### **La mutante 1284 tiene virulencia disminuida en el modelo de fiebre tifoidea murina.**

La determinación de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) es ampliamente usada como marcador de virulencia de una cepa, por lo que se decidió comparar este parámetro entre las dos cepas, tanto por vía oral como por vía intraperitoneal (IP). Puede observarse que la cepa mutante 1284 tiene virulencia disminuida en el modelo de infección de este estudio pues se observa un incremento de casi 3 logaritmos en la determinación de la DL<sub>50</sub> comparada con la CS por vía oral (Figura 2) y por vía IP el incremento es de un logaritmo (Figura 5), corroborándose de esta forma la atenuación de la virulencia en la mutante 1284 con defecto en la inducción de MPC y formación de FG. Se muestran los resultados completos de la determinación de la DL<sub>50</sub> por el método descrito por Reed y Muench<sup>29</sup> ( Figuras 3, 4, 6 y 7) para ambas vías de inoculación y para ambas cepas en estudio.

### **La detección de la mutante 1284 en hígado y bazo es significativamente menor en comparación con la CS**

Una vez que se había observado que la mutante 1284 era menos virulenta (determinación de la DL<sub>50</sub>) se procedió a observar la colonización de esta cepa comparando con la CS en órganos blanco, hígado y bazo, para lo cual se infectaron ratones disectándose el hígado y el bazo a diferentes tiempos de infección, haciendo homogenizados y recuperándose bacteria viable. Se puede observar que la mutante 1284 es transportada a estos órganos pero se detectó significativamente en menor cantidad, encontrándose una diferencia sumamente marcada a los 5 días post-infección (Figura 8). Otro dato importante es que la bacteria se detecta en estos órganos hasta después de las 48 horas, a pesar de que se tengan hemocultivos positivos a partir de las 48 horas posteriores a la inoculación (Figura 10).

Al realizar la disección de los órganos se observó una notable esplenomegalia, siendo ésta una de las características fisiopatológicas de esta enfermedad, por lo cual se decidió realizar una comparación entre el peso y tamaño de estos órganos en los diferentes grupos en

estudio (Figura 9). En la fotografía se observa un visible incremento en el tamaño de los bazo tanto de los ratones inoculados con la mutante 1284 así como con la CS, comparados con el del grupo control. De igual manera se observa un incremento en el peso del bazo en los ratones inoculados con la CS y con la mutante 1284 comparados con el grupo control. Puede observarse que existe una diferencia marcada si se comparan los pesos de los órganos de los ratones inoculados con la mutante 1284 y con la CS con los del grupo de no infectados, pero no hay diferencia si se comparan los pesos de los órganos de la CS y de la mutante 1284, es decir, en ambos grupos la esplenomegalia es de magnitudes equiparables (Figura 9).

### **Los signos de enfermedad sistémica son menores en la cepa 1284 en comparación con la CS.**

Como parte del análisis de virulencia se registraron los datos de enfermedad de ambos grupos de ratones inoculados comparándolos con el grupo control, como resultado de estas observaciones se tiene que el ratón inoculado con la CS muestra piloerección sumamente marcada, respiración agitada, baja de peso y postración (Figura 11). Hecho que no sucede con el ratón inoculado con la mutante 1284 (Figura 11) donde el ratón tiene una piloerección a penas visible, no tiene la respiración agitada ni baja de peso y tampoco muestra signos de postración, tiene un aspecto muy parecido de grupo de ratones no infectados (Figura 11).

### **En hígado, bazo y Placas de Peyer la mayoría de las *Salmonella* se encuentran en células que no son macrófagos**

Ya se ha demostrado mediante diferentes formas que la cepa mutante es menos virulenta, pues por un lado, por estudios realizados *in-vitro*, se observó que sobrevive menos en macrófagos murinos y que además es menos citotóxica para ellos; *in-vivo*, se demostró que la DL<sub>50</sub> para la mutante 1284 es mayor por ambas vías probadas y que además esta cepa coloniza y se replica significativamente menos que la CS en hígado y bazo. Una pregunta obligada es si la mutante 1284 permanece en mayor o menor grado en macrófagos de los

órganos blanco en comparación con la CS. Con este fin se hicieron dobles tinciones para colocalizar bacteria y marcadores de macrófagos en tejidos de animales infectados. SE utilizaron anticuerpos específicos y fueron examinadas empleando para ello la técnica de microscopía con inmunofluorescencia. Se contaron cuántas bacterias se encontraban dentro de las células MAC positivas (macrófagos) y cuántas fuera de éstas. Esto se ejemplifica en las fotografías de la Figura 16. Como resultado del conteo de bacterias en el tejido se puede observar una tendencia a encontrar menor cantidad de éstas en los tejidos correspondientes a los ratones inoculados con la mutante 1284 y mayor cantidad en los correspondientes a los inoculados con la CS (Figura 13). Por otro lado, los resultados muestran que la mayor parte de las bacterias en los tejidos se encuentran fuera de macrófagos (Figura 12). Los resultados completos de este conteo se muestran en la Figura 14 para la mutante 1284 y en la Figura 15 para la CS.

La determinación de la  $DL_{50}$  ha sido ampliamente usada como marcador de virulencia, pues mediante esta determinación se puede tener una idea de la cantidad de bacterias requeridas para que la mitad de la población en estudio muera. Al realizar esta metodología paralelamente con un control se puede estimar de una manera muy certera la virulencia de una cepa mutante, como es el caso en este estudio<sup>36,37</sup>. Se sabe que la  $DL_{50}$  por vía oral para la CS es de aproximadamente  $10^6$  bacterias<sup>32</sup>, en este modelo este valor no se obtuvo, la dosis encontrada por nosotros fue un poco menor pero coincide con lo reportado por Miller y cols.<sup>30</sup>, esto puede explicarse debido a la variabilidad biológica de los animales, ya que al hacer estudios *in-vivo* quedan muchos factores difíciles de controlar por el experimentador.

Como se observa en la Figura 2 la  $DL_{50}$  para la mutante 1284 fue mucho mayor que para la CS, ya que para poder alcanzar la  $DL_{50}$  para la mutante se requirió de casi 3 logaritmos más de dosis de bacterias, es decir, de casi 1000 veces más bacterias que en el caso de la CS, este hallazgo correlaciona con lo encontrado en los estudios previos a este trabajo realizados *in-vitro* en los cuales se infectaban monocapas de macrófagos y se evidenciaba que esta mutante era menos virulenta para estos, ya que igualmente se realizaron determinaciones de citotoxicidad de la mutante 1284 comparada con la CS en macrófagos murinos, siendo la primera menos citotóxica que la CS. El hecho de que se requiera de 1000 veces más cantidad de bacterias para alcanzar la  $DL_{50}$  para la mutante habla de una verdadera atenuación en la virulencia de esta cepa y de la importancia de la MPC y de la formación de FG para la patogenia de la enfermedad, pues a pesar de que los ratones se enfermaban, hecho que se corroboró al hacer los estudios de colonización, su estado fisiológico era casi equiparable al de los ratones del grupo de no infectados, es decir, tenían poca piloerección y no mostraban postración (Figura 11). Al hacer los coprocultivos posteriores a la inoculación siempre se recuperó la bacteria en todos los ratones inoculados, tanto para el grupo inoculado con la CS como para el grupo inoculado con la mutante 1284, así que en realidad se tiene la certeza de que los animales contrajeron la infección. Un hecho que vale la pena mencionar es que al término de la realización de la  $DL_{50}$  por vía oral la mayoría de los ratones infectados con la CS murieron con el paso del tiempo, en el caso

del grupo correspondiente a la mutante 1284 quedaron ratones vivos, pero a diferencia de los correspondientes al grupo de la CS estos ratones se recuperaron, es decir, mostraban signos de enfermedad pero al paso de los días estos signos fueron desapareciendo y finalmente los ratones se observaban como el grupo de ratones no infectados, lo que posiblemente sugiere que de alguna manera los ratones inoculados con la cepa mutante 1284 autolimitaron la infección. Para comprobar esto tendría que hacerse un seguimiento de más días de estos ratones y determinar UFC/g a tiempos tardíos después de la inoculación en diferentes órganos como el hígado y el bazo para observar si verdaderamente se llevó a cabo un aclaramiento total de las bacterias o autolimitan la enfermedad y quedan como portadores asintomáticos.

Por otro lado en la Figura 5 se determinó la  $DL_{50}$  para ambas cepas en estudio por vía intraperitoneal, se puede observar que tal como está reportado la  $DL_{50}$  para la CS está muy cercana a 10 bacterias, en algunos artículos se reporta que esta dosis es menor a 30 bacterias<sup>30,37</sup>, pero más exactamente se sabe que esta dosis es de 10 bacterias<sup>1</sup>. La  $DL_{50}$  para la mutante 1284 fue mayor comparada con la CS, pero este incremento no es tan dramático como lo fue por vía oral, pues para este caso se requirió sólo de 10 veces más bacterias, es decir, la  $DL_{50}$  para esta mutante 1284 es de 100 bacterias. Como se menciona anteriormente este incremento no es tan notable como para el caso de la  $DL_{50}$  por vía oral en la que se tenía una diferencia de 3 logaritmos, mientras que para el caso de la vía intraperitoneal se tiene la diferencia de sólo un logaritmo, este hecho estaría hablando de que en verdad es determinante para la mutante probada en este estudio el paso del intestino al torrente sanguíneo, es decir, el hecho de tener que atravesar barreras físicas que comienzan desde el pH ácido del estómago y culminan con el paso de la bacteria a través del epitelio intestinal, es decir, que tiene una gran importancia la inducción de MPC y la formación de FG a nivel de barrera intestinal. Por los datos obtenidos mediante la determinación de la  $DL_{50}$  podemos pensar que para la mutante 1284 el paso a través del intestino es determinante para su virulencia, pues por vía intraperitoneal este paso se obvia colocando a la bacteria

directamente en el peritoneo donde tiene paso libre al torrente sanguíneo y así puede diseminarse libremente y establecer contacto con células que pueden transportar a la bacteria a nódulos linfáticos, hígado, bazo, médula ósea, etc.

Como puede observarse en la Figura 8 la bacteria se detecta en el hígado y el bazo hasta las 72 horas posteriores a la inoculación, a pesar de que a partir de las 48 horas se tengan hemocultivos positivos para ambos grupos (Figura 10). Estos datos coinciden con experimentos hechos con anterioridad en nuestro laboratorio. También la gráfica nos muestra que hay diferencia significativa en la cantidad de bacterias recuperadas a las 72 horas post-inoculación entre el grupo de ratones infectados con la CS y los infectados con la mutante 1284, pero a los 5 días post-infección esta diferencia es sumamente marcada (Figura 8), hecho que de alguna manera ya se esperaba, pues según los estudios previos realizados *in-vitro* para la mutante se observó que sobrevivía menos que la CS al realizar infecciones en monocapas de macrófagos murinos, estos datos correlacionan con lo encontrado por Richter y cols. en cuanto a que ellos encuentran mayor cantidad de bacterias en bazo con respecto a las encontradas en hígado<sup>38</sup>. Lo que es interesante en este punto es que según los datos de la DL<sub>50</sub> el paso a través de la barrera intestinal es determinante para la virulencia de la mutante 1284, por lo que en un principio se llegó a pensar que muy probablemente la mutante 1284 no llegaría a colonizar hígado y bazo, pero al realizar este experimento se constató que sí colonizaba y además de que colonizaba la bacteria se replicaba en estos órganos, claro que comparada con la CS la mutante lo hacía significativamente en menor cantidad, lo que también habla de una atenuación en la virulencia pues sobrevive menos, es decir es más susceptible al ataque de los mecanismos de protección del sistema inmune del ratón, recordemos que la replicación de la bacteria en hígado y bazo depende en gran parte del fondo genético de la bacteria<sup>39</sup>. Por otro lado se puede pensar, por los datos de la DL<sub>50</sub>, que la mutante 1284 pasa en menor cantidad la barrera intestinal pero las bacterias que logran pasar finalmente colonizan y se replican en el hígado y en el bazo. Lo que valdría la pena realizar es una cinética a un mayor tiempo

post-infección para tratar de evidenciar qué es lo que pasa al transcurrir el tiempo y ver si el número de bacterias recuperadas de los órganos disminuye hasta desaparecer por completo para apoyar la hipótesis de que el ratón inoculado con la cepa mutante 1284 podría de alguna manera autolimitar la enfermedad.

Igualmente vale la pena analizar lo observado en la Figura 9, la esplenomegalia observada en ambos grupos de ratones en estudio, tanto los inoculados con la CS como los inoculados con la mutante 1284, puede observarse una diferencia en el peso y el tamaño del órgano comparado con el tamaño del bazo correspondiente al grupo control, ésta es casi de 1 cm, esto puede ser debido a una congestión originada por la migración de células a este órgano como parte de la respuesta inmune generada por la invasión de la bacteria.

Una vez que se habían hecho los estudios de colonización y se comprobó que la cepa mutante colonizaba los órganos estudiados mediante la recuperación de bacteria viable en ellos lo que proseguimos a hacer fue la localización de las bacterias en células MAC positivas, que para este caso serían macrófagos, pues todos los estudios previos a este trabajo se realizaron en estas células. Como puede observarse en la Figura 13 la tendencia encontrada en los experimentos de colonización mediante la determinación de UFC/g de hígado y de bazo se mantiene, ya que se puede observar que en general es mayor la cantidad de bacteria encontrada en los cortes correspondientes a la CS comparados con los de la mutante 1284. Cabe aclarar que no se esperaba encontrar cantidades tan grandes de bacterias en las laminillas como se muestra en la Figura 8 puesto que esos datos se reportan como UFC/g de órgano, se puede observar en la Figura 9 que el peso del bazo de un ratón se encuentra aproximadamente en 0.1g, la décima parte de un gramo, pero además ¿cuánto puede pesar una sección de este tejido que tiene un grosor de  $3\mu\text{m}$ ?, esta es la razón o una forma de explicar el por qué de encontrar pocas bacterias en el tejido. Además de lo explicado, en algunos estudios encuentran mediante microscopía una cantidad mayor de bacterias<sup>38</sup> pero en este estudio inoculan a los ratones por vía intraperitoneal, con lo cual se

está colocando a la bacteria prácticamente en el torrente sanguíneo, una condición totalmente diferente a la establecida en nuestro estudio.

Lo importante es ver que la tendencia observada en la determinación de UFC/g de órgano se mantiene (Figura 13) aunque igualmente hay que decir que las desviaciones son muy grandes para algunos casos como lo es para la parte correspondiente al hígado de la cepa mutante 1284 y la CS en las que mediante las desviaciones podemos observar que no existen diferencias, nuevamente cabe aclarar que éste no es el mejor método para establecer cuentas de bacterias ya que no se pueden comparar las secciones de tejido en cuanto a área observada para cada uno de los cortes ya que las porciones incluidas no tienen necesariamente la misma superficie.

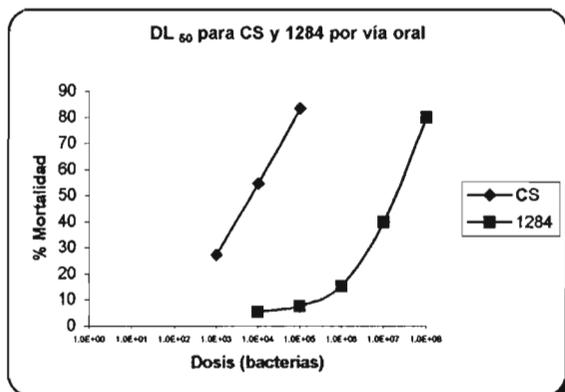
Como se discutió en el párrafo anterior se observó que la tendencia de la cantidad de bacterias en el tejido se mantenía de acuerdo a lo encontrado en el experimento de colonización (Figura 13), entonces lo que prosiguió fue establecer en qué células se encontraban las bacterias en el tejido estudiado, para ello se hizo tinción cin inmunofluorescencia para detectar tanto a la bacteria como al marcador celular MAC1 y para tener un mejor manejo de los datos se decidió establecer el porcentaje de bacterias con respecto al total de ellas en el tejido que se encontraban dentro de células MAC positivas, estos datos se encuentran reportados en la Figura 12. Lo que es interesante y de llamar la atención en esta parte es que puede observarse para todos los tejidos en estudio y para ambas cepas, la CS y la mutante 1284, que un bajo porcentaje de bacterias se encuentran dentro de macrófagos, entonces la pregunta obligada en este punto sería, ¿dónde están el resto de las bacterias?, es decir, ¿en qué células se encuentran estas bacterias?. Recordemos que todos los estudios previos a este trabajo se realizaron *in-vitro* y que las células empleadas siempre fueron macrófagos, entonces, lo que podría hacerse serían estudios *in-vitro* de la mutante con otros tipos de células como linfocitos T o linfocitos B, células dendríticas, etc. para observar qué es lo que pasa con esta bacteria en otras estirpes celulares. En el caso de células dendríticas se sabe que pueden participar en la captación de

la bacteria desde el epitelio intestinal y fagocitarla permitiendo así su diseminación a otros órganos.<sup>33,40</sup> También se ha visto la implicación de células CD18<sup>+</sup> en la diseminación extraintestinal de la bacteria a órganos linfoides.<sup>41</sup> Recientemente se examinó el papel de linfocitos B, células no fagocíticas, en el procesamiento de *Salmonella* y se observó que ésta sobrevive mejor en linfocitos B preactivados con interferón gama que en macrófagos preactivados de la misma manera.<sup>42</sup> Esto podría estar sugiriendo de una manera contundente la importancia de la participación de células diferentes a macrófagos implicadas en la diseminación y procesamiento de *Salmonella*.

Finalmente y recapitulando, ya se demostró mediante la realización de la DL<sub>50</sub> por ambas vías que la cepa mutante 1284 es menos virulenta que la CS, que sí llega tanto a hígado como a bazo y que se replica en estos órganos pero en una cantidad significativamente menor pues a los 5 días post-infección existe una marcada diferencia entre el número de bacterias en ambos órganos, esto nos hablaría de que puede resistir menos el ataque del sistema inmune y que la inducción de MPC y formación de FG es realmente esencial en la patogenia de *Salmonella*. Por otro lado al observar los tejidos teñidos con inmunofluorescencia puede observarse que sólo un pequeño porcentaje de bacterias se encuentran dentro de macrófagos, entonces podría pensarse en la implicación de células diferentes a los macrófagos involucradas en la diseminación y además que *Salmonella* pueda usarlas como reservorio. Esta posibilidad abre nuevas líneas de investigación en las que puede tratarse de encontrar la participación de las demás células del sistema inmune en la infección por *Salmonella* y además el comportamiento de estas células con la mutante analizada en este estudio.

- 1.- La determinación de la  $DL_{50}$  por ambas vías de inoculación, oral e intraperitoneal, demuestra que la cepa mutante 1284 es menos virulenta al requerir aproximadamente 1000 veces más dosis de bacterias que la CS por vía oral y 10 veces más por vía intraperitoneal.
  
- 3.- Las diferencias significativas en colonización en hígado y bazo para ambas cepas corroboran los datos obtenidos a partir de la  $DL_{50}$  al ser estos colonizados en menor cantidad por la cepa mutante 1284 comparados con la CS.
  
- 4.- Según el conteo de bacterias dentro de macrófagos mediante tinción con inmunofluorescencia de las secciones de tejidos puede pensarse que el macrófago no es el principal reservorio de *Salmonella* al encontrarse un bajo porcentaje dentro de estas células y con esto la posible implicación de células diferentes a macrófagos involucradas en el transporte y diseminación de *Salmonella*.
  
- 5.- La atenuación en la inducción de MPC y formación de FG de la mutante 1284 no se asocia directamente a su capacidad de diseminación a órganos blanco, pero este fenotipo sí está implicado en la disminución de la virulencia y replicación en este modelo de infección.

## LA MUTANTE 1284 TIENE VIRULENCIA DISMINUIDA EN EL MODELO DE INFECCIÓN DE FIEBRE TIFOIDEA MURINA



DOSIS (bact/0.3mL)	% MORTALIDAD	
	CS	1284
10 <sup>3</sup>	27.27	ND <sup>a</sup>
10 <sup>4</sup>	54.55	5.56
10 <sup>5</sup>	83.33	7.69
10 <sup>6</sup>	ND	15.38
10 <sup>7</sup>	ND	40
10 <sup>8</sup>	ND	80

**Figura 2.** Determinación de la DL<sub>50</sub> para la CS y la 1284 por vía oral. Se infectaron 6 ratones por grupo con las dosis indicadas usando como vehículo NaHCO<sub>3</sub><sup>1</sup>. Se dio seguimiento durante 10 días registrando cada 24 horas signos de enfermedad y muertes.

### Para la Cepa Silvestre

GRUPO	DOSIS	VIVOS	MUERTOS	TOTAL		% MORTALIDAD
				VIVOS	MUERTOS	
1	10 <sup>3</sup>	3	3	8	3	27.27
2	10 <sup>4</sup>	3	3	5	6	54.55
3	10 <sup>5</sup>	2	4	2	10	83.33

**Figura 3.** Resultados completos de la determinación de la DL<sub>50</sub> para la CS, empleando la metodología descrita por Reed y Muench<sup>29</sup>.

Para la mutante 1284

GRUPO	DOSIS	VIVOS	MUERTOS	TOTAL		% MORTALIDAD
				VIVOS	MUERTOS	
1	10 <sup>4</sup>	5	1	22	1	4.35
2	10 <sup>5</sup>	6	0	17	1	5.56
3	10 <sup>6</sup>	5	1	11	2	15.38
4	10 <sup>7</sup>	4	2	6	4	40.00
5	10 <sup>8</sup>	2	4	2	8	80.00

Figura 4. Resultados completos de la determinación de la DL<sub>50</sub> para la cepa 1284, empleando la metodología descrita por Reed y Muench<sup>29</sup>.

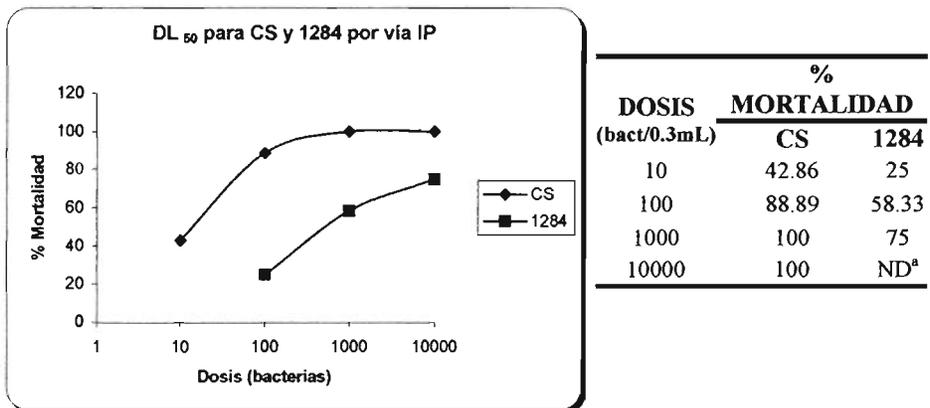


Figura 5. Determinación de la DL<sub>50</sub> para la CS y la 1284 por vía intraperitoneal. Se infectaron 6 ratones por grupo con las dosis indicadas usando como vehículo agua calidad inyectable libre de pirógenos. Se dio seguimiento durante 10 días registrando cada 24 horas signos de enfermedad y muertes.

<sup>a</sup>ND. Dato no determinado

Para la Cepa Silvestre:

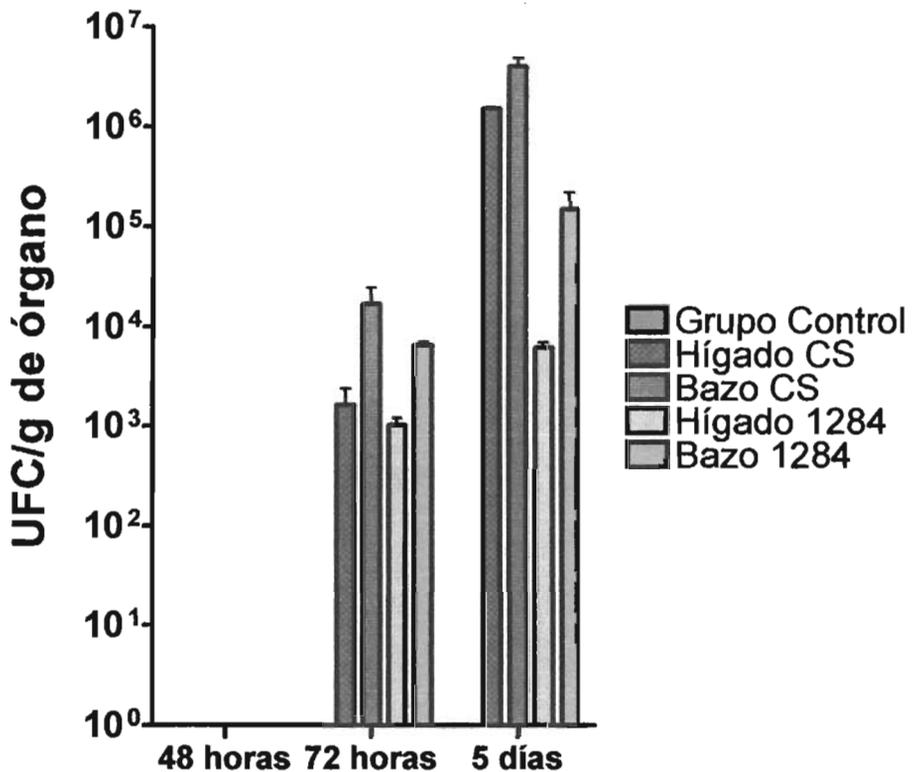
GRUPO	DOSIS	VIVOS	MUERTOS	TOTAL		% MORTALIDAD
				VIVOS	MUERTOS	
1	10	3	3	4	3	42.86
2	$10^2$	1	5	1	8	88.89
3	$10^3$	0	6	0	14	100.00
4	$10^4$	0	6	0	20	100.00

**Figura 6.** Resultados completos de la determinación de la  $DL_{50}$  para la CS por vía IP, empleando la metodología descrita por Reed y Muench<sup>29</sup>.

Para la mutante 1284:

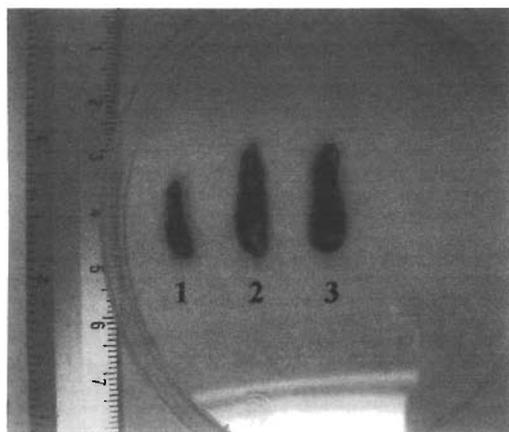
GRUPO	DOSIS	VIVOS	MUERTOS	TOTAL		% MORTALIDAD
				VIVOS	MUERTOS	
1	$10^2$	4	2	6	2	25.00
2	$10^3$	1	5	5	7	58.33
3	$10^4$	1	5	4	12	75.00

**Figura 7.** Resultados completos de la determinación de la  $DL_{50}$  para la mutante 1284 por vía IP, empleando la metodología descrita por Reed y Muench<sup>29</sup>.

**LA LLEGADA Y REPLICACIÓN DE LA MUTANTE 1284 EN HÍGADO Y BAZO ES SIGNIFICATIVAMENTE MENOR EN COMPARACIÓN CON LA CS**

**Figura 8.** Colonización en hígado y bazo para la CS y la mutante 1284 a diferentes tiempos de infección. Se infectaron grupos de 3 ratones BALB/c con una dosis de  $10^5$  bacterias y fueron sacrificados por dislocación cervical a diferentes tiempos post-infección. Se disectaron el hígado y el bazo en condiciones de asepsia y fueron homogenizados, se sembraron alícuotas de  $100\mu\text{L}$  en agar LB adicionado de los marcadores requeridos. Las barras muestran la desviación estándar de cada experimento.

**AMBOS GRUPOS DE RATONES, INOCULADOS CON LA MUTANTE 1284 Y CON LA CS, MOSTRAN UNA NOTABLE ESPLENOMEGALIA COMPARADOS CON EL GRUPO CONTROL**



GRUPO	PESO DEL BAZO (g)
CS 48 hrs	0.12
1284 48 hrs	0.127
CS 72 hrs	0.12
1284 72 hrs	0.12
CS 5 días	0.153
1284 5 días	0.14
Controles No infectados	0.09

**Figura 9.** Comparación del peso y tamaño de los bazo en los diferentes grupos de ratones inoculados comparados con el grupo control. El peso reportado es el promedio de los pesos individuales del órgano en el grupo de 3 ratones.

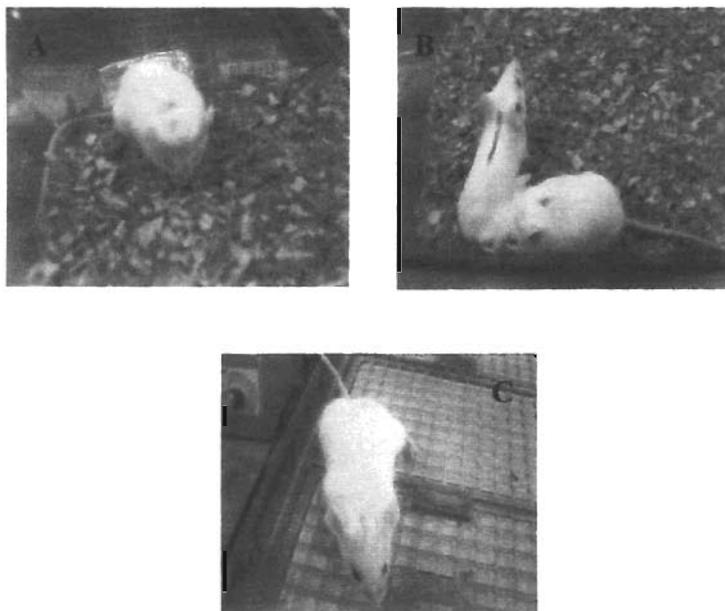
1, Grupo control; 2, Cepa Silvestre; 3, Mutante 1284

**SE ENCUENTRAN HEMOCULTIVOS POSITIVOS A PARTIR DE LAS 48 HORAS POSTERIORES A LA INOCULACIÓN**

GRUPO	HEMOCULTIVO
CS 48 Horas	+
1284 48 Horas	+
CS 72 Horas	+
1284 72 Horas	+
CS 5 días	+
1284 5 días	+
Controles No infectados	-

**Figura 10.** Diseminación a sangre a diferentes tiempos post-infección para la CS y la mutante 1284. Previos al sacrificio se tomaron hemocultivos por punción cardiaca a todos los ratones, se sembraron directamente en agar LB adicionado de los marcadores correspondientes. + Indica hemocultivo positivo, - Indica hemocultivo negativo

**MANIFESTACIONES DE ENFERMEDAD DE LOS RATONES INOCULADOS CON LA MUTANTE 1284 ES COMPARABLE AL DE LOS RATONES DEL GRUPO CONTROL**



**Figura 11.** Fotografía de un ratón inoculado con la CS (A), con la mutante 1284 (B), y con vehículo  $\text{NaHCO}_3$  (grupo control NO INFECTADO) (C), 5 días post-infección.

**LA MAYOR PARTE DE LAS BACTERIAS ENCONTRADAS EN LOS TEJIDOS EN ESTUDIO ESTÁN LOCALIZADAS FUERA DE MACRÓFAGOS**

	CS			1284		
	Bazo(%)	Hígado(%)	Intestino(%)	Bazo(%)	Hígado(%)	Intestino(%)
1	20	0	40	22.2	0	0
2	11.1	0	0	20	0	0
3	14.3	16.7	60	0	0	66.7
4	22.2	0	50	20	0	33.3
5	27.3	20	33.3	33.3	0	0
<b>Promedio</b>	18.98	7.34	36.66	19.1	0	20
<b>DE<sup>a</sup></b>	6.41	10.11	22.85	12.01	0	29.82

**Figura 12.** Porcentaje de bacterias con respecto al total de ellas encontradas dentro de células MAC positivas en los respectivos tejidos en estudio. Se reportan los datos correspondientes a ambas cepas en estudio.

<sup>a</sup>Desviación Estándar.

**SE CONSERVA LA TENDENCIA ENCONTRADA EN LOS ESTUDIOS DE COLONIZACIÓN EN HÍGADO Y BAZO**

	CS			1284		
	Bazo	Hígado	Intestino	Bazo	Hígado	Intestino
1	10	3	10	9	5	1
2	9	1	1	5	6	1
3	7	6	5	4	3	1
4	9	4	6	6	4	2
5	11	5	6	6	3	2
<b>Promedio</b>	9.2	3.8	5.6	6	4.2	1.4
<b>DE<sup>a</sup></b>	1.48	1.92	3.21	1.87	1.30	0.55

**Figura 13.** Número total de bacterias encontradas en el tejido. Los datos reportados son para ambas cepas en estudio.

<sup>a</sup> Desviación Estándar.

MUTANTE 1284						
	Bazo		Hígado		Intestino	
	<i>Salmonella</i> + MAC <sup>a</sup>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> + MAC <sup>a</sup>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> + MAC <sup>a</sup>	<i>Salmonella</i>
1	2	7	0	5	0	1
2	1	4	0	6	0	1
3	0	4	0	3	2	1
4	1	5	0	4	1	2
5	2	4	0	3	0	2

**Figura 14.** Resultados de las cuentas de bacterias dentro y fuera de células MAC positivas para los tres tejidos en estudio. Los resultados corresponden al grupo de ratones inoculados con la mutante 1284.

<sup>a</sup> Número de bacterias encontradas dentro de células MAC positivas

CEPA SILVESTRE						
	Bazo		Hígado		Intestino	
	<i>Salmonella</i> + MAC <sup>a</sup>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> + MAC <sup>a</sup>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> + MAC <sup>a</sup>	<i>Salmonella</i>
1	2	8	0	3	4	6
2	1	8	0	1	0	1
3	1	6	1	5	3	2
4	2	7	0	4	3	3
5	3	8	1	4	2	4

**Figura 15.** Resultados de las cuentas de bacterias dentro y fuera de células MAC positivas para los tres tejidos en estudio. Los resultados corresponden al grupo de ratones inoculados con la CS.

<sup>a</sup> Número de bacterias encontradas dentro de células MAC positivas

**IMÁGENES DE EJEMPLO PARA EL CONTEO DE CÉLULAS MAC+ CON BACTERIAS DENTRO Y FUERA DE ELLAS**



**Figura 16.** **A**, microfotografía de un corte de intestino mostrando una célula MAC+ con una bacteria en su interior. **B**, microfotografía de un corte de hígado mostrando una celula MAC+ con una bacteria fuera, ambos teñidos con  $\alpha$ -MAC1 y  $\alpha$ -rata-FITC,  $\alpha$ -salmonella y  $\alpha$ -conejo-TRITC.

## Referencias

1. Srinivasan A., Foley J., Ravindran R., & McSorley S.J. (2004) Low-dose Salmonella infection evades activation of flagellin-specific CD4 T cells. *J.Immunol.* **173**, 4091-4099.
2. Sharma A. & Qadri A. (2004) Vi polysaccharide of Salmonella typhi targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 17492-17497.
3. Calva Edmundo. Salmonella typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Instituto de Biotecnología, UNAM , 2002.
4. Zhang S., Kingsley R.A., Santos R.L., Andrews-Polymenis H., Raffatellu M., Figueiredo J., Nunes J., Tsolis R.M., Adams L.G., & Baumler A.J. (2003) Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect.Immun.* **71**, 1-12.
5. Groissman E.A. *Principles of Bacterial Pathogenesis*, Academic Press, USA, 2001.
6. Monack D.M., Bouley D.M., & Falkow S. (2004) Salmonella typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nrampl<sup>+/+</sup> mice and can be reactivated by IFN $\gamma$  neutralization. *J.Exp.Med.* **199**, 231-241.
7. al Ramadi B.K., Fernandez-Cabezudo M.J., Mustafa N., & Xu D. (2004) Activation of innate immune responses by IL-2-expressing Salmonella typhimurium is independent of Toll-like receptor 4. *Mol.Immunol.* **40**, 671-679.
8. Prakash P., Mishra O.P., Singh A.K., Gulati A.K., & Nath G. (2005) Evaluation of nested PCR in diagnosis of typhoid fever. *J.Clin.Microbiol.* **43**, 431-432.
9. Schmieger H. & Schicklmaier P. (1999) Transduction of multiple drug resistance of Salmonella enterica serovar typhimurium DT104. *FEMS Microbiol.Lett.* **170**, 251-256.
10. Marchetti M., Sirard J.C., Sansonetti P., Pringault E., & Kerneis S. (2004) Interaction of pathogenic bacteria with rabbit appendix M cells: bacterial motility is a key feature in vivo. *Microbes.Infect.* **6**, 521-528.

11. Jones B.D., Ghori N., & Falkow S. (1994) Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J.Exp.Med.* **180**, 15-23.
12. Galan J.E. (2001) Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **17**, 53-86.
13. Alpuche-Aranda C.M., Berthiaume E.P., Mock B., Swanson J.A., & Miller S.I. (1995) Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with Salmonella serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect.Immun.* **63**, 4456-4462.
14. Alpuche-Aranda C.M., Racoosin E.L., Swanson J.A., & Miller S.I. (1994) Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J.Exp.Med.* **179**, 601-608.
15. Ernst R.K., Guina T., & Miller S.I. (1999) How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J.Infect.Dis.* **179 Suppl 2**, S326-S330.
16. Santos R.L., Zhang S., Tsoilis R.M., Kingsley R.A., Adams L.G., & Baumler A.J. (2001) Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes.Infect.* **3**, 1335-1344.
17. Kujat Choy S.L., Boyle E.C., Gal-Mor O., Goode D.L., Valdez Y., Vallance B.A., & Finlay B.B. (2004) SseK1 and SseK2 are novel translocated proteins of Salmonella enterica serovar typhimurium. *Infect.Immun.* **72**, 5115-5125.
18. Kimbrough T.G. & Miller S.I. (2002) Assembly of the type III secretion needle complex of Salmonella typhimurium. *Microbes.Infect.* **4**, 75-82.
19. Waterman S.R. & Holden D.W. (2003) Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* **5**, 501-511.
20. Ahmer B.M. & Heffron F. (1999) Salmonella typhimurium recognition of intestinal environments: response. *Trends Microbiol.* **7**, 222-223.
21. Lee V.T. & Schneewind O. (1999) Type III secretion machines and the pathogenesis of enteric infections caused by Yersinia and Salmonella spp. *Immunol.Rev.* **168**, 241-255.
22. Groisman E.A. & Ochman H. (1997) How Salmonella became a pathogen. *Trends Microbiol.* **5**, 343-349.

23. Ernst R.K., Guina T., & Miller S.I. (2001) Salmonella typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes.Infect.* **3**, 1327-1334.
24. Tamayo R., Prouty A.M., & Gunn J.S. (2005) Identification and functional analysis of Salmonella enterica serovar Typhimurium PmrA-regulated genes. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **43**, 249-258.
25. Alpuche Aranda C.M., Swanson J.A., Loomis W.P., & Miller S.I. (1992) Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 10079-10083.
26. Ramírez Aguilar María de la Luz. Tesis, La fagocitosis de *Salmonella* por macrófagos mediante macropinocitosis es esencial para la producción de infección sistémica. 2004.
27. Manoil C. & Beckwith J. (1985) Tnp<sub>phoA</sub>: a transposon probe for protein export signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 8129-8133.
28. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams & Wilkins Company, USA, 1974. 2005.
29. Reed, L. J. Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene* **27**, 493-497. 1938.
30. Miller S.I. & Mekalanos J.J. (1990) Constitutive expression of the phoP regulon attenuates Salmonella virulence and survival within macrophages. *J.Bacteriol.* **172**, 2485-2490.
31. al Ramadi B.K., Al Dhaheri M.H., Mustafa N., Abouhaidar M., Xu D., Liew F.Y., Lukic M.L., & Fernandez-Cabezudo M.J. (2001) Influence of vector-encoded cytokines on anti-Salmonella immunity: divergent effects of interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha. *Infect.Immun.* **69**, 3980-3988.
32. Raupach B., Kurth N., Pfeffer K., & Kaufmann S.H. (2003) Salmonella typhimurium strains carrying independent mutations display similar virulence phenotypes yet are controlled by distinct host defense mechanisms. *J.Immunol.* **170**, 6133-6140.
33. Sansonetti P.J. (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat.Rev.Immunol.* **4**, 953-964.

34. Takumi K., Garssen J., de Jonge R., de Jong W., & Havelaar A. (2005) Release kinetics and cell trafficking in relation to bacterial growth explain the time course of blood neutrophils and monocytes during primary Salmonella infection. *Int.Immunol.* **17**, 85-93.
35. Secott T.E., Lin T.L., & Wu C.C. (2004) Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect.Immun.* **72**, 3724-3732.
36. Sydenham M., Douce G., Bowe F., Ahmed S., Chatfield S., & Dougan G. (2000) Salmonella enterica serovar typhimurium surA mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect.Immun.* **68**, 1109-1115.
37. Fields P.I., Swanson R.V., Haidaris C.G., & Heffron F. (1986) Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 5189-5193.
38. Richter-Dahlfors A., Buchan A.M., & Finlay B.B. (1997) Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J.Exp.Med.* **186**, 569-580.
39. Totemeyer S., Foster N., Kaiser P., Maskell D.J., & Bryant C.E. (2003) Toll-like receptor expression in C3H/HeN and C3H/HeJ mice during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect.Immun.* **71**, 6653-6657.
40. Cossart P. & Sansonetti P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**, 242-248.
41. Vazquez-Torres A., Jones-Carson J., Baumler A.J., Falkow S., Valdivia R., Brown W., Le M., Berggren R., Parks W.T., & Fang F.C. (1999) Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**, 804-808.
42. Rosales-Reyes R., Alpuche-Aranda C., Ramirez-Aguilar M.L., Castro-Eguiluz A.D., & Ortiz-Navarrete V. (2005) Survival of Salmonella enterica Serovar Typhimurium within Late Endosomal-Lysosomal Compartments of B Lymphocytes Is Associated with the Inability To Use the Vacuolar Alternative Major Histocompatibility Complex Class I Antigen-Processing Pathway. *Infect.Immun.* **73**, 3937-3944.