



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

IDENTIFICACIÓN DE *fliC* Y EXPRESIÓN DE  
FLAGELO en *Salmonella enterica* subespecie  
*enterica* serovariedad Gallinarum biovariedad  
gallinarum

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**JULIA DÍAZ CORTÉS**

ASESORES

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

DRA. DELIA XOCHIL VEGA MANRÍQUEZ



MÉXICO, D.F.

2012



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.

La luna se puede tomar a cucharadas  
o como una cápsula cada dos horas.  
Es buena como hipnótico y sedante  
y también alivia  
a los que se han intoxicado de filosofía  
Un pedazo de luna en el bolsillo  
es el mejor amuleto que la pata de conejo:  
sirve para encontrar a quien se ama,  
para ser rico sin que nadie lo sepa  
y para alejar a los médicos y las clínicas.  
Se puede dar de postre a los niños  
cuando no se han dormido,  
y unas gotas de luna en los ojos de los ancianos  
ayudan a bien morir

Pon una hoja tierna de la luna  
debajo de tu almohada  
y mirarás lo que quieras ver.  
Lleva siempre un frasquito del aire de la luna  
para cuando te ahogues,  
y dale la llave de la luna  
a los presos y a los desencantados.  
Para los condenados a muerte  
y para los condenados a vida  
no hay mejor estimulante que la luna  
en dosis precisas y controladas

**Jaime Sabines**

## DEDICATORIAS

A Yunuen del Río Díaz, por llegar a mi vida, llenarla de alegría y por darme la fuerza para avanzar y finalizar este trabajo. Darte la vida y formar parte de ella es lo más difícil y lo más maravilloso que me ha pasado y aunque aún eres pequeño algún día serás muy grande. Eres la luz de mi camino y el amor de mi vida.

A Uriel del Río Serrano, por su apoyo, paciencia y esfuerzo para finalizar este ciclo y comenzar otros nuevos. Por darme estabilidad en muchos aspectos, hacerme crecer como persona y por darme una familia y enseñarme a ser parte de ella. Te Amo.

A María Luisa Flores Marín, por ser uno de los pilares de mi educación, por sus consejos, por sus enseñanzas, por siempre cuidarme y preocuparse por mí, por siempre estar ahí cuando te necesité y aunque ya no estés físicamente dejaste mucho en cada una de las personas que pasaron por tu vida, sé que te hubiera encantado y estarías muy orgullosa de lo que he logrado. Siempre estás conmigo.

A Virginia Cortés Flores, por darme la vida, por su apoyo y paciencia. Por el esfuerzo tan grande que hizo por darme educación, por enseñarme, de libertad, sencillez, dignidad y justicia y por siempre estar ahí a pesar de la adversidad. Por ser un ejemplo de lucha constante, Madre Te Amo.

A Laura Verónica Cortés Flores, Patricia Cortés Flores y Diana Luisa Cortés Flores, por siempre apoyarme y preocuparse por mí, por enseñarme de amor de familia, de apoyo incondicional, perseverancia y esfuerzo. Porque llegar a donde están no fue fácil y son un ejemplo de vida, las admiro y respeto.

A Francisco Cortés Yañez, Octavio Cortés Flores y Oscar Cortés Flores, por enseñarme que se puede salir de la adversidad y seguir adelante.

A Manuel Díaz Flores, Sofía Guadalupe Díaz, José Manuel Díaz y Familia, porque aun con la distancia se aprende. Por enseñarme de orden y seriedad, porque llegar tan lejos y siempre ser un ejemplo para mí. Si estoy aquí también es gracias a ti

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Xochil Vega, por siempre confiar en mí, por su apoyo y dedicación, por siempre haberme dado las herramientas para realizar la tesis y por siempre estar ahí para ayudarme. Siempre estaré agradecida por su enseñanza no solo académica si no de la vida misma.

Al Dr. Antonio Verdugo, por permitirme y darme los medios para crecer en mi educación y como persona. Por sus regañíos y severidad, pero también por sus consejos y ayuda. Al final de este ciclo me doy cuenta que no soy la misma, gracias.

A la Dra. Adriana Méndez, por su apoyo, paciencia y profesionalismo en la realización de la microscopía electrónica para este trabajo.

Al Dr. Alfredo Castañeda, por sus consejos que siempre fueron muy certeros y me ayudaron a enlazar el conocimiento.

A Diana, Zulema y Aidé, por levantarme en los momentos agrios, por festejar los momentos dulces, por sus enseñanzas y por su apoyo incondicional.

A Gaby, Ilein y Miriam, por guiarme desde mi entrada al LMM, por sus consejos y enseñanzas.

A Nina, Julio, Luis, Rodrigo, Salvador, Talhía, Lázaro, Jonathan, Liliana y Laura, por su compañerismo y amistad, por sus enseñanzas y por hacer el ambiente del LMM ameno.

A la Dra. Fabiola por todo el apoyo que me ha brindado.

A todos los integrantes del departamento de Microbiología e Inmunología, sin duda esta tesis es fruto de trabajo en equipo.

A Nalle, Caro, Mon, Raul y Rodrigo por ser amigos, confidentes, por las risas, el llanto, por el apoyo y por siempre estar ahí.

A la familia Del Río Serrano por su apoyo, por cuidar y querer a Yunuen y por ayudar a terminar este ciclo.

A toda mi familia por su apoyo incondicional.

A todas aquellas personas que dejaron su granito de arena en mi vida y aportaron algo a esta tesis y a mi persona. Gracias

Este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Microbiología Molecular

Responsable: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

La Microscopía Electrónica de Trasmisión fue realizada en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Responsable: M.Cs. Adriana Méndez Bernal

# CONTENIDO

	<u>PÁGINA</u>
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS .....	2
1.2 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS .....	2
1.3 TIFOIDEA AVIAR (TA).....	3
1.4 PATOGENIA .....	6
1.5 MOTILIDAD .....	8
1.6 FLAGELO .....	9
1.7 BIOGÉNESIS FLAGELAR .....	10
1.8 REGULACIÓN GENÉTICA FLAGELAR .....	12
1.9 QUIMIOTAXIS .....	13
2. JUSTIFICACIÓN .....	17
3. HIPÓTESIS .....	18
4. OBJETIVO .....	19
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
6.1 CEPAS BACTERIANAS .....	21
6.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA ENSAYO DE MOTILIDAD .....	21
6.3 ENSAYO DE MOTILIDAD .....	22
6.4 EXTRACCIÓN DE ADN .....	22
6.5 ELECTROFORESIS CON GELES DE AGAROSA, PARA VISUALIZACIÓN DE ADN Y PRODUCTOS DE LA PCR. ....	24
6.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	25

6.7 DIGESTIÓN DEL PRODUCTO DE LA PCR.....	29
6.8 SECUENCIACIÓN.....	29
6.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1 ENSAYO DE MOTILIDAD.....	31
7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	50
7.3 DIGESTIÓN.....	53
7.4 SECUENCIACIÓN.....	55
7.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	58
8. DISCUSIÓN.....	64
9. CONCLUSIÓN.....	67
10. PROSPECTIVA.....	68
11. ANEXO DE MEDIOS Y REACTIVOS.....	69
12. REFERENCIAS.....	75

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<u>PÁGINA</u>
Figura 1. Mapa de la situación actual de la TA en México..	5
Figura 2. Mapa de la situación actual de la TA en México y el mundo.....	6
Figura 3. Biogénesis flagelar.....	11
Figura 4. Sistema quimiotáctico.....	15
Figura 5. Secuencia del gen <i>fliC</i> de <i>S. Typhimurium</i> LT2..	26
Figura 6. Crecimieto en medio GI adicionado con 0.5% de dextrosa en tubo a las 48 h a 37 °C. ....	32
Figura 7. Crecimiento en medio GI adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 37 °C.....	33



Figura 8. Crecimiento de <i>Salmonella</i> gallinarum FVB323 en diferentes medios en placa a las 48 h a 37 °C .....	34
Figura 9. Cultivo de bacterias controles en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 37 °C .....	35
Figura 10. Crecimiento de diferentes cepas de <i>Salmonella</i> gallinarum en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 37 °C .....	36
Figura 11. Crecimiento de diferentes cepas de <i>Salmonella</i> gallinarum y <i>Salmonella</i> pullorum en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 37 °C .....	37
Figura 12. Crecimiento de controles en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 42 °C .....	38
Figura 13. Crecimiento de diferentes cepas de <i>S. gallinarum</i> en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 42 °C .....	39
Figura 14. Crecimiento de diferentes cepas de <i>S. gallinarum</i> y <i>S. pullorum</i> en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 42 °C. ....	40
Figura 15. Determinación del diámetro de bacterias control en medio GI a 37 °C .....	42
Figura 16. Determinación del diámetro de cepas de <i>S. gallinarum</i> y <i>S. pullorum</i> en medio GI a 37 °C.....	43
Figura 17. Determinación del diámetro de bacterias controles en medio GI adicionado con dextrosa a 37 °C .....	44
Figura 18. Determinación del diámetro de cepas de <i>Salmonella</i> gallinarum y pullorum en medio GI adicionado con dextrosa a 37 °C .....	45
Figura 19. Determinación del diámetro de bacterias control en medio GI a 42 °C .....	46
Figura 20. Determinación del diámetro de cepas de <i>Salmonella</i> gallinarum y pullorum en medio GI a 42 °C .....	47
Figura 21. Determinación del diámetro bacterias control en medio GI adicionado con dextrosa a 42 °C .....	48
Figura 22. Determinación del diámetro de cepas de <i>Salmonella</i> gallinarum y pullorum en medio GI adicionado con dextrosa a 42 °C .....	49
Figura 23. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra el producto de la PCR para amplificar <i>fliC</i> .....	50

Figura 24. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra el producto de la PCR para amplificar <i>fliC</i> .....	51
Figura 25. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra el producto de la PCR para amplificar <i>fliC</i> .....	52
Figura 26. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra la digestión del producto de PCR <i>fliC</i> de <i>Salmonella</i> Typhimurium con las enzimas <i>EcoRV</i> y <i>KpnI</i> .....	53
Figura 27. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra la digestión del producto de la PCR <i>fliC</i> de <i>Salmonella</i> gallinarum ATCC9184 con las enzimas <i>EcoRV</i> y <i>KpnI</i> .....	54
Figura 28. Tinción negativa de <i>Salmonella</i> gallinarum FVB323.....	58
Figura 29. Tinción negativa de <i>Salmonella</i> gallinarum FVB323.....	59
Figura 30. Tinción negativa de <i>Salmonella</i> gallinarum ATCC9184.....	60
Figura 31. Tinción negativa de <i>Salmonella</i> gallinarum ATCC9184.....	61
Figura 32. Tinción negativa de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC49214.....	62
Figura 33. Tinción negativa de <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC49214.....	63
Tabla 1. Porcentajes de Identidad de <i>Salmonella</i> gallinarum ATCC9184 comparada con otras cepas.....	56
Tabla 2. Identidad.....	57

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico.
<b>AS</b>	Iniciador Antisentido
<b>GI</b>	Medio semisólido de infusión de corazón de buey con 0.3% de agar
<b>GI+D</b>	Medio semisólido de infusión de corazón de buey con 0.3% de agar, adicionado con 0.5% de dextrosa.
<b>NUT</b>	Medio nutritivo con 0.5% de agar.
<b>NUT+D</b>	Medio nutritivo con 0.5% de agar, adicionado con 0.5% de dextrosa.
<b>OIE</b>	Organizació Mundial de Sanidad Animal.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>S. gallinarum</b>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Gallinarum biovar. gallinarum.
<b>S. pullorum</b>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Gallinarum biovar. pullorum.
<b>S</b>	Medio semisólido de infusión de cerebro y corazón con 0.3% de agar
<b>S</b>	Iniciador Sentido
<b>S+D</b>	Medio semisólido de infusión de cerebro y corazón con 0.3% de agar, adicionado con 0.5% de dextrosa.
<b>SENASICA</b>	Servicio Nacional, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
<b>TA</b>	Tifoidea aviar.

## RESUMEN

Díaz Cortés Julia. “**Identificación de *fliC* y expresión de flagelo en *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Gallinarum biovariedad gallinarum**”. Bajo la supervisión del Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y la Dra. Delia Xochil Vega Manríquez.

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar. gallinarum es el agente causal de la Tifoidea Aviar, enfermedad que afecta a aves domésticas y silvestres; debido a la importancia que esta enfermedad tenía en México se implementó la Campaña Nacional contra la Salmonelosis aviar, la cual, contribuyó a que el país fuera declarado como libre en 2002; sin embargo, hasta el 2011 se presentaron algunos focos. Por otro lado durante muchos años se definió a *S. gallinarum* como una bacteria aflagelada y por lo tanto inmóvil. Existen estudios donde se demuestra que *S. pollurum* es capaz de expresar un filamento parecido al flagelo. Debido a que estas bacterias son casi idénticas, consideramos importante determinar si *S. gallinarum*, bajo condiciones diferentes de cultivo presenta dicha estructura, permitiendo ampliar el conocimiento básico sobre esta bacteria así como su participación en el proceso de invasión y patogénesis. En este trabajo se detectó la presencia de una estructura similar al flagelo en diferentes cepas de *S. gallinarum*, mediante su cultivo en medio GI, S y medio nutritivo, así como con microscopía electrónica y se identificó *fliC* por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En todas las cepas se logró ver el efecto de motilidad esperado en los medios utilizados y sólo con una cepa se observaron los filamentos por medio de microscopía electrónica. Se amplificó por PCR *fliC* en algunas de las cepas, posteriormente se secuenció y analizó, obteniendo porcentajes de identidad de 98% con *S. Typhimurium*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, en la actualidad con base en las características bioquímicas generales que presenta y pruebas de hibridación de ADN, se divide en 2 especies: *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez *S. enterica* se divide en seis subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* y *S. enterica* subsp. *indica*.<sup>9,1</sup>

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* presenta más de 2500 serotipos que, de acuerdo a la clasificación de Kauffmann-White, se encuentran agrupados en serogrupos debido a las características del antígeno "O" somático, asignándoles una letra mayúscula de la A a la Z, así como un número. En esta clasificación también se incluye al antígeno "Vi" capsular y "H" flagelar (fase H1 y fase H2). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar. gallinarum pertenece al serogrupo D con antígeno O:1,9,12 y con antígenos Vi y H ausentes.<sup>1</sup>

### 1.1 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Las bacterias del género *Salmonella* se caracterizan por ser bacilos cortos Gram negativos, son aerobios o anaerobios facultativos, algunos presentan cápsula, no forman esporas y generalmente son móviles por la presencia de flagelos peritricos. La serovariedad Gallinarum mide aproximadamente 4 µm de largo y 1.5 µm de diámetro y se considera inmóvil.<sup>2,5,6</sup>

### 1.2 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS

Estos microorganismos no fermentan la lactosa a excepción de *S. enterica* subespecie *arizonae* y *S. entérica* subespecie *diarizonae*; fermentan glucosa

con producción de gas excepto *S. Typhi* y *S. gallinarum*; no producen indol; no degradan urea y decarboxilan lisina y ornitina.<sup>5,6,7</sup> *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar. gallinarum fermenta glucosa sin producción de gas, es dulcitol y maltosa positivo y ornitina negativo, a diferencia de *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar. pullorum.<sup>3,4</sup>

### 1.3 TIFOIDEA AVIAR (TA)

El agente causal de la TA es *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar. gallinarum. Esta enfermedad afecta a aves domésticas, principalmente pollos, pavos, faisanes y aves silvestres, las cuales funcionan como reservorios naturales. Causa alta mortalidad en las primeras 2 semanas de vida en pollo de engorda y las gallinas productoras de huevo pueden permanecer como portadoras. Se transmite principalmente por vía horizontal, mediante la ingesta de heces infectadas por pollos sanos o canibalismo, aunque también se presenta la vía vertical o transovárica, a través de huevos puestos por gallinas infectadas. Los pollitos eclosionados a partir de huevos infectados, actúan como vectores y multiplicadores de la enfermedad, contribuyendo a que la enfermedad se difunda en los distintos lotes de la planta de incubación y posteriormente también entre diversos establecimientos avícolas que comercializan a estas aves.<sup>5,6,7</sup>

Esta enfermedad afecta principalmente hígado, bazo, corazón, pulmón, órganos reproductores y aparato digestivo; estos suelen estar aumentados de tamaño, congestión o presentar nódulos. Las aves enfermas manifiestan depresión, anorexia, disnea, deshidratación y diarrea.<sup>5,6,7</sup>

Debido a la importancia de la tifoidea aviar en México se implementó la Campaña Nacional contra la Salmonelosis aviar, regida bajo la NOM-005-ZOO-1993, que entró en vigor a partir del 25 de marzo de 1980 hasta la fecha. Dicha campaña ha contribuido a contrarrestar de una mejor manera los casos de tifoidea aviar; sin embargo siguen presentes, causando pérdidas económicas significativas en la avicultura nacional y mundial.<sup>8</sup>

*S. gallinarum* se ha aislado tanto de humanos como de aves. De acuerdo a los reportes anuales de los Centros para el Control y la Prevención de enfermedades (CDC) en el periodo de 1992-2002, se aislaron 9 casos en humanos y 5 casos de gallinas y para el periodo de 1996-2006, se aislaron 13 casos en humanos, 5 casos en gallinas y 3 casos en aves silvestres en Estados Unidos de América.<sup>9,10</sup>

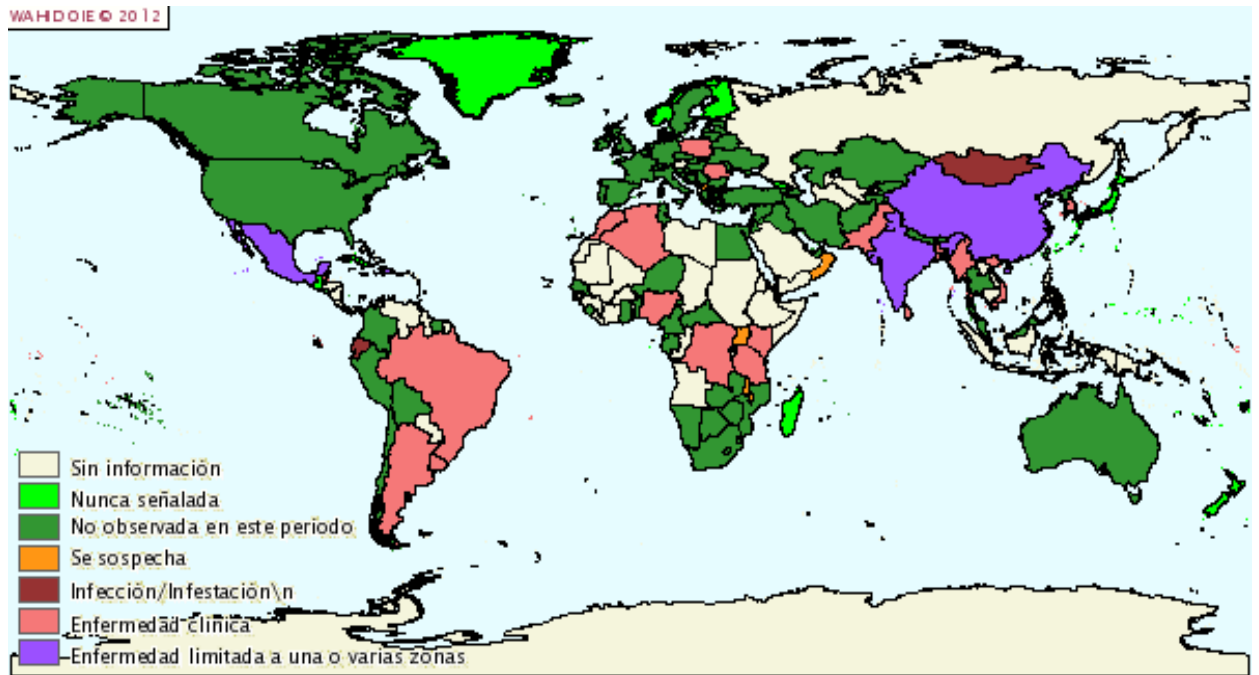
En cuanto a la situación epidemiológica de la TA en México entre los años 1998 y 2001, no se presentaron reportes de focos, sin embargo, en 2002 se detectaron 4 focos y a partir de entonces se han continuado detectando,<sup>11,12,13</sup> siendo los focos más recientes en el año 2011 en los estados de Hidalgo y Coahuila. A pesar de esto desde el 17 de mayo de 2002 y hasta el momento, México es reportado como libre de TA según el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SENASICA (**Figura 1**), en contraste con la Organización Mundial de Sanidad Animal, por sus siglas en inglés OIE (**Figura 2**), quien encuentra a la enfermedad limitada a una o varias zonas de nuestro país.



**Figura 1. Mapa de la situación actual de la TA en México.** En la actualidad, de acuerdo a los informes del SENASICA, México se encuentra libre de TA.

<http://www.senasica.gob.mx>





**Figura 2. Mapa de la situación actual de la TA en México y el mundo.** De acuerdo con la OIE para el Periodo julio-diciembre de 2012 la TA se encuentra mundialmente distribuida, en México se presenta la enfermedad limitada a una o varias zonas.

[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap)

## 1.4 PATOGENIA

*Salmonella* es capaz de comportarse como patógeno intracelular facultativo lo que le va a permitir desarrollar una patogenia muy particular. La vía de entrada principal que utiliza para infectar es la fecal-oral, siendo la dosis infectante necesaria de  $10^3$  a  $10^8$  células.<sup>14,18</sup>

La primera barrera a la cual *Salmonella* es capaz de sobrevivir es a los ácidos presentes en el estómago en el caso de mamíferos y en el proventrículo o estómago glandular en el caso de aves, así como las secreciones biliares. La bacteria se transporta a los sitios óptimos de colonización principalmente en el

tejido linfóide del intestino, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves. Se adhiere a la superficie de la célula hospedadora como son los enterocitos, células M o matriz extracelular por medio de adhesinas fimbriales como son fimbria o fimbriilla, o afimbriales como el flagelo, lipopolisacárido o cápsula.<sup>18</sup> Al darse el contacto de la bacteria con la célula hospedera se induce la activación de un Sistema de Secreción Tipo III, codificado en la isla de patogenicidad 1, formado por 4 anillos que interactúan con la membrana interna, externa y el peptidoglicano de la bacteria, este sistema se encarga de exportar proteínas efectoras que inducen que *Salmonella* se interne, apoptosis de macrófagos activados y actúan como toxinas destruyendo células M, permitiendo así la invasión de enterocitos adyacentes tanto por la cara apical como por la basolateral. Una vez adherida *Salmonella* se interna mediante un evento llamado disparo, se activan proteínas específicas, entre las que se puede mencionar a SipA, una proteína de unión a actina, que inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina.<sup>18</sup> SopE y SopE2 activan a otras proteínas celulares como las denominadas Rho GTPasas, RAC1 y CDC42,<sup>15</sup> y SopB, que hidroliza fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, un inhibidor de la secreción de cloruro de calcio; estas proteínas provocan el rearrreglo del citoesqueleto con la subsecuente formación de ondulaciones en la superficie del enterocito.<sup>16</sup> Una vez que la bacteria ingresa, la superficie celular vuelve a la normalidad gracias a SptP, proteína activadora de GTPasa (GAP), la cual, además de su actividad GAP situada en su extremo amino-terminal, el dominio carboxi-terminal de SptP posee actividad tirosina fosfatasa potente.<sup>17</sup> Posterior a la invasión, las células de la mucosa producen citoquinas proinflamatorias como IL8.<sup>20</sup> La respuesta inflamatoria media la liberación de prostaglandina,

estimula la producción de AMP cíclico y la secreción activa de líquidos, en conjunto con el aumento de calcio que estimula la secreción de cloro y agua, provocando así diarrea en el hospedador. Dentro de la célula hospedera se activa un segundo Sistema de Secreción Tipo III, codificado en la isla de patogenicidad 2, el cual exporta proteínas que le permiten sobrevivir al interior de macrófagos, siendo estos su transporte por vía hemática, lo cual le permite migrar principalmente a nódulos linfáticos adyacentes, hígado, bazo y sistema reproductor.<sup>18,19,20,21</sup>

## 1.5 MOTILIDAD

Como parte de su patogenia las bacterias van a desarrollar y emplear diferentes mecanismos para colonizar y sobrevivir dentro del hospedero. En la búsqueda de nutrimentos para su supervivencia, las bacterias han destinado diversos mecanismos adaptativos entre los que se encuentra la motilidad. Este mecanismo les confiere mayor eficiencia en la adquisición de nutrientes, evitar sustancias tóxicas, establecer relaciones simbióticas, así como poder alcanzar los sitios óptimos de colonización en el caso de bacterias patógenas.<sup>22</sup>

Algunas de las serovariedades de *S. enterica* subsp. *enterica* son móviles como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, en contraste con *S. enterica* subsp. *enterica* ser. *Gallinarum* biovar. *gallinarum* y *S. enterica* subsp. *enterica* ser. *Gallinarum* biovar. *Pullorum* que son consideradas inmóviles.<sup>1</sup> Sin embargo, Kilger y Grimont en 1992 realizaron un estudio en *S. Gallinarum*-*Pullorum* donde amplificaron por medio de la técnica de PCR un producto del gen flagelar *fliC* que corresponde a la fase 1 del flagelo y además sugieren que éste codifica para los antígenos g y m de la fase 1, en estas serovariedades consideradas inmóviles.<sup>23</sup> Li J et. al., en 1993, identificaron, a través de *Southern blot* y

secuenciaron el gen completo de *fliC* en *S. gallinarum* y *S. pullorum*.<sup>24</sup> Así mismo, Holt y Chaubal en 1997, observaron en medios de cultivo especiales y micrografía electrónica el desarrollo de filamentos fibrosos parecidos a flagelos en *S. pullorum* y mediante aglutinación determinaron la pertenencia de esta bacteria al serogrupo D de la clasificación de Kuffman-White.<sup>25</sup>

## 1.6 FLAGELO

El flagelo es la estructura encargada de la motilidad bacteriana y es un largo filamento helicoidal, el cual es impulsado por un motor rotatorio embebido en la envoltura celular. La estructura básica del flagelo consta de 3 porciones: en primer lugar, extracelularmente se encuentra el filamento que es un homopolímero constituido por miles de subunidades de la proteína denominada FliC o flagelina. Es clínicamente importante debido a su potencia y variabilidad antigénica. Posterior al filamento se inserta el gancho, esta estructura, conecta el filamento con el motor celular, es flexible, con localización extracelular y es un homopolímero de entre 120 y 130 copias de la proteína denominada FlgE. Por último el cuerpo basal es un complejo multiproteico embebido en la superficie celular, en el que se localiza el motor flagelar, consiste de un eje central y 4 complejos en forma de anillos.<sup>22</sup>

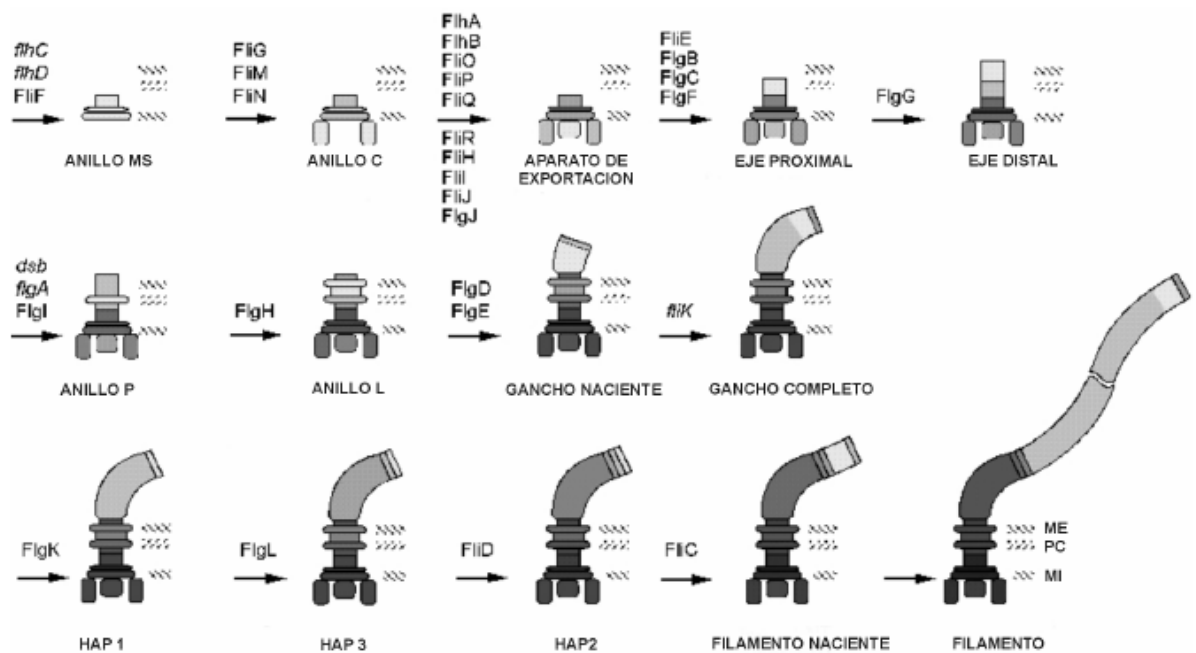
La flagelina es la proteína estructural del flagelo y es capaz de inducir inflamación e inhibir apoptosis en el epitelio intestinal, pero en el caso de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* que se consideran no flagelados, estas no inducen inflamación a partir de receptores tipo toll.<sup>26,27</sup>

## 1.7 BIOGÉNESIS FLAGELAR

El ensamblaje del flagelo procede en una secuencia lineal del extremo proximal al distal, llevándose a cabo por la adición de monómeros y no de estructuras preformadas.<sup>22</sup>

En la formación del flagelo (**Figura 3**) la estructura más temprana es el anillo MS, el cual se inserta en la membrana citoplasmática y está constituido por la proteína FliF, esta marca el inicio de la biosíntesis flagelar y forma el núcleo sobre el que se acoplarán los demás elementos. El siguiente paso es la inserción de la maquinaria de exportación que trabaja a través de un Sistema de Secreción Tipo III, constituido por seis proteínas membranales: FlhA, FlhB, FliQ, FliO, FliP y FliR, así como de varios componentes solubles FliI, FliH, la chaperona general FliJ y las chaperonas específicas FlgN, FliS y FliT. FliI es la ATPasa que proporciona la energía para la exportación de los sustratos y funciona en conjunto con FliH, esta regula negativamente la actividad hidrolítica de FliI. La siguiente estructura en formarse es el anillo C o citoplasmático, formado por el complejo del conmutador integrado por FliG, FliM y FliN, siendo responsables del cambio en la rotación flagelar y en el caso de FliG ayuda a la generación de la fuerza de rotación, responsable de la conversión de la fuerza motriz protónica en fuerzas para el movimiento de rotación del flagelo, interaccionando con el anillo MS y MotA; mientras que FliM y FliN son responsables de conmutar el movimiento en uno y otro sentido. Posteriormente se incorpora el eje que es el primer componente externo a la membrana citoplasmática, siendo FlgB, FlgC y FlgF las que forman el eje proximal y FlgG la que forma el eje distal o flecha conductora. La proteína FlgJ tiene actividad de muramidasa encargada de hidrolizar la capa de peptidoglicano permitiendo

así la formación del eje. A continuación se ensambla FlgI con ayuda de FlgA formando el anillo P en el peptidoglicano y FlgH que forma al anillo L en el lipopolisacárido. Estos dos anillos generan un hueco en la membrana por el que pasarán, FlgD que se adiciona al extremo distal del eje, en donde se ensamblara el gancho formado por FlgE. Las proteínas FlgH y FlgI a diferencia de las demás proteínas flagelares que atraviesan la membrana citoplasmática, se exportan a través del sistema general de secreción en el que participan las proteínas Sec. El gancho se elonga hasta un tamaño determinado, siendo la proteína FlhK la encargada de regular la longitud de este polímero.<sup>19,22,28,29</sup>



**Figura 3. Biogénesis flagelar.** Su formación inicia con la formación del anillo MS y concluye con la adición de subunidades de flagelina. En cada etapa se encuentran señaladas las proteínas necesarias. Tomado de Gonzáles PB, Dreyfus G, 2003.

Por último, se exportan las proteínas accesorias de unión (HAPs): HAP1 o FlgK la cual reemplaza a FlgD, HAP2 o FliD que acompaña el ensamblaje de las

subunidades de flagelina en la parte distal del filamento, sin esta proteína las subunidades no polimerizan, si no que se liberan en forma soluble al medio extracelular y HAP3 o FlgL que se une a la flagelina en la parte proximal del filamento. Una vez completo el flagelo se incorporan de forma tardía las proteínas Mot las cuales ayudan a la rotación del motor, MotA y MotB rodean al anillo MS y generan un canal de protones de hidrógeno, que permite el acoplamiento entre el gradiente electroquímico y la rotación.<sup>19,22,28,29</sup>

## 1.8 REGULACIÓN GENÉTICA FLAGELAR

Existen más de 50 genes que participan en los diferentes procesos de ensamblaje, estructura, regulación, rotación flagelar y movimiento siendo ésta la recepción y traducción sensorial. Estos genes se encuentran organizados en operones que forman un sistema coordinado de expresión, denominado regulón, en el que la jerarquía transcripcional se representa en 3 clases.

Clase 1: contiene al operón maestro *flhC-flhD*, constituye el extremo superior de la jerarquía reguladora, es el responsable de la expresión de todos los genes flagelares. Los productos de los dos genes de este operón forman un complejo heteromultimérico que funciona como activador transcripcional, dirigiendo la transcripción de los promotores de los genes de la clase 2 a través de un mecanismo dependiente del factor  $\sigma^{70}$ . La expresión de los genes clase 1 está regulada por señales globales como temperatura, grado de superenrollamiento del ADN, fosfolípidos, el producto génico OmpR que actúa al presentarse cambios en la osmolaridad, DnaJ, K, GrpE que responden al choque térmico, la división celular, así como por represión catabólica a través de los niveles de cAMP. Por ejemplo, si la concentración de glucosa es alta, disminuyen los niveles de cAMP por lo que el operón maestro no se expresa.

Clase 2: contiene a los genes que codifican para las proteínas que forman el gancho y el cuerpo basal, además de dos genes reguladores *fliA* y *flgM*. El gen *fliA* codifica para un factor de transcripción alternativo,  $\sigma^{28}$ , el cual dirige la transcripción de los genes de la clase 3; mientras que el gen *flgM* codifica para un factor anti-sigma evitando así la transcripción de la clase 3 hasta que se completa la formación del gancho.

Clase 3: contiene a los genes que codifican para las proteínas tardías que se requieren para la formación del filamento, así como para las proteínas involucradas en la quimiotaxis y aquellas necesarias para la rotación del motor. Dentro de esta clase existen operones cuya expresión depende tanto del operón maestro como del factor sigma FliA y otros que requieren únicamente de  $\sigma^{28}$  como la flagelina.<sup>22, 30, 31</sup>

## 1.9 QUIMIOTAXIS

La quimiotaxis es el proceso mediante el cual las células migran a través de gradientes de concentración de sustancias químicas atrayentes o repelentes.

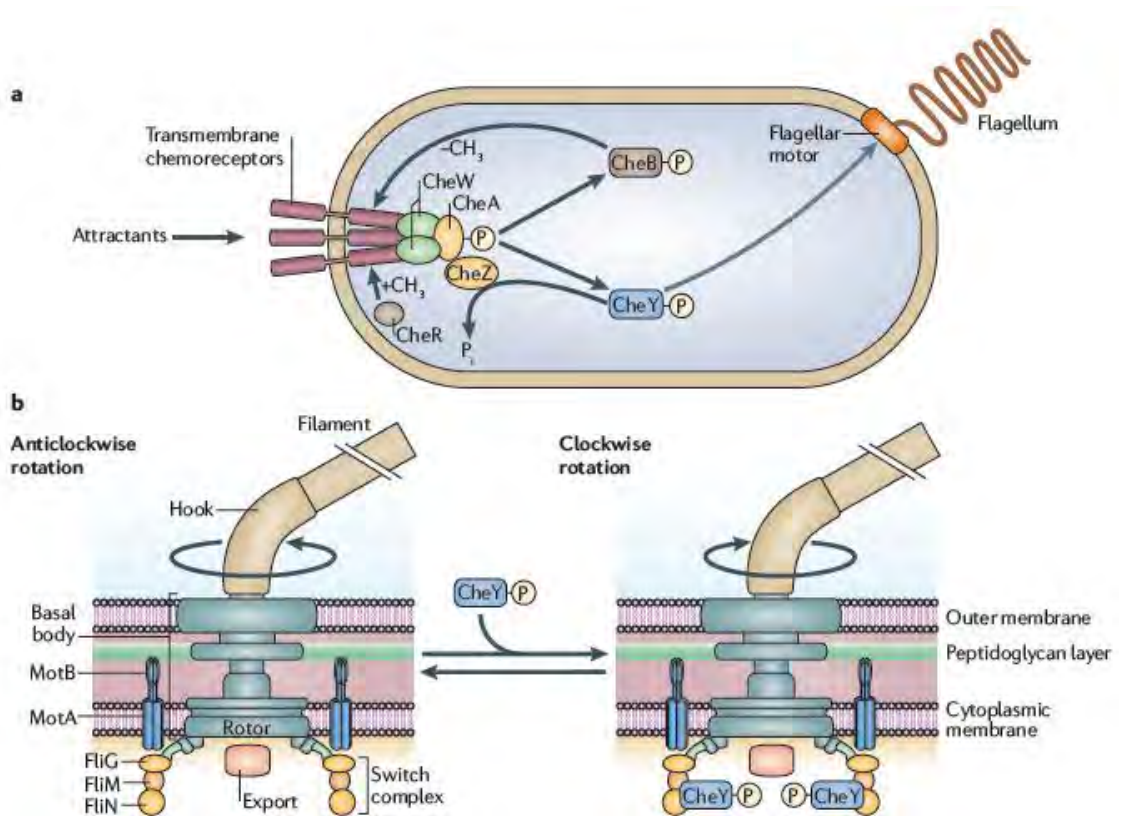
El flagelo es una hélice izquierda, cuando los filamentos rotan en contra de las manecillas del reloj (CCW), éstos se ordenan en una trenza unitaria y se genera fuerza de propulsión; sin embargo, si los filamentos rotan en sentido de las manecillas del reloj (CW), la trenza se deshace presentando movimientos al azar en los que se reorienta sin que exista desplazamiento.<sup>22,28</sup>

El movimiento bacteriano responde a diversos estímulos ambientales como luz, oxígeno, pH, temperatura, presión, osmolaridad y a la presencia de diferentes compuestos químicos.<sup>33</sup>

Los estímulos ambientales son detectados por receptores que son homodímeros que presentan un dominio sensorial o ligando periplásmico y un



dominio de señalización y adaptación citoplásmico, unidos a través de 4  $\alpha$  hélices transmembranales. Uno de los quimiorreceptores más estudiado en *Salmonella* es el denominado Tar que responde a uno de los atrayentes más poderosos, el L-aspartato, pero también funciona como receptor secundario para maltosa y para los repelentes inorgánicos cobalto y níquel. Estos receptores se regulan a través de reacciones de metilación por lo que se les denomina proteínas MCP (proteínas que aceptan grupos metilo). El sistema quimiotáctico (**Figura 4**), está compuesto por un receptor transmembranal MCP, el adaptador CheW que acopla a CheA con el dominio citoplasmático del MCP, el sistema de dos componentes CheA/CheY, el motor flagelar que es capaz de cambiar el sentido de giro, CheR/CheB, encargados de modificar la actividad de CheA mediante la metilación del receptor y Che Z.



**Figura 4. Sistema quimiotáctico.** a) Moléculas que participan en el proceso quimiotáctico. b) Cambio en la rotación flagelar. Tomado de Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP, 2011

Se utilizará como ejemplo un MCP Tar para explicar el proceso de quimiotaxis en *Salmonella*. Al disminuir o no estar presente el atrayente/repelente, en este caso aspartato se libera del receptor, se forma el complejo MCP-CheA-CheW, esto promueve la autofosforilación de CheA, quien a su vez fosforila a CheY en un residuo aspartato y a CheB la cual actúa como metilsterasa, removiendo grupos metilo desde los residuos de glutamato en el lado intracelular del receptor, al mismo tiempo que establece el estado de señalización del complejo MCP-CheA-CheW. CheY-P sufre un cambio conformacional que le permite interactuar con FliM induciendo un cambio en la dirección de rotación del flagelo a CW.

Por el contrario al aumentar la concentración del aspartato, éste se une al ligando del MCP, lo cual permite que CheR, metiltransferasa metile al receptor, a la vez que regula la capacidad del receptor para alterar la autofosforilación de CheA y altera significativamente la afinidad de las moléculas de señal para el complejo MCP-CheA-CheW. La fosfatasa CheZ cataliza la desfosforilación espontánea de CheY dándose un cambio en la rotación del flagelo a CCW.

22,28,32,33

Se desconoce gran parte de los mecanismos internos que permiten la modulación de la actividad flagelar; sin embargo, desempeña un papel importante dentro de la patogenicidad de *Salmonella*, es por esto que es fundamental el estudio de su función, biogénesis, regulación y quimiotaxis.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Durante muchos años se ha descrito que *S. gallinarum* no expresa flagelo y por lo tanto es clasificada como inmóvil; sin embargo, existen estudios donde se demuestra que *S. pollurum* es capaz de expresar un filamento parecido al flagelo. Conociendo que estas bacterias están íntimamente ligadas, es de importancia determinar si *S. gallinarum* bajo condiciones diferentes de cultivo presenta dicha estructura. Esta información permitiría ampliar el conocimiento básico sobre esta bacteria así como del proceso de invasión y patogénesis.

### 3. HIPÓTESIS

Cuando se utilizan medios semisólidos y se incrementa la concentración de glucosa, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar. gallinarum es capaz de expresar flagelo.

#### 4. OBJETIVO

- Determinar la presencia de flagelo en *Salmonella gallinarum* al ser cultivada en medios específicos para su expresión, observarla con microscopía electrónica y amplificar *fliC* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, para generar mayor conocimiento de la estructura del microorganismo.

## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificar el crecimiento de *Salmonella* gallinarum en medios especiales para motilidad, GI, S y medio nutritivo 0.5% de agar solos y adicionados con dextrosa.
- II. Amplificar el gen *fliC* de *Salmonella* gallinarum por medio de la técnica de la PCR.
- III. Identificar la presencia de una estructura similar al flagelo mediante microscopia electrónica de transmisión.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- *Escherichia coli*, American Type Culture Collection ( ATCC) 1946
- *Salmonella* Typhimurium cepa de campo
- *Salmonella* gallinarum, ATCC9184, FVB323, FVB347, FVB383, FVB47, FVB41 y SC.
- *Salmonella* pullorum, ATCC10398 y SP
- *Salmonella* Enteritidis, ATCC49214
- *Salmonella* Enteritidis, cepa de campo
- *Staphylococcus aureus*, productor de beta toxina.

Todas las cepas antes mencionadas fueron conservadas sembrándose por picadura en tubos con 7 ml de Agar A (**Anexo de Medios y Reactivos**) y fueron mantenidas a temperatura ambiente durante todo el estudio, haciendo resiembra de todo el cepario cada 6 meses.

### 6.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA ENSAYO DE MOTILIDAD

Se prepararon placas y tubos con los siguientes medios especiales para motilidad: medio semisólido de infusión de corazón de buey con 0.3% de agar (Motility GI Medium, Difco, 38800, Francia) solo y adicionado con 0.5% de dextrosa; medio semisólido de infusión de cerebro y corazón con 0.3% de agar (Motility Medium S, Difco, 38800, Francia) solo y adicionado con 0.5% de



dextrosa; medio nutritivo con 0.5% de agar (Nutrient broth, Merck, 64271, Alemania) solo y adicionado con 0.5% de dextrosa.

### 6.3 ENSAYO DE MOTILIDAD

A partir de los tubos con agar A se sembró por aislamiento en cultivo puro cada cepa, en placas con agar A y se incubaron a 37 °C por 24 h, después se sembraron de 1 a 3 colonias de cada cepa en cada uno de los medios antes mencionados (GI, S, medio nutritivo solos y adicionados con 0.5% de dextrosa) preparados en tubo y placa. La siembra en tubos se realizó por picadura; y en placa, por picadura y estría única. Cabe mencionar que se utilizó una placa por medio y por cepa. Los ensayos se realizaron a 37 °C haciendo la toma de fotografías a las 24, 48 y 72 h.

Posteriormente al determinar el medio (tubos o placas con medio GI, S o medio nutritivo solos y adicionados con 0.5% de dextrosa) y forma de siembra óptimos (picadura o estría única), se sembraron todas las cepas en el medio elegido solo y adicionado con 0.5% de dextrosa a 37 y 42 °C haciendo medición del diámetro de los halos de crecimiento y toma de fotografías a las 24, 48 y 72 h.

### 6.4 EXTRACCIÓN DE ADN

A partir de los tubos con las bacterias conservadas se sembraron todas las cepas en 5 ml de caldo A (**Anexo de Medios y Reactivos**) y se incubaron a 37 °C.

A partir del cultivo de 5 ml se realizó la extracción de ADN de la siguiente manera:

1. Se centrifugó la muestra 10 min a 4000 rpm y posteriormente se eliminó el sobrenadante.
2. Posteriormente se añadieron 550 µl de solución de lisis y se mezcló con agitador eléctrico (Super Mixer, Lab-Line, USA). hasta deshacer la pastilla.
3. Se agregaron 250 µl de acetato de amonio 7.4 M, se mezcló volteando el tubo e incubó 10 min en hielo.
4. Se agregaron 500 µl de Fenol- Cloroformo- Alcohol Isoamilico (Ultrapure Phenol, Invitrogen, 92008, USA. Cloroformo, JT Baker, 55320, México. Isoamylalkohol, Merck, 64271, Alemania), en una relación 25:24:1 y se mezcló 5 minutos en agitador eléctrico.
5. Se centrifugó 5 min a 12 000 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro tubo.
6. Al sobrenadante se le agregaron 500 µl de Cloroformo- Alcohol Isoamilico, en una relación 24:1 y se mezcló 5 minutos en agitador eléctrico.
7. Se centrifugó 5 min a 12 000 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro tubo.
8. Se repitieron el 6º y 7º paso 2 veces para obtener el DNA limpio.
9. Se añadió al sobrenadante recuperado 0.7 volúmenes de Isopropanol y se mezcló suavemente. Se dejó en hielo durante 1 h.
10. Se centrifugó 10 min a 12 000 rpm y se eliminó el isopropanol por decantación.
11. Después se lavó la pastilla con 1 ml de etanol 70% (Alcohol etílico, JT Baker, 55320, México) y se centrifugó 10 min a 12 000 rpm. El etanol fue

eliminado por decantación, este paso se repitió 2 veces más, para dejar secar la pastilla toda la noche.

12. Por último se suspendió la pastilla con 20 µl de TE y se incubó el ADN 1 h a 65 °C en baño María para relajarlo y se realizó la cuantificación en espectrofotómetro (ND 1000 Spectrophotometer, Nano Drop, USA) para su posterior dilución.

## 6.5 ELECTROFORESIS CON GELES DE AGAROSA, PARA VISUALIZACIÓN DE ADN Y PRODUCTOS DE LA PCR.

1. Se preparó una solución de agarosa al 1% (Ultrapure TM Agarose, Invitrogen, 92008, USA) para ADN y al 2% para los productos de la PCR en TAE 1X.
2. Después se colocó el gel en la cámara de electroforesis, agregando amortiguador TAE 1X, hasta cubrir completamente el gel y se retiró el peine.
3. Las muestras fueron preparadas mezclando cada muestra con amortiguador de carga 1x en una relación 1:1 (3 µL de muestra y 3 µL de amortiguador de carga) en el caso de ADN y 2:1(10 µL de muestra y 5 µL de amortiguador de carga) en el caso de productos de la PCR.
4. Después de colocar todas las muestras preparadas se procedió a agregar el marcador de peso molecular, que para ADN fue Lambda HindIII y para productos de PCR 1 Kb.
5. Se dejaron correr los geles a 80 volts (Model 200/2.0 Power Supply, Bio-Rad, USA) durante 40 minutos para productos de la PCR y 50 min para ADN.

6. Se tiñó el gel sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio durante 15 min.

Los geles fueron observados y se les tomó fotografía en un fotodocumentador (Gel Documentation System Mini Lumi, Bio-Imaging, USA) con lámpara de luz UV.

## 6.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se realizó la PCR a partir del ADN de todas las cepas, utilizando los iniciadores reportados por Kilger y Grimont en 1993, que amplifica el gen *fliC* que mide 1500 pb (**Figura 5**)

Sentido: AAGGAAAAGATCATGGCA

Antisentido: TTAACGCAGTAAAGAGAG

GCAAAGTTTAAATGATAATTTTGCAAAAATAATGCGCGGAATAATGATGCATAAAGCGGCT  
 ATTTGCGCCGCTAAGAAAAAGATCGGGGAAGTGAAAAATTTTCTAAAGTTCGAAATCA  
 GGTGCCGATACAAGGGTTACGGTGAGAAACCGTGGGCAACAGCCCAATAACATCAAGTTG  
 TAATTGATAAGGAAAAGATC . ATGGCA CAAGTCATTAATACAAACAGCCTGTCGCTGTTGA  
 CCCAGAATAACCTGAACAAATCCAGTCCGCTCTGGGCACCGCTATCGAGCGTCTGTCTT  
 CCGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGGTCAGGCGATTGCTAACCGTT  
 TTACCGCGAACATCAAAGGTCTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGTATCTCCA  
 TTGCGCAGACCACTGAAGGCGCGCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTG  
 AACTGGCGGTTCAAGTCTGCTAACAGCACCAACTCCAGTCTGACCTCGACTCCATCCAGG  
 CTGAAATCACCCAGCGCCTGAACGAAATCGACCGTGTATCCGGCCAGACTCAGTTCAACG  
 GCGTGAAAGTCCCTGGCGCAGGACAACACCCCTGACCATCCAGGTTGGTGCCAACGACGGTG  
 AACTATCGATATCGATCTGAAGCAGATCAACTCTCAGACCCCTGGGTCTGGATACGCTGA  
 ATGTGCAACAAAAATATAAGGTCAGCGATACGGCTGCAACTGTTACAGGATATGCCGATA  
 CTACGATTGCTTTAGACAATAGTACTTTTTAAAGCCTCGGCTACTGGTCTTGGTGGTACTG  
 ACCAGAAAATTGATGGCGATTTAAAATTTGATGATACGACTGGAAAATATTACGCCAAAG  
 TTACCGTTACGGGGGGAACGGTAAAGATGGCTATTATGAAGTTTCCGTTGATAAGACGA  
 ACGGTGAGGTGACTCTTGCTGGCGGTGCGACTTCCCCGCTTACAGGTGGACTACCTGCGA  
 CAGCAACTGAGGATGTGAAAAATGTACAAGTTGCAAATGCTGATTTGACAGAGGCTAAAG  
 CCGCATTGACAGCAGCAGGTGTTACCGGCACAGCATCTGTTGTTAAGATGTCTTATACTG  
 ATAATAACGGTAAAACCTATTGATGGTGGTTTAGCAGTTAAGGTAGGCGATGATTACTATT  
 CTGCAACTCAAATAAAGATGGTTCATAAGTATTAATACTACGAAATACACTGCAGATG  
 ACGGTACATCCAAAACCTGCACTAAACAAAACCTGGGTGGCGCAGACGGCAAACCGAAGTTG  
 TTTCTATTGGTGGTAAAACCTTACGCTGCAAGTAAAGCCGAAGTCAAACTTTAAAGCAC  
 AGCCTGATCTGGCGGAAGCGGCTGCTACAACCACCGAAAACCCGCTGCAGAAAATTGATG  
 CTGCTTTGGCACAGGTTGACACGTTACGTTCTGACCTGGGTGCGGTACAGAACCGTTTCA  
 ACTCCGCTATTACCAACCTGGGCAACACCGTAAACAACCTGACTTCTGCCCGTAGCCGTA  
 TCGAAGATTCCGACTACGCGACCGAAGTTTCCAACATGTCTCGCGCGCAGATTCTGCAGC  
 AGGCCGGTACCTCCGTTCTGGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAACGTCCTCTCTTTAC  
 TGCCTTAA

**Figura 5. Secuencia del gen *fliC* de *S. Typhimurium* LT2.** En color rojo se muestra la secuencia de los iniciadores, el de arriba corresponde al iniciador sentido y el de abajo al antisentido. Las bases que se encuentran del iniciador sentido hasta el antisentido corresponden al fragmento de 1500 pb, este se compone de 1488 pb correspondientes al gen *fliC* más 12 bases de otro gen (*fliB*) corriente abajo.

Se estandarizó la PRC para una reacción de 50  $\mu$ L:

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua	_____	25.5 $\mu$ L
Buffer	10 x	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	4 Mm	4 $\mu$ L
Taq Polimerasa	0.05 U/ $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
dNTP	0.4 mM	2
Inciador sentido	0.5 $\mu$ M	2.5 $\mu$ L
Inciador antisentido	0.5 $\mu$ M	2.5 $\mu$ L
DNA	2 -3 ng/ $\mu$ L	6 $\mu$ L

La PCR se realizó en un termociclador (Select Cyclor, Select Bio Products, USA) con las siguientes condiciones:

<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Desnaturalización inicial</b></li></ul> <p><b>5 min 94 °C</b></p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• 30 ciclos</li></ul> <p>a) Desnaturalización</p> <p>1 min 94 °C</p> <p>b) Alineación</p> <p>1 min 50 °C</p> <p>c) Extensión</p> <p>2 min 72 °C</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Extensión final</li></ul> <p>7 min</p>

## 6.7 DIGESTIÓN DEL PRODUCTO DE LA PCR

Para verificar el fragmento *fliC* de la PCR se realizó la digestión con las enzimas *EcoRV* y *KpnI* por separado, en *S. Typhimurium* y *S. gallinarum* ATCC9184. Para este gen, con *EcoRV* se obtienen 2 fragmentos uno de 1017 pb y otro de 483 pb y con *KpnI* se obtienen dos fragmentos uno de 1442 pb y otro de 750 pb. Se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  (66.9 ng/ $\mu\text{l}$ ) del producto 9  $\mu\text{L}$  de buffer (buffer 2 para *EcoRV* y 4 para *KpnI*) y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima correspondiente a una concentración de 600 a 700 ng/ $\mu\text{L}$ , se incubó 1:30 h a 37°C y se inactivó la enzima en hielo por 30 min. Se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1% en el que se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la digestión con 5  $\mu\text{L}$  de buffer de corrida y 2  $\mu\text{L}$  de marcador 1 Kb, 40 min a 80 volts. Para la tinción de los geles se utilizó una solución de bromuro de etidio durante 15 min y se visualizó en un fotodocumentador con luz UV.

## 6.8 SECUENCIACIÓN

El producto obtenido *fliC* de *S. gallinarum* ATCC 9184 fue purificado mediante columnas con QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen, USA), de la marca Qiagen y enviado al Instituto de Fisiología Celular, UNAM para ser secuenciado.

Mediante los programas DNAMAN®, VECTOR® y BLAST® se obtuvieron los porcentajes de identidad de las secuencias del producto obtenido *fliC* de *S. gallinarum* ATCC 9184 con las secuencias de *fliC*, de *E. coli* str. K-12 substr. M61655 (NCBI Reference Sequence: NC\_000913.2, 1497 pb), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis str. SGSC2475 (GenBank:



AY649709.1, 1518 pb), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 (NCBI Reference Sequence: NC\_003197.1, 1488 pb), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum str. 287/91 secuencia completa (GenBank: AM933173.1, 1518 pb), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum str. ST16 secuencia incompleta (GenBank: DQ838253.1, 1272 pb).<sup>34</sup>

## 6.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

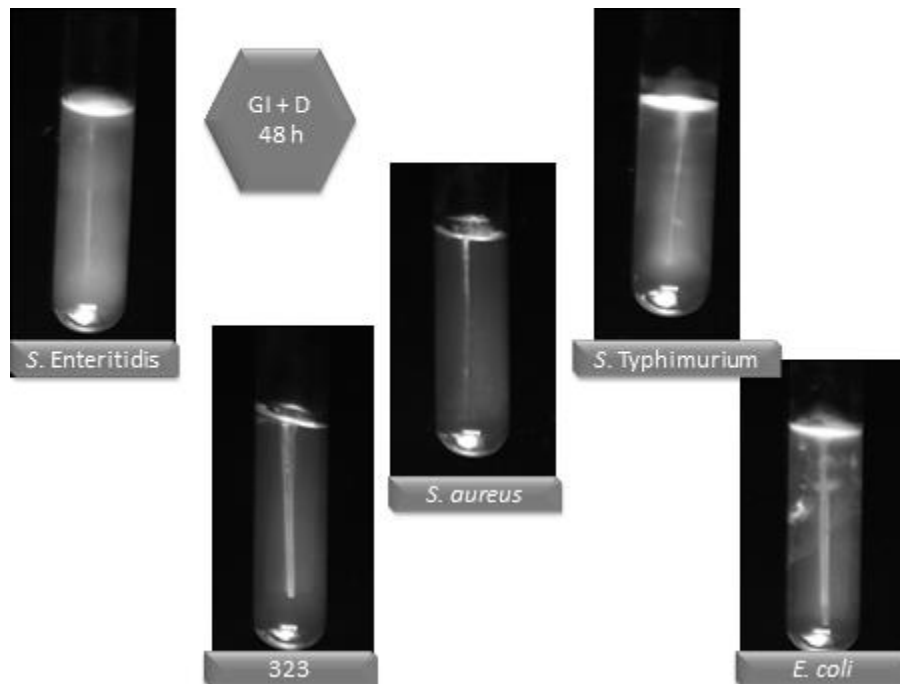
Se sembró *S. Enteritidis* ATCC49214, *S. gallinarum* FVB323 y *S. gallinarum* ATCC9184 en Medio GI con 0.5% de dextrosa dejándose incubar 48 h a 37 °C, una vez listo se tomó una asada del cultivo y se suspendió cada bacteria en 1ml de agua destilada estéril y se envió al área de Microscopía Electrónica de Transmisión, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, para su tinción con uranilo al 2%, utilizando rejillas de carbón para su posterior visualización.<sup>25</sup>

## 7. RESULTADOS

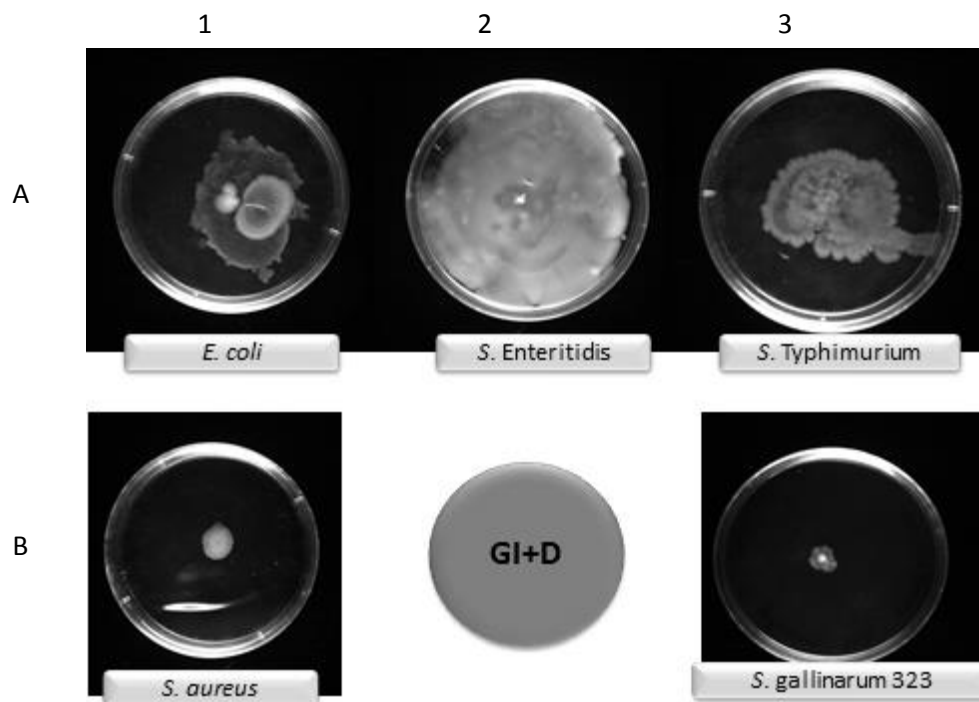
### 7.1 ENSAYO DE MOTILIDAD

En medios semisólidos la motilidad se puede observar de diferentes formas, por ejemplo, cuando se realiza en tubos por picadura se observa turbidez del medio y desplazamiento de la bacteria alrededor del sitio de la picadura **(Figura 6)** con *Salmonella* Enteritidis. Cuando se realizó en cajas de Petri por picadura o estría única se observó un efecto de ondulación expansión y crecimiento en el medio **(Figura 7)**.

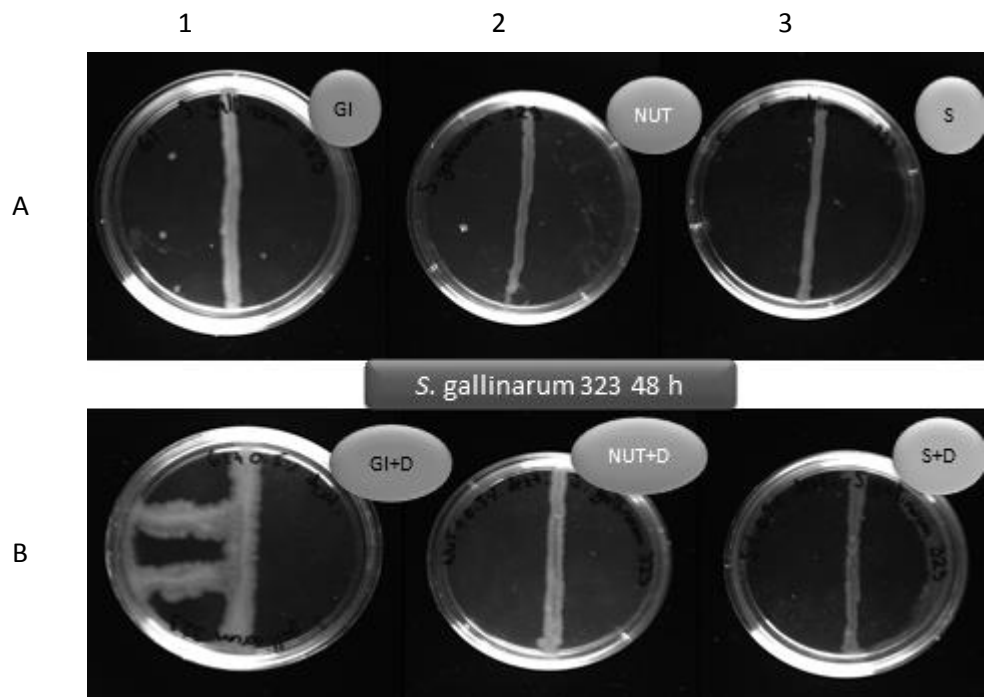
Al evaluar los medios GI, S y medio nutritivo, con y sin la adición de dextrosa, el medio con mejores resultados fue GI a las 48 h, ya que en este se observó el efecto de ondulación, expansión y crecimiento en *Salmonella* gallinarum FVB323 **(Figura 8)**, que presentan las bacterias móviles en contraste con el simple crecimiento de las bacterias inmóviles; así mismo los efectos más evidentes se observaron en placa y siembra por picadura **(Figura 7)**, ya que en tubos sembrados por picadura no se detectó una diferencia significativa **(Figura 6)**.



**Figura 6. Crecimiento en medio GI adicionado con 0.5% de dextrosa en tubo a las 48 h a 37 °C.** De izquierda a derecha se cultivó a *Salmonella*. Enteritidis cepa de campo, *Salmonella*. gallinarum FVB323, *Staphylococcus*. aureus  $\beta$  toxina, *Salmonella*. Typhimurium y *Escherichia*. coli, sembrado por picadura en medio GI con 0.5% de dextrosa. Este método fue descartado para observar motilidad ya que se observó turbidez del medio en las bacterias móviles; sin embargo, en las no móviles la presencia de turbidez no es clara.

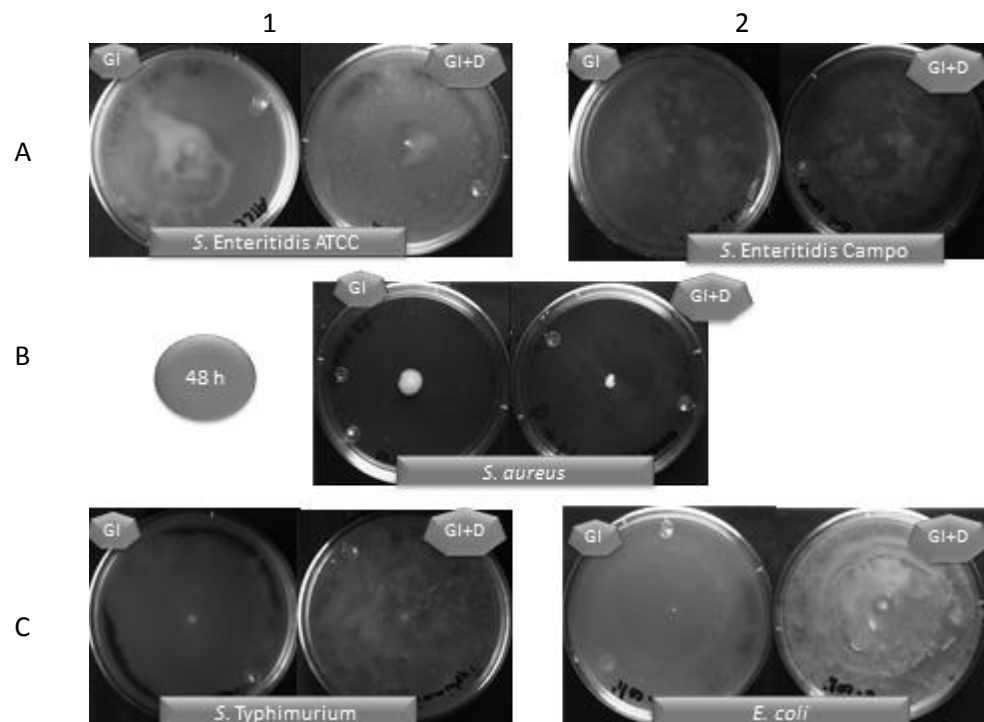


**Figura 7. Crecimiento en medio GI adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 37 °C.** En el panel A se incluyen los cultivos de *Escherichia coli* (A1), *Salmonella* Enteritidis ATCC (A2) y *Salmonella* Typhimurium (A3), se observa el efecto de crecimiento, ondulatorio y de expansión en el medio. En el panel B se incluyen los cultivos de *Staphylococcus aureus*  $\beta$  toxina (B1) que no presenta efecto ondulatorio ni de expansión en el medio solo crecimiento y *Salmonella* gallinarum FVB323 (B2), en el cual el efecto ondulatorio, de crecimiento y de expansión se presentó, pero es menor al que presentaron las bacterias móviles del panel A.

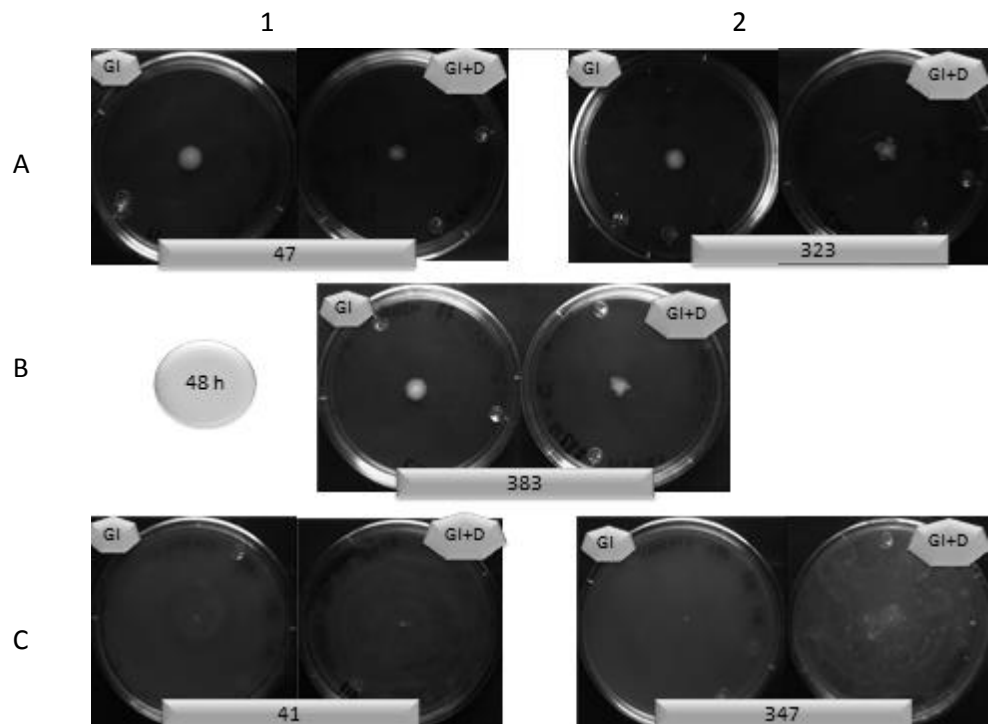


**Figura 8. Crecimiento de *Salmonella* gallinarum FVB323 en diferentes medios en placa a las 48 h a 37 °C.** En el panel A se muestra a *Salmonella* gallinarum sembrada por estría única, en medio GI (A1), agar nutritivo (A2) y medio S (A3). En el panel B se muestran los medios a los que se le adicionó 0.5% de dextrosa. Los efectos ondulado y de expansión, así como el crecimiento y la diferencia entre ellos se observaron mejor a las 48 h.

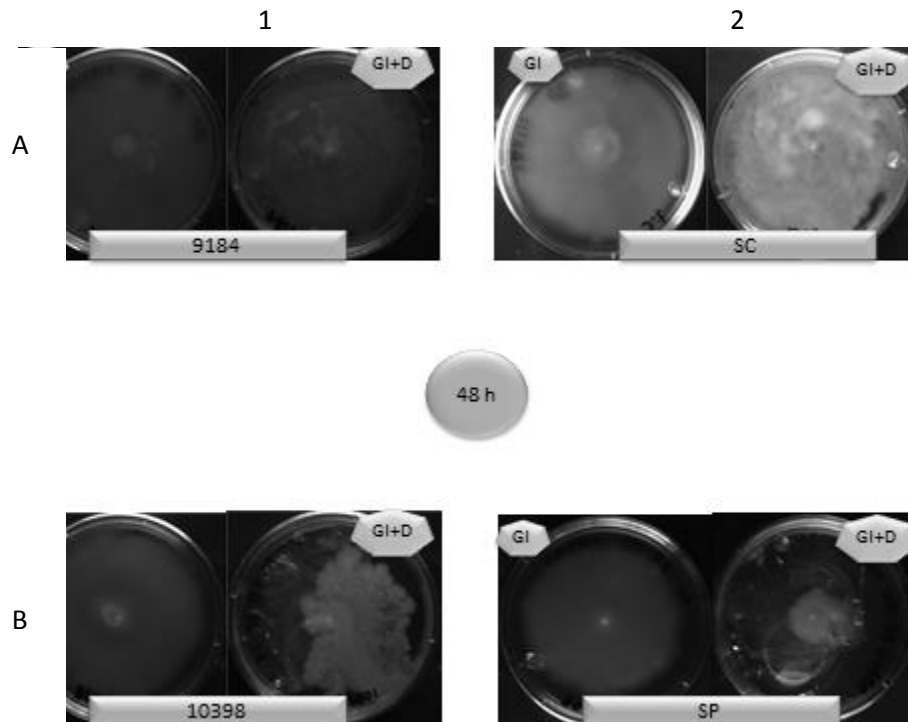
La mayoría de las cepas de *S. pullorum* y *S. gallinarum*, excepto FVB323, FVB383 y FVB47, en medio GI presentaron el efecto esperado, siendo a las 48 h el tiempo óptimo. En cuanto a la temperatura, no se observó diferencia significativa entre los 37 y 42 °C . El medio GI adicionado con dextrosa en todas las cepas se observó el efecto esperado. (Figuras 9-14)



**Figura 9. Cultivo de bacterias controles en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 37 °C.** En el panel A se presenta a *Salmonella* Enteritidis ATCC (A1) y *Salmonella* Enteritidis cepa de campo (A2), en el panel B se presenta a *Staphylococcus aureus*  $\beta$  toxina y en el panel C se presenta a *Salmonella* Typhimurium (C1) y *Escherichia coli* (C2), sembrado por picadura. Se observa de mejor manera el efecto de crecimiento, ondulatorio y de expansión que tienen las bacterias móviles en comparación con la inmóvil en medio GI solo (GI) y adicionado con dextrosa (GI+D).

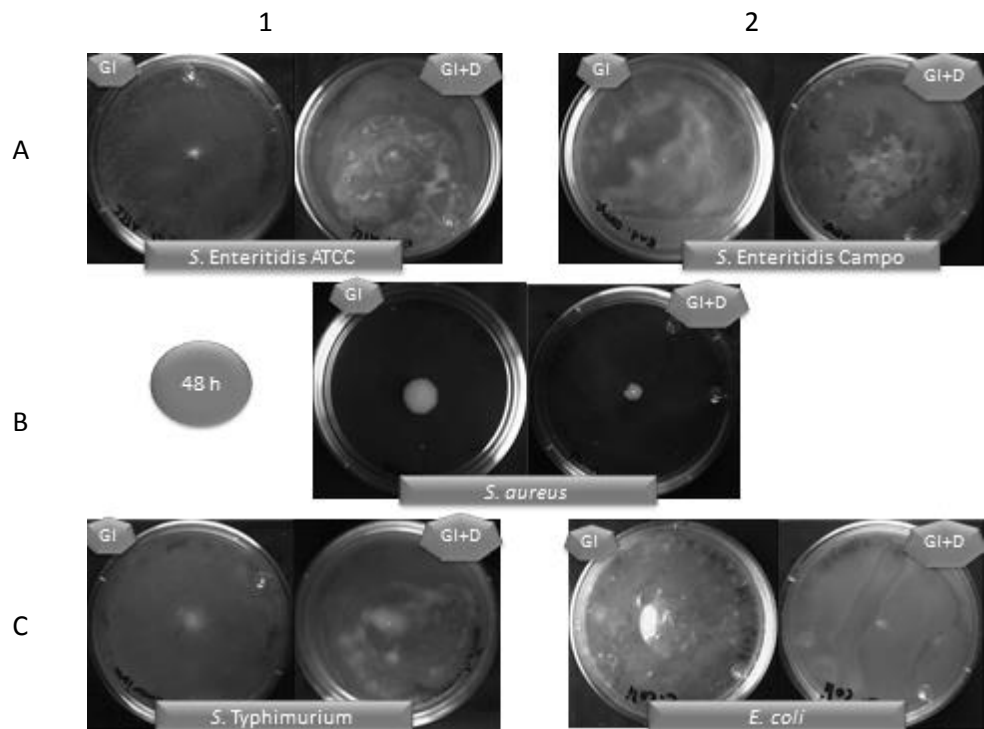


**Figura 10. Crecimiento de diferentes cepas de *Salmonella gallinarum* en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 37 °C.** En el panel A se cultivó a *Salmonella gallinarum* FVB47 (A1) y *Salmonella gallinarum* FVB323 (A2), en el panel B se cultivó a *Salmonella gallinarum* FVB383. En el panel C se cultivó a *Salmonella gallinarum* FVB41 (C1) y *Salmonella gallinarum* FVB347 (C2), sembrado por picadura. En las cepas FVB41 y FVB347 fue evidente el efecto ondulatorio y de expansión que presentan las bacterias móviles. En el cultivo de la cepa FVB47 en medio GI adicionado con dextrosa (GI+D) se observó de manera incipiente el efecto de crecimiento, ondulatorio y de expansión que presentan las bacterias móviles. Las cepas FVB323 y FVB383 en medio GI adicionado con dextrosa (GI+D) mostraron el efecto ondulatorio y de expansión que presentan las bacterias móviles. En el cultivo de la cepa FVB47, FVB323 y FVB383 en medio GI (GI), solo se observa crecimiento similar al que presentó *S. aureus*.

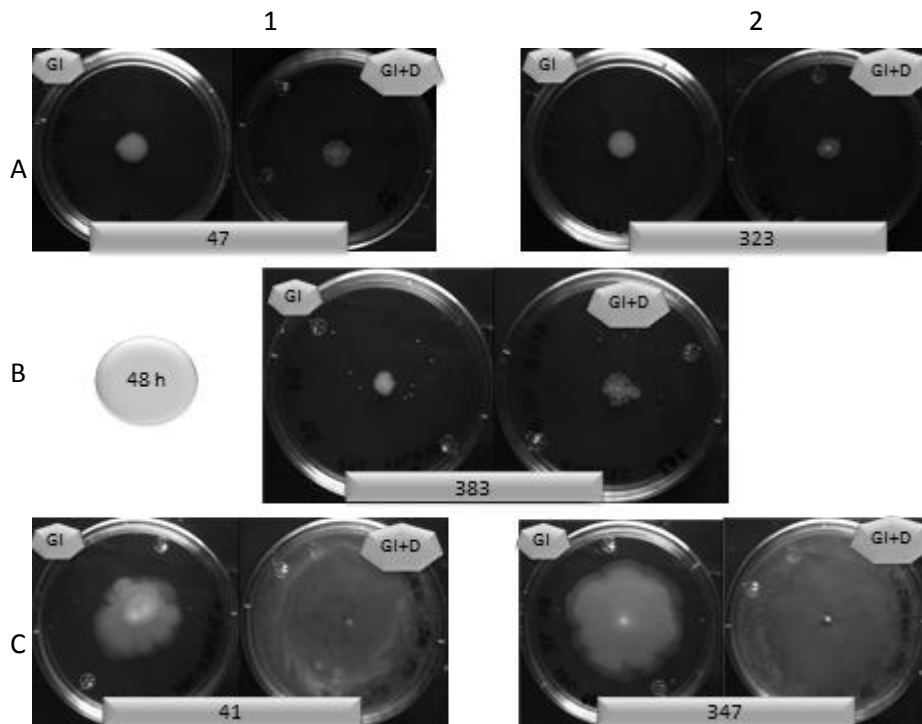


**Figura 11. Crecimiento de diferentes cepas de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 37 °C.** En el panel A se cultivó a *Salmonella gallinarum* ATCC9184 (A1) y *Salmonella gallinarum* SC (A2) y en el panel B se cultivó a *Salmonella pullorum* 10398 ATCC (B1) y *Salmonella pullorum* SP (B2), sembrado por picadura. En todas las cepas en medio GI solo (GI) y adicionado con dextrosa (GI+D) se observó de mejor manera un efecto de crecimiento, ondulatorio y de expansión similar al que presentan las bacterias móviles.

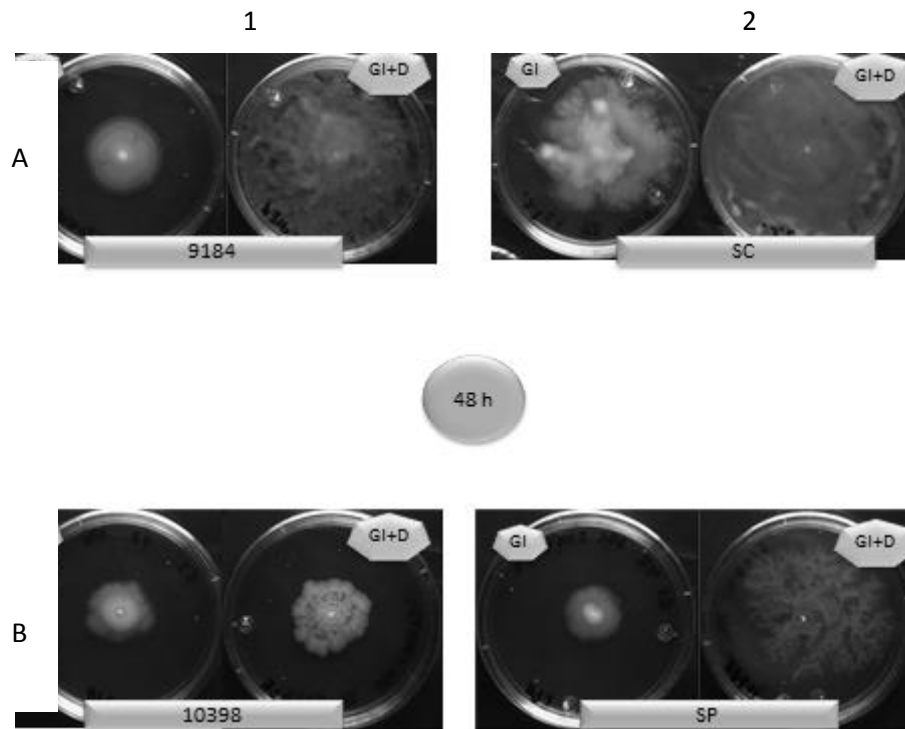




**Figura 12. Crecimiento de controles en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 42 °C.** En el panel A se presenta a *S. Enteritidis* ATCC (A1), *S. Enteritidis cepa de campo* (A2), en el panel B se presenta a *S. aureus*  $\beta$  toxina y en el panel C se presenta a *S. Typhimurium* (C1) y *E. coli* (C2), sembrado por picadura. El cambio en el efecto ondulatorio, expansión y crecimiento, fue mínimo de las 24 a las 48 h de incubación.

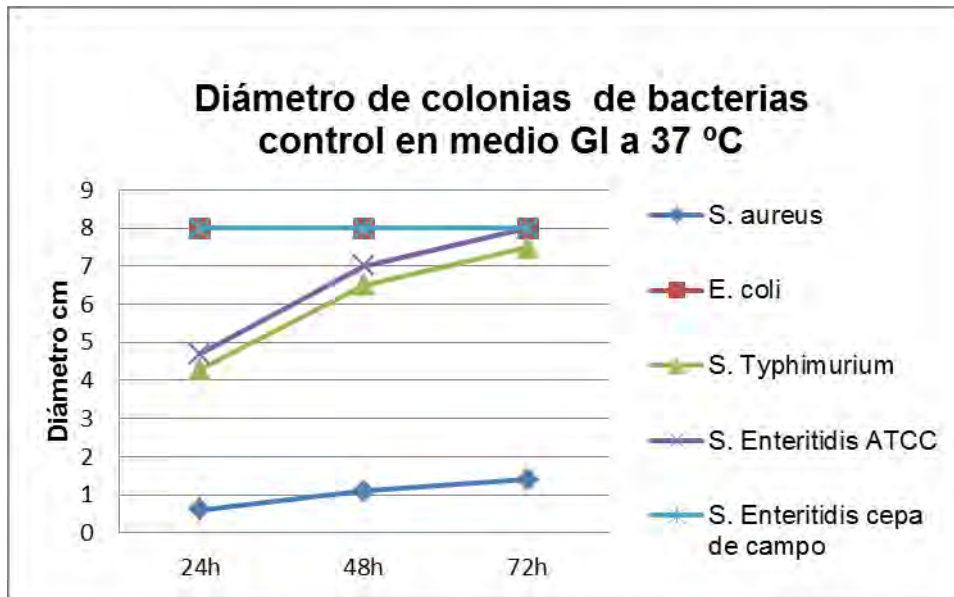


**Figura 13. Crecimiento de diferentes cepas de *S. gallinarum* en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 42 °C.** En el panel A se muestran los cultivos de *S. gallinarum* FVB47 (A1) y *S. gallinarum* FVB323 (A2), en el panel B se cultivó a *S. gallinarum* FVB383. En el panel C se muestran los cultivos de *S. gallinarum* FVB41 (C1) y *S. gallinarum* FVB347 (C2), sembrado por picadura. En los cultivos de las cepas 41 y 347 sigue siendo evidente el efecto de crecimiento, ondulatorio y de expansión que presentan las bacterias móviles. Las cepas 47, 323 y 383 en medio GI adicionado con dextrosa (GI+D) se evidenció mejor el efecto ondulatorio y de expansión que presentaron las bacterias móviles. En los cultivos de las cepas 47, 323 y 383 en medio GI (GI), solo se observó crecimiento como el que presenta *S. aureus*.

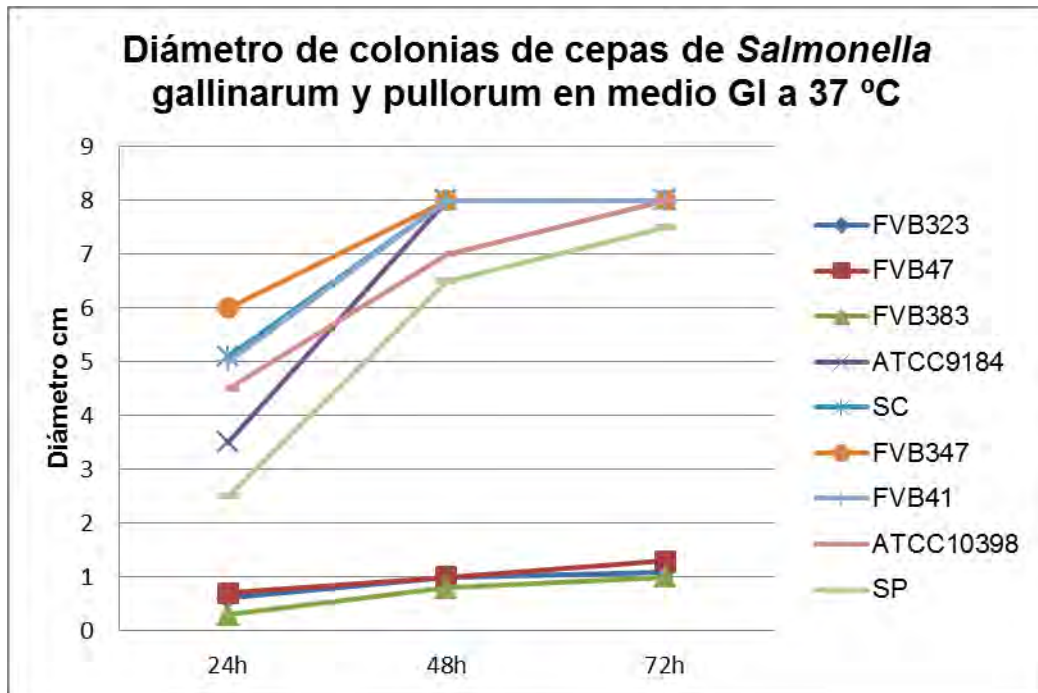


**Figura 14. Crecimiento de diferentes cepas de *S. gallinarum* y *S. pullorum* en medio GI solo y adicionado con 0.5% de dextrosa en placa a las 48 h a 42 °C.** En el panel A se muestra a *S. gallinarum* ATCC9184 (A1) y *Salmonella* *gallinarum* SC (A2), en el panel B se muestra a *S. pullorum* 10398 ATCC (B1) y *S. pullorum* SP (B2), sembrado por picadura. En todas las cepas se observó efecto de ondulatorio y de expansión similar al que presentan las bacterias móviles, además de un notable crecimiento entre las 24 y 48 h.

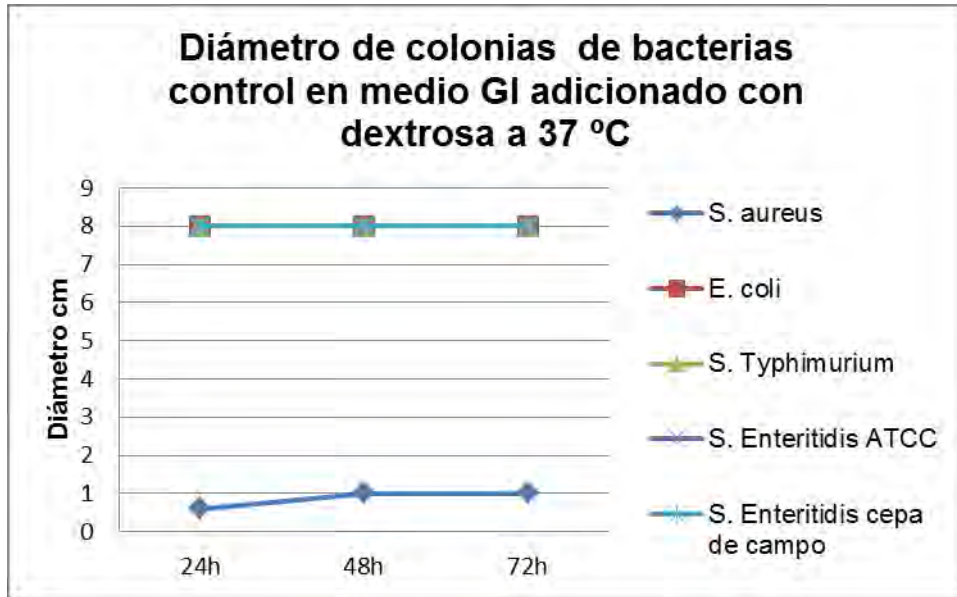
Al medir los diámetros y hacer la comparación entre las bacterias control y las cepas problema (**Figuras 15-22**) se observó que todas las cepas de *Salmonella gallinarum* se comportan como las bacterias control móviles, excepto las cepas FVB323, FVB383 y FVB47 que se comportan como *S. aureus* la cual es inmóvil, sin embargo, cabe resaltar que al observar las fotografías de los cultivos en medio GI solo y adicionado con dextrosa, (**Figuras 10 y 13**), la diferencia, en cuanto al efecto del crecimiento, fue evidente. El crecimiento en el medio GI adicionado con dextrosa es ligeramente mayor en las cepas de *S. gallinarum* y el mayor crecimiento se presentó a las 48 h. (**Figuras 19-22**).



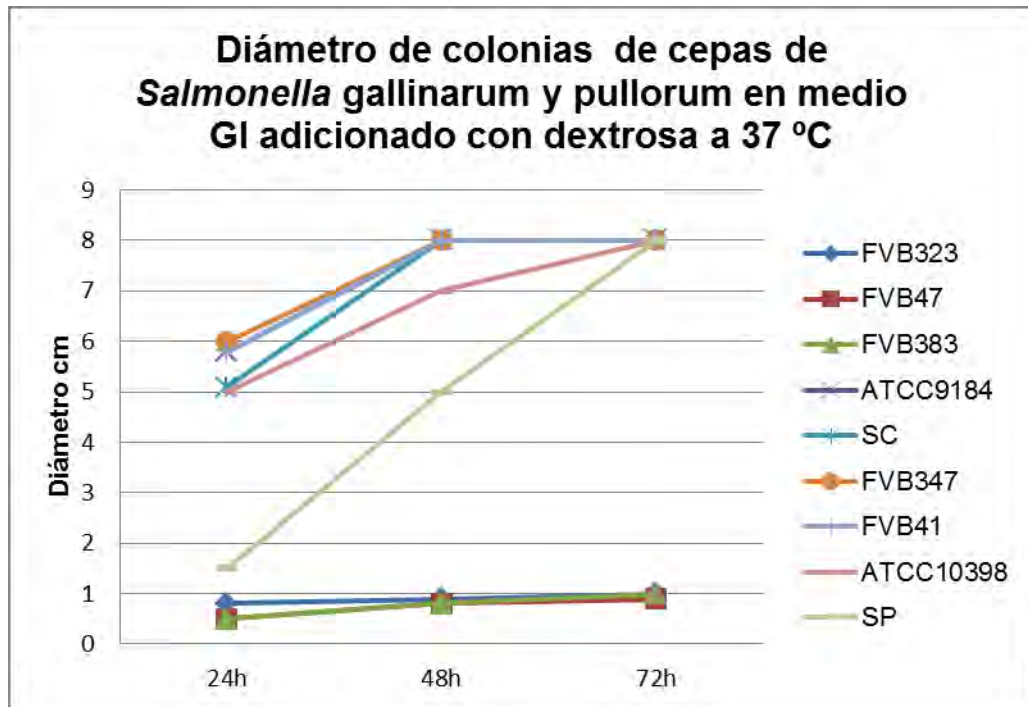
**Figura 15. Determinación del diámetro de bacterias control en medio GI a 37 °C.** Diámetro, en cm, de los halos de crecimiento las bacterias control en este estudio, a las 24, 48 y 72 h. El diámetro de difusión del cultivo en este medio fue mayor en bacterias móviles que en las inmóviles, y presentó aumento entre las 24 y 48 h de incubación.



**Figura 16. Determinación del diámetro de cepas de *S. gallinarum* y *S. pullorum* en medio GI a 37 °C.** Diámetro, en cm, de los halos de crecimiento las cepas de *S. gallinarum* y *pullorum*, a las 24, 48 y 72 h. Las cepas SP, ATCC10398, ATCC 9184, FVB41, SC y FVB347 presentan un diámetro de difusión del cultivo parecido al que presentan las bacterias control que son móviles. Las cepas de *S. gallinarum* FVB323, FVB47 y FVB383 presentan un diámetro de difusión del cultivo más parecido al de *S. aureus* que es inmóvil. El mayor crecimiento se observó a las 48 h.

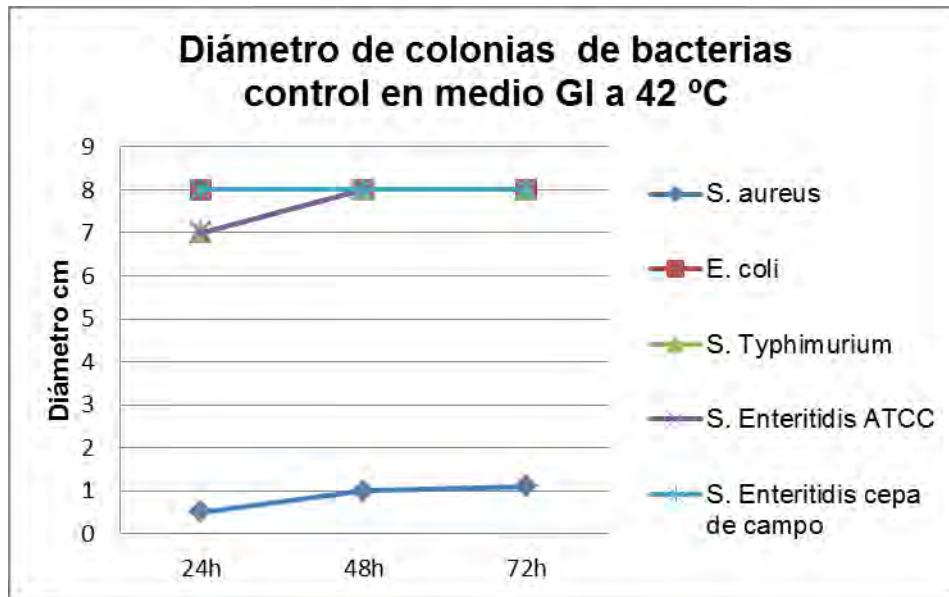


**Figura 17. Determinación del diámetro de bacterias controles en medio GI adicionado con dextrosa a 37 °C.** Diámetro, en cm, de los halos de crecimiento de las bacterias control en este estudio, a las 24, 48 y 72 h de incubación. El diámetro de difusión del cultivo en este medio es mayor en los controles móviles que inmóviles; además, con el medio GI sin dextrosa, las bacterias móviles crecen más rápido. Las bacterias móviles crecieron al máximo desde las 24 h en contraste con *S. aureus* el cual presentó su mayor crecimiento a las 48 h.

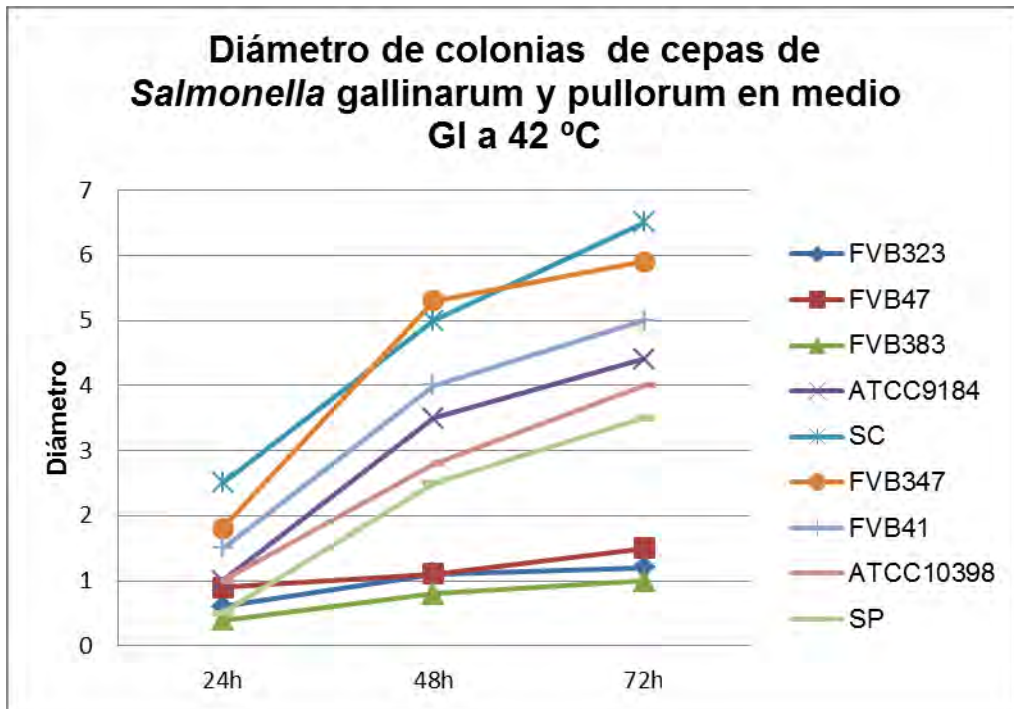


**Figura 18. Determinación del diámetro de cepas de *Salmonella* gallinarum y pullorum en medio GI adicionado con dextrosa a 37 °C.** Diámetro, en cm, de los halos de crecimiento de cepas de *S. gallinarum* y *S. pullorum*, a las 24, 48 y 72 h. Las cepas de *S. pullorum* SP, ATCC10398 y *S. gallinarum* ATCC 9184, FVB41, SC y FVB347 presentan un diámetro de difusión del cultivo parecido al que presentan las bacterias control que son móviles, Las cepas de *S. gallinarum* FVB323, FVB47 y FVB383 presentan un patrón de crecimiento más parecido al de *S. aureus* que es inmóvil. El comportamiento en el crecimiento de todas las cepas es muy parecido en medio GI solo y adicionado con dextrosa. El mayor crecimiento se observó a las 48 h.

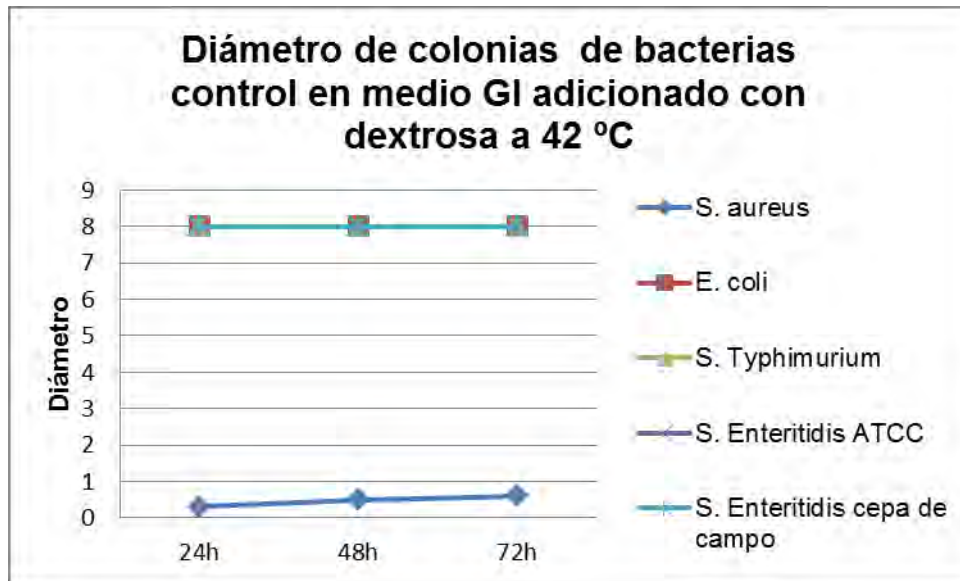




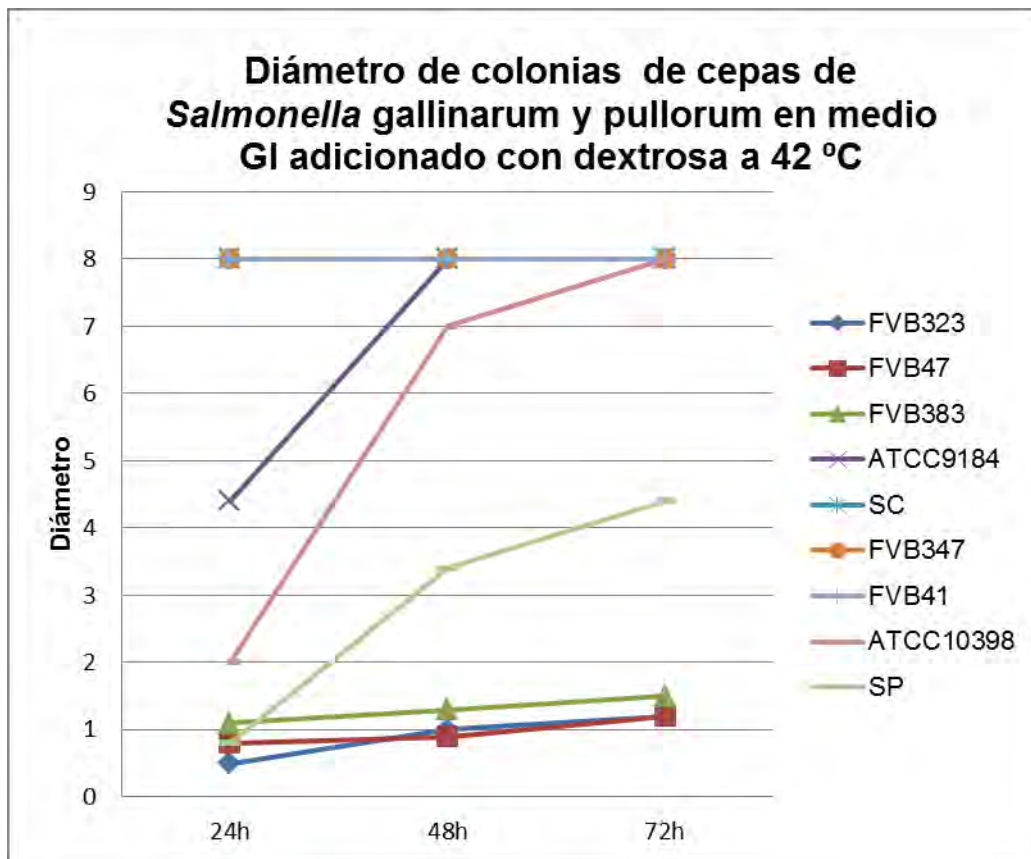
**Figura 19. Determinación del diámetro de bacterias control en medio GI a 42 °C.** Diámetro, en cm, de los halos de crecimiento las bacterias control en este estudio, a las 24, 48 y 72 h de incubación. El diámetro de difusión del cultivo en este medio es mayor en los controles móviles que inmóviles. Las bacterias móviles crecieron al máximo desde las 24 h en contraste con *S. aureus* el cual presentó mayor crecimiento a las 48 h.



**Figura 20. Determinación del diámetro de cepas de *Salmonella gallinarum* y *pullorum* en medio GI a 42 °C.** Diámetro, en cm, de los halos de crecimiento de cepas de *S. gallinarum* y *pullorum*, a las 24, 48 y 72 h de incubación. Las cepas SP, ATCC10398, ATCC9184, FVB41, SC y FVB347 presentan un patrón de crecimiento similar al que presentan las bacterias control que son móviles. Las cepas FVB323, FVB47 y FVB383 presentan un diámetro de difusión del cultivo más parecido al de *S. aureus* que es inmóvil. El crecimiento a 42 °C se ve disminuido en comparación con las bacterias sembradas a 37 °C, sobre todo en las cepas SP, ATCC10398, ATCC 9184, FVB41, SC y FVB347. El mayor crecimiento se observó a las 48 h.



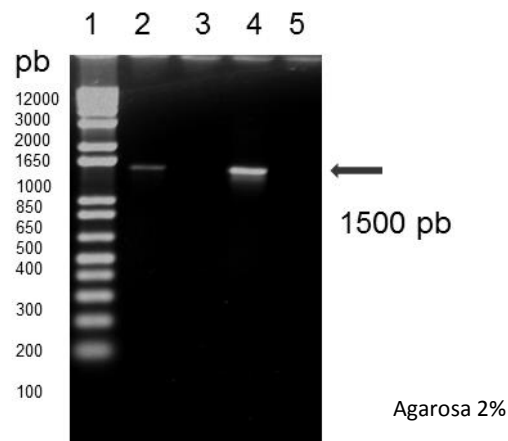
**Figura 21. Determinación del diámetro bacterias control en medio GI adicionado con dextrosa a 42 °C.** Diámetro, en cm, de los halos de crecimiento las bacterias control en este estudio, a las 24, 48 y 72 h de incubación. El diámetro de difusión del cultivo en este medio es mayor en los controles móviles que inmóviles, en comparación con el medio GI sin dextrosa en este último las bacterias móviles crecen más rápido y no hay diferencia entre las sembradas a 37° ó 42 °C. Las bacterias móviles crecieron al máximo desde las 24 h en contraste con *S. aureus* el cual presentó su mayor crecimiento a las 48 h.



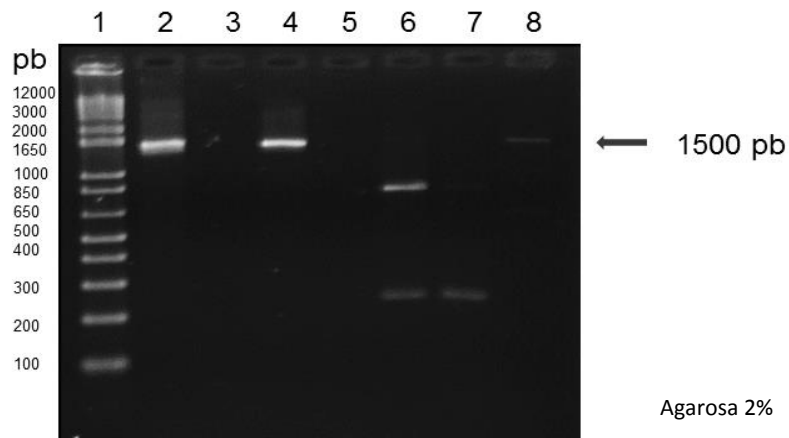
**Figura 22. Determinación del diámetro de cepas de *Salmonella gallinarum* y *pullorum* en medio GI adicionado con dextrosa a 42 °C.** Diámetro, en cm, de los halos de crecimiento de cepas de *S. gallinarum* y *pullorum*, a las 24, 48 y 72 h de incubación. Las cepas SP, ATCC10398, ATCC 9184, FVB41, SC y FVB347 presentan un diámetro de difusión del cultivo similar al que presentan las bacterias control que son móviles. Las cepas FVB323, FVB47 y FVB383 presentan un patrón de crecimiento similar al de *S. aureus* que es inmóvil. El crecimiento a 42 °C se ve disminuido en comparación con las bacterias sembradas a 37 °C, sobre todo en las cepas SP, ATCC10398, ATCC9184, FVB41, SC y FVB347. El crecimiento se ve aumentado en este medio a diferencia del medio GI solo a 42 °C. El mayor crecimiento se observó a las 48 h excepto con la cepa FVB41 la cual creció al máximo desde las 24 h.

## 7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

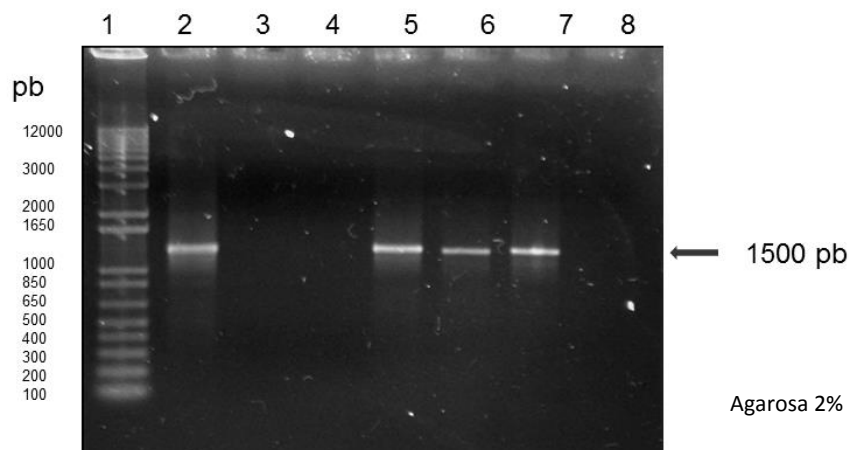
Se amplificó un fragmento de aproximadamente 1500 pb en todas las cepas excepto en *S. aureus*, *S. gallinarum* cepas 347, 41 y SC y *S. pullorum* ATCC10398 en las cuales no se obtuvo fragmento, mientras que, en *E. coli* y *S. Enteritidis* cepa de campo se obtuvieron 2 fragmentos de 850 y 250 pb aproximadamente. **(Figura 23 y 25)**



**Figura 23. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra el producto de la PCR para amplificar *fliC*.** En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 kb plus, en los carriles 2 al 5 se muestran los productos de PCR de: carril 2 *S. Typhimurium*, carril 4 *S. gallinarum* FVB323. En los carriles 3 y 5 se muestra la ausencia de producto de PCR de carril 3 *S. aureus* y carril 5 *S. pullorum* ATCCC10398. La flecha señala el producto de la PCR de 1500 pb en el pozo 2 y 4.



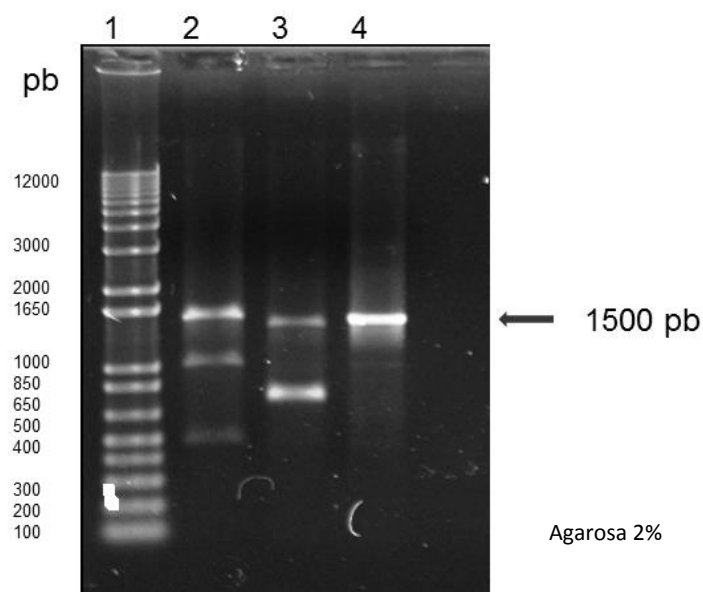
**Figura 24. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra el producto de la PCR para amplificar *fliC*.** Carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 kb plus, en los carriles 2 al 8 se muestran los productos de PCR de: carril 2 *S. Typhimurium*, carril 4 *S. gallinarum* FVB383, carril 6 *E. coli*, carril 7 *S. Enteritidis* cepa de campo y carril 8 *S. Enteritidis* ATCC. En los carriles 3 y 5 se muestra la ausencia de producto de PCR de: carril 3 *S. aureus* y carril 5 *S. gallinarum* FVB347. Se presenta un fragmento de 1500 pb en el carril 2, 4 y 8, además de dos productos de aproximadamente 850 y 250 pb en el carril 6 y 7.



**Figura 25. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra el producto de la PCR para amplificar *fliC*.** Carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 kb plus, carril 2 al 7 se muestran los productos de PCR de: carril 2 *S. Typhimurium*, carril 7 ATCC9184, carril 5 FVB47, carril 6 SP. En los carriles 3 a 8 se muestra la ausencia de producto de PCR de: carril 3 *S. aureus* pozo 4 FVB41, pozo 8 SC. Se observa un fragmento de 1500 pb en el pozo 2, 5, 6 y 7.

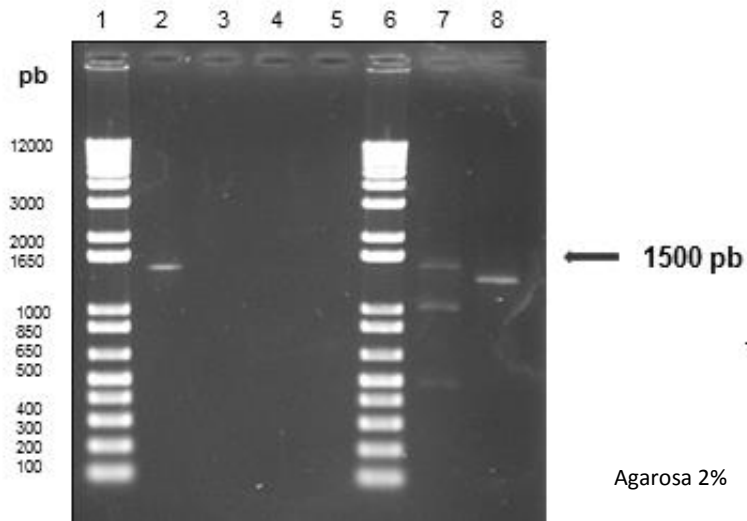
### 7.3 DIGESTIÓN

Al realizar la digestión con la enzima *EcoRV* en el producto obtenido de *S. gallinarum* ATCC9184 y de *S. Typhimurium*, se obtuvieron los fragmentos esperados (**Figura 26 y 27**); sin embargo, en el caso de *KpnI* sólo con ATCC9184 se obtuvo el resultado esperado (**Figura 27**) y en el caso de *S. Typhimurium* la digestión con esta enzima se generaron dos fragmentos: uno de aproximadamente 1442 pb y otro de 750 pb. (**Figura 26**)



**Figura 26.** Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra la digestión del producto de PCR *fliC* de *Salmonella Typhimurium* con las enzimas *EcoRV* y *KpnI*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 kb plus. Carril 2 fragmentos de *fliC* de aproximadamente 483 y 1017 pb digeridos con *EcoRV*, además del producto de PCR *fliC*. Carril 3 fragmentos de *fliC* de aproximadamente 1442 pb y otro de aproximadamente 750 pb digeridos con *KpnI*. Carril 4 producto PCR *fliC*.





**Figura 27. Fotografía de un gel de agarosa donde se muestra la digestión del producto de la PCR *fliC* de *Salmonella gallinarum* ATCC9184 con las enzimas *EcoRV* y *KpnI*. En el carril 1 y carril 6 muestra el marcador de peso molecular 1 kb plus, carril 2 producto de PCR *fliC* de ATCC9184, carril 7 fragmentos de *fliC* de ATCC9184 de aproximadamente 483 y 1017 pb digeridos con *EcoRV*, además del producto de PCR *fliC*, carril 8 fragmento de *fliC* de ATCC9184 de aproximadamente 1442 pb digerido con *KpnI*.**

## 7.4 SECUENCIACIÓN

El producto de PCR para *fliC* de *Salmonella* gallinarum ATCC9184 se mandó a secuenciar y se obtuvieron dos secuencias incompletas una sentido de 816 pb (BankIt1674463 SEQ1 KF885733), antisentido de 815 pb. Estas secuencias fueron analizadas en comparación con las secuencias de *fliC* de diferentes bacterias en los programas DNAMAN, Vector y Blast obteniendo los porcentajes de identidad. (**Tabla 1 y 2**). Es importante resaltar que las secuencias de *S. gallinarum* ATCC9184 tuvieron mayor identidad con *S. Typhimurium*, en contraste con las secuencias de las 2 cepas de *S. gallinarum* (287/9 y ST) que se encuentran en el Genbank, que son idénticas a *S. Enteritidis*.

**Tabla 1. Porcentajes de Identidad de *Salmonella* gallinarum ATCC9184 comparada con otras cepas.**

	Programa	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Salmonella</i> gallinarum 287/9	<i>Salmonella</i> gallinarum ST
<b><i>Salmonella</i> gallinarum ATCC9184 S</b>	<b>DNAMAN</b>	78%	66%	64%	66%	64%
	<b>Vector</b>	81.1%	68.1%	63.9%	68.1%	61.2%
	<b>Blast</b>	98%	84%	83%	84%	83%
<b><i>Salmonella</i> gallinarum ATCC9184 AS</b>	<b>DNAMAN</b>	36%	33%	35%	33%	33%
	<b>Vector</b>	46.5%	46.9%	48.2%	46.9%	46.5%
	<b>Blast</b>	88%	*	85%	*	*

\*No se encontró una similitud significativa

Porcentajes de identidad entre secuencias de *fliC* de *Salmonella* gallinarum ATCC9184 con diferentes bacterias, obtenidos mediante los programas DNAMAN, Vector y Blast. Se observó la identidad entre el 78 y 98%, dependiendo del programa, entre *S. gallinarum* ATCC9184 S y *S. Typhimurium*.

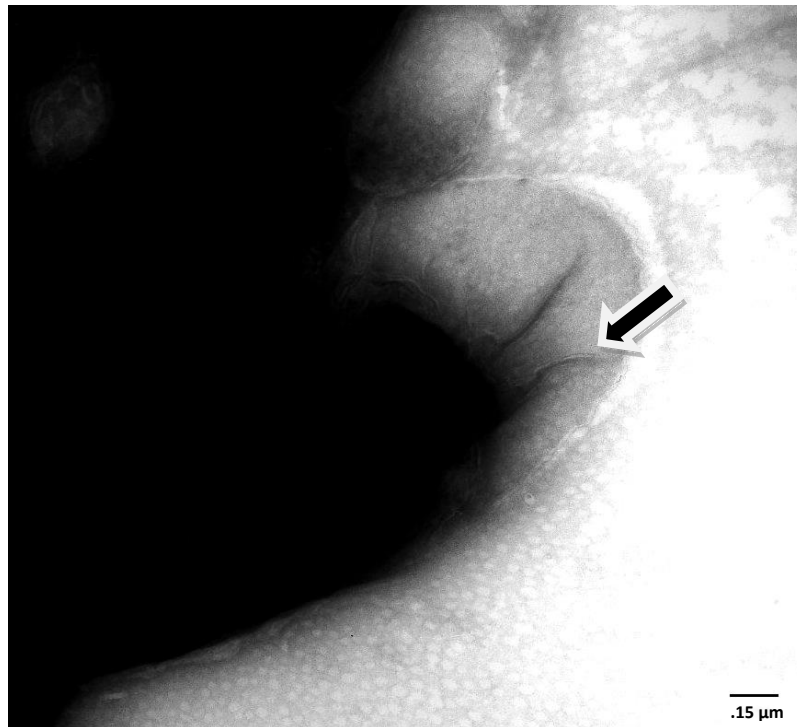
**Tabla 2. Identidad.**

	Programa	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Salmonella</i> gallinarum 287/9
<i>Salmonella</i> Enteritidis	DNAMAN	63%			
	Vector	64.9%			
	Blast	85%			
<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	DNAMAN	59%	58%		
	Vector	64.2%	60.1%		
	Blast	63%	84%		
<i>Salmonella</i> gallinarum 287	DNAMAN	63%	100%	58%	
	Vector	64.9%	100%	60.1%	
	Blast	85%	100%	84%	
<i>Salmonella</i> gallinarum ST	DNAMAN	59%	99%	53%	99%
	Vector	60%	99.8%	57.3%	99.8%
	Blast	83%	99%	83%	99%

Porcentajes de identidad entre secuencias de *fliC* de diferentes bacterias obtenidos mediante los programas DNAMAN, Vector y Blast. Nótese la identidad del 99 y 100% de *S. gallinarum* 287 y ST respectivamente, con *S. Enteritidis*.

## 7.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En las micrografías se observan los largos flagelos que presenta *S. Enteritis*, ver (Figura 32 y 33), estos muy parecidos a los filamentos observados en *S. gallinarum* ATCC9184 (Figura 30 y 31). En el caso de *S. gallinarum* FVB323 se observan unos filamentos gruesos y cortos diferentes a los observados en las bacterias anteriormente mencionadas (Figura 28 y 29).



**Figura 28.** Tinción negativa de *Salmonella gallinarum* FVB323. La flecha señala los filamentos que emergen de uno de sus extremos. Técnica de contraste con uranilo al 2%. Aumento 50 000x.

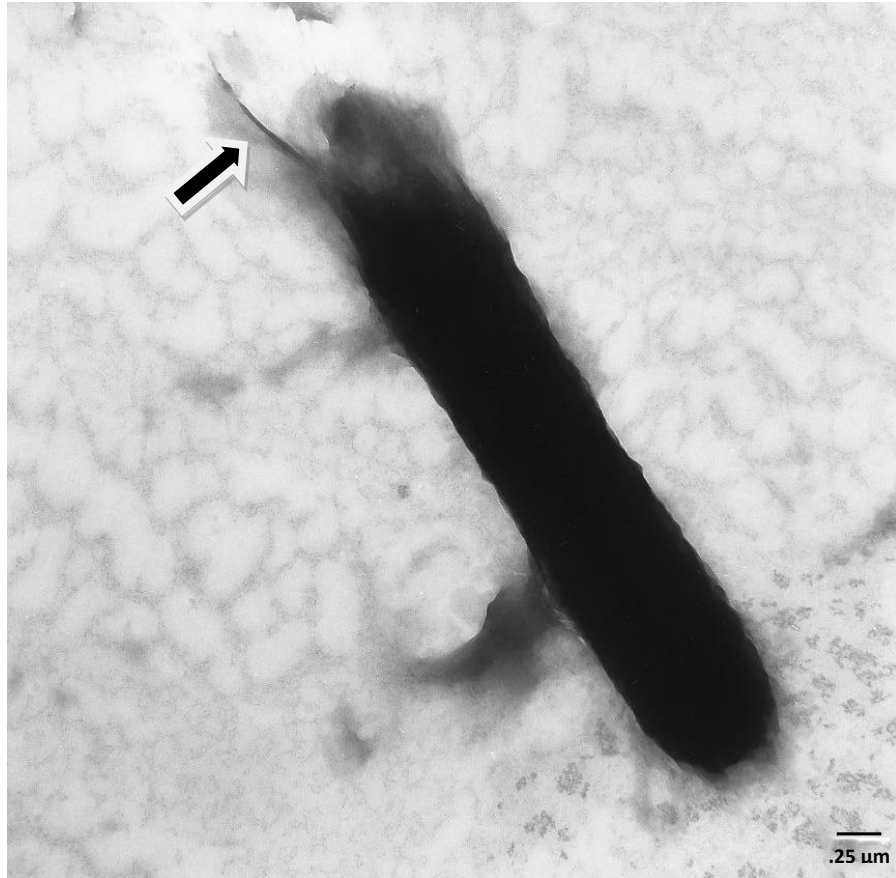


Figura 29. Tinción negativa de *Salmonella gallinarum* FVB323. La flecha señala el filamento electrodenso que emerge en uno de sus extremos. Técnica de contraste con uranilo al 2%. Aumento 30 000x.

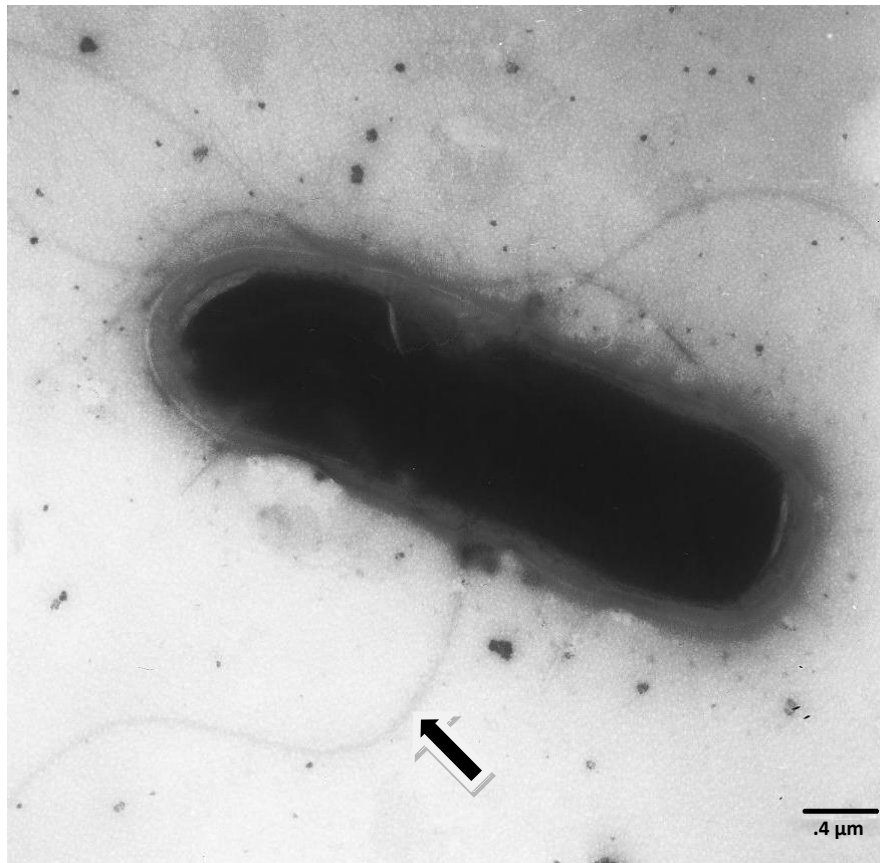


Figura 30. Tinción negativa de *Salmonella gallinarum* ATCC9184. La flecha señala numerosos filamentos ligeramente electrodensos que emergen de la bacteria. Técnica de contraste con uranilo al 2%. Aumento 20 000x.

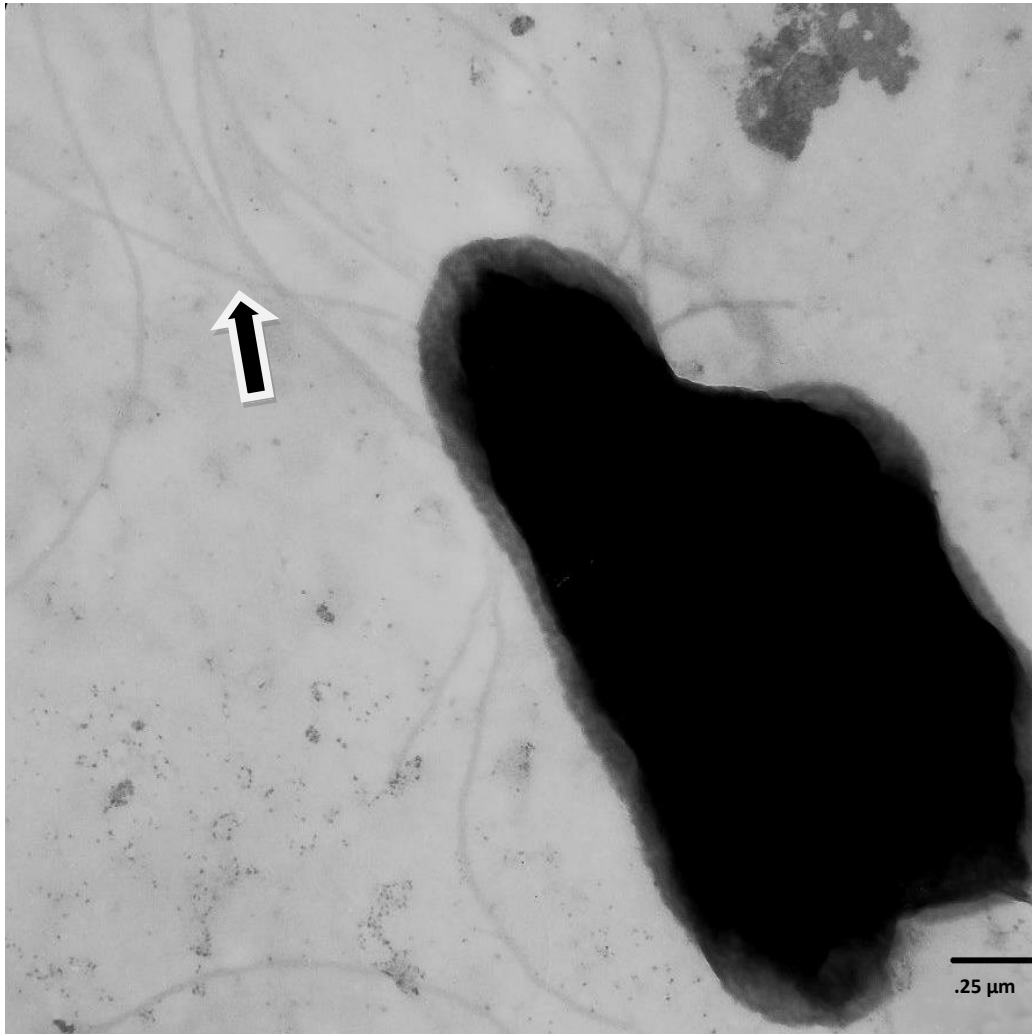


**Figura 31. Tinción negativa de *Salmonella gallinarum* ATCC9184.** La flecha señala filamentos electrodensos que emergen de la bacteria. En el fondo se observan numerosos filamentos sueltos. Técnica de contraste con uranilo al 2%. Aumento 20 000x.





**Figura 32. Tinción negativa de *Salmonella* Enteritidis ATCC49214.** La flecha señala los flagelos ligeramente electrodensos que emergen de la bacteria. Técnica de contraste con uranilo al 2%. Aumento 30 000x.



**Figura 33.** Tinción negativa de *Salmonella* Enteritidis ATCC49214. La flecha señala los flagelos ligeramente electrodensos que emergen de la bacteria. Técnica de contraste con uranilo al 2%. Aumento 20 000x.

## 8. DISCUSIÓN

En este estudio se demuestra por primera vez la presencia de filamentos semejantes al flagelo en *Salmonella gallinarum*, que se expresan bajo condiciones de cultivo adicionado con dextrosa al 0.5%, también se observó un crecimiento similar al que presentan las bacterias móviles en medios adicionados con dextrosa, además se amplificó el gen de la proteína FliC involucrada en la formación del filamento del flagelo.

La motilidad es una propiedad esencial para la colonización bacteriana; por ejemplo, a *Helicobacter pylori* el flagelo le permite desplazarse a través del mucus gástrico para poder establecerse en el epitelio del estómago; en el caso de *Salmonella* Enteritidis la adherencia a la superficie del epitelio depende de las fimbrias y los flagelos.<sup>35,36,37</sup>

Por otra parte, el flagelo mediante receptores tipo Toll, provoca la activación de interleucinas proinflamatorias, por parte del hospedero, sin embargo, la bacteria puede cambiar de fase y producir un filamento con una proteína diferente a la que fue reconocida inicialmente y así podrá evadir al sistema inmunológico, garantizando su establecimiento en el epitelio intestinal.<sup>35,38,39</sup>

En este trabajo, la expresión de filamentos semejantes a flagelos en *Salmonella gallinarum* se demostró cultivándolas en un medio rico en dextrosa, lo cual puede estar relacionado en la regulación de *fliC*. Se sabe que la regulación de los genes por nutrientes es un mecanismo importante por el cual los organismos se adaptan a su ambiente nutricional; la dextrosa ha demostrado inducir la transcripción de los genes de la L-piruvato-cinasa, la sintetasa de ácidos grasos, la acetil-CoA carboxilasa, S14 y la insulina en

humanos.<sup>40</sup> Por otro lado, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado que la glucosa reprime la transcripción de toda una serie de genes responsables de la respiración, de la utilización de otras fuentes de carbono (galactosa, maltosa, sacarosa) y de genes que codifican enzimas de la vía gluconeogénica. Por el contrario, la glucosa es capaz de inducir genes implicados en su propio metabolismo, especialmente genes que codifican transportadores de glucosa y enzimas de la glucólisis.<sup>41</sup>

Holt *et. al.* reportaron que a 42 °C obtuvieron mayor crecimiento de diferentes cepas de *S. gallinarum*, debido a que esta es la temperatura de las aves. En el presente trabajo, a 42 °C, el crecimiento en general se ve disminuido en las cepas problema, no así en las bacterias control móviles. Esto probablemente se presentó debido a la adaptación de estas cepas bacterianas a las condiciones de temperatura *in vitro*.<sup>25</sup>

Los filamentos observados por microscopía electrónica en *S. gallinarum* 323 son más parecidos a fimbrias que a flagelos, ya que son más pequeños y electrodensos.<sup>42</sup> Sin embargo, para demostrarlo habría que utilizar técnicas como inmunoelectrotransferencia.

Por otro lado, en las cepas FVB347, FVB41 y SC de *S. gallinarum* y ATCC10398 de *S. pullorum*, la motilidad en el medio GI solo y adicionado con dextrosa fue evidente; sin embargo, no se amplificó el gen *fliC*, esto puede ser debido a lo expuesto por Holt *et. al.* quienes exponen que no en todas las cepas de *S. pullorum* está presente el gen *fliC*. Probablemente el gen *fliC* sea de conformación diferente al de las otras cepas, ya que la variación de fase comprende la inversión de un segmento de ADN de una orientación a otra,

cuando el segmento está orientado en una dirección se expresa un gen particular, en tanto está orientado en la dirección opuesta se expresa un gen distinto. La mayoría de las cepas de *Salmonella* pueden presentar las dos fases y existen algunas que presentan solo una fase.<sup>38</sup>

Con la digestión enzimática de *Salmonella* Typhimurium LT2 con *EcoRV* se obtuvo un fragmento inesperado, posiblemente debido a que para este ensayo se utilizó una cepa diferente a la que se utilizó para la predicción de la digestión en el programa DNAMAN, el sitio de corte enzimático en el mismo gen puede ser diferente de acuerdo a la cepa bacteriana.<sup>23</sup>

Debido al cercano parentesco filogenético entre las distintas serovariedades de *Salmonella* no es raro que la secuencia de *Salmonella* gallinarum ATCC9184 de este trabajo tenga mayor identidad con *Salmonella* Typhimurium, sin embargo, hay que destacar que la secuencia de *Salmonella* gallinarum ATCC9184 se encuentra incompleta, esto es solo la mitad de la secuencia completa del gen que se ha reportado en *S. gallinarum* 287/9.<sup>7,34</sup>

Este reporte genera sustento para proponer que, *Salmonella* gallinarum es móvil bajo condiciones de cultivo particulares y la importancia que puede tener la motilidad en la patogenia de la bacteria.

## 9. CONCLUSIÓN

- I. Al cultivar en medios adicionados con dextrosa, se observó un crecimiento ondulatorio el cual sugiere motilidad en todas las cepas de *Salmonella gallinarum* a las 48 h.
- II. Se amplificó *fliC* en 4 de las 7 cepas de *S. gallinarum*, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa; se secuenció y se obtuvo identidad del 98% con *S. Typhimurium* a diferencia de la secuencia ya reportada que presenta 100% de identidad con *S. Enteritidis*.
- III. Con las adición de dextrosa, a 37 o 42 °C a las 48 h *S. gallinarum* expresa una estructura similar al flagelo, la cual se observó por medio de microscopia electrónica de transmisión.

## 10. PROSPECTIVA

- I. Buscar mediante inmunoelectrotransferencia la proteína FliC, que forma el filamento flagelar.
- II. Realizar microscopía confocal utilizando anticuerpos anti FliC marcados con un fluorocromo, para verificar que estos filamentos observados en *S. gallinarum* ATCC9184 sean flagelos y descartar que los observados en *S. gallinarum* FVB323 sean fimbrias.
- III. Inocular pollitos de un día de nacidos o cultivo celular para verificar si las cepas de *S. gallinarum* que presentan flagelo son más patógenas.

## 11. ANEXO DE MEDIOS Y REACTIVOS

### MEDIOS DE CULTIVO

#### AGAR A

Caldo Nutritivo	7 g
Extracto de levadura	1 g
Glicerol	2 ml
Fosfato monoácido de potasio ( $K_2HPO_4$ )	3.7 g
Fosfato diácido de potasio ( $KH_2PO_4$ )	1.3 g
Agar	15 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada. Calentar. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min. Envasar en cajas de Petri. Almacenar a 4 °C. Para conservar cepas envasar en tubos de ensaye y almacenar a temperatura ambiente.

#### CALDO A

Caldo Nutritivo	7 g
Extracto de levadura	1 g
Glicerol	2 ml
Fosfato monoácido de potasio ( $K_2HPO_4$ )	3.7 g
Fosfato diácido de potasio ( $KH_2PO_4$ )	1.3 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min.

Almacenar a 4 °C.



## MEDIO GI

Medio GI	81.4 g/L
----------	----------

Calentar. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min. Envasar en cajas de Petri.

Almacenar a 4 °C.

## MEDIO S

Medio s	60 g/L
---------	--------

Calentar. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min. Envasar en cajas de Petri.

Almacenar a 4 °C.

## MEDIO NUTRITIVO 0.5% AGAR

Medio Nutritivo	8 g/L
Agar	0.5%

Calentar. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min. Envasar en cajas de Petri.

Almacenar a 4 °C.

## REACTIVOS PARA EXTRACCIÓN DE ADN

### SOLUCIÓN DE LISIS

Para 150 ml

Tiocianato de guanidina	29.33 g
EDTA 0.5 M	30 ml
N- Lauryl sarcosine sodio	0.25 g

Aforar a 150 ml. Almacenar a temperatura ambiente. NOTA: REACTIVOS

NEUROTÓXICOS UTILIZAR CUBREBOCAS

## ACETATO DE AMONIO 7.4 M

Para 50 ml

Acetato de Amonio	28.519
	g

Aforar a 50 ml. Almacenar a -20 °C.

## FENOL – CLOROFORMO – ALCOHOL ISOAMÍLICO 25:24:1

Para 100 ml

Fenol	50 ml
Cloroformo	48 ml
Alcohol isoamílico	2 ml

Envasar en frasco ámbar. Almacenar a 4 °C

## CLOROFORMO – ALCOHOL ISOAMÍLICO 24:1

Para 100 ml

Cloroformo	96 ml
Alcohol Isoamílico	4 ml

Envasar en frasco ámbar. Almacenar a 4 °C

## ETANOL AL 70%

Para 100 ml

Etanol absoluto	70 ml
Agua destilada	30 ml

Almacenar a -20 °

## REACTIVOS PARA PCR

DNTS

Para 100  $\mu$ l

Agua Inyectable	60 $\mu$ l
GTP	10 $\mu$ l
ATP	10 $\mu$ l
TTP	10 $\mu$ l
CTP	10 $\mu$ l

Almacenar a -20 °C

INICIADORES *fliC*

Dilución 1/10

Agua inyectable	90 $\mu$ l
Iniciador (S, AS)	10 $\mu$ l

Concentración 10 nM/ $\mu$ l. Almacenar a -20 °C

TAQ POLIMERASA 5 U/ $\mu$ l

Para 15  $\mu$ l

Dilución 1/5 para 1 U/ $\mu$ l

Agua inyectable	10 $\mu$ l
Taq polimerasa	5 $\mu$ l

Almacenar a -20 °C

## REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS

### BUFFER DE CARGA 6X

Xilencianol	0.25%
Azul de Bromofenol	0.25%
Glicerol	30%
Agua destilada o MQ	Cbp

Preparar el glicerol con el agua destilada. Adicionar el azul de bromofenol seguido del xilencianol. Se mezcla perfectamente y se filtra para deshacer grumos. Almacenar a 4 °C

### MARCADOR DE PESO MOLECULAR

Realizar una dilución 1/5 del marcador de peso molecular en buffer 1X como diluyente.

### TAE 50X

Para 100 ml

Tris	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M pH5	100 ml

Poner 50 ml de agua destilada en una probeta con agitación constante, agregar poco a poco el tris hasta que se disuelva perfectamente. Agregar EDTA y ácido acético. Por último aforar al volumen deseado con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

EDTA 0.5 M pH 8

Para 100 ml

EDTA	186.1
------	-------

Ajustar pH a 8 CON NaOH. Almacenar a temperatura ambiente.

BROMURO DE ETIDIO

Bromuro de etidio	10 mg/ml
-------------------	-------------

NOTA: AGENTE CARCINOGENICO Y TERATOGENICO, UTILIZAR  
GUANTES Y CUBREBOCAS.

GEL DE AGAROSA 1 O 2%

Agarosa	1 ó 2 g
TAE 1X	Cbp

Calentar hasta que esté perfectamente homogéneo.

## 12. REFERENCIAS

- 
- <sup>1</sup> Grimont PAD, Weill FX. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars. 9<sup>a</sup> ed. Paris, Francia: OMS, 2007
- <sup>2</sup> Vega MDX. Caracterización parcial del gene OmpA de *Salmonella gallinarum* (tesis de maestría). Distrito Federal (D.F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1995.
- <sup>3</sup> Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>nd</sup> ed. Baltimor (MD), 1994: Williams & Wilkins. 186-215.
- <sup>4</sup> Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2<sup>nd</sup> ed. Baltimor (MD), 2005: Williams & Wilkins: 2(B). 764-800.
- <sup>5</sup> Caffer MI, Terragno R. Manual para la caracterización de *Salmonella*. Buenos Aires, Argentina: INEI, 2001.
- <sup>6</sup> Figueroa OIM, Caracterización de la capacidad de invasión celular y citotoxicidad en macrófagos de *Salmonella gallinarum* CEPA FVA1 (tesis de maestría). Distrito Federal(D.F): Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
- <sup>7</sup> Chacana P. A., H.R. Terzolo. Revisión sobre Pullorosis y Tifosis aviar. Nuevos enfoques para viejos conceptos. Rev Med Vet. 2003; 84(1): 14 –20.
- <sup>8</sup> Norma Oficial Mexicana, NOM-005-ZOO-1993. Campaña Nacional Contra la Salmonelosis Aviar. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural,

---

Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación. México, DF: 1º de septiembre 1994.

<sup>9</sup> Bishop R, Jackson K, Iwamoto M, Fields P, Swerdlow D. Annual Summary *Salmonella*. Atlanta, Georgia: CDC, 2006

<sup>10</sup> Braden RC, Bean N, Fields P, Tauxe RV. Annual Summary *Salmonella*. Atlanta, Georgia: CDC, 2002

<sup>11</sup> Cárdenas JA, Sánchez CE, Garza MF *et al.* Informe de evaluación nacional, Subprograma de salud animal. México, D.F.: SAGARPA, 2006

<sup>12</sup> Informe de notificación de enfermedades de la lista de la OIE, primer semestre 2010.

<sup>13</sup> Informe semanal sobre enfermedades y plagas de reporte obligatorio inmediato, semana 6 de 2010

<sup>14</sup> Sánchez JMM, Cardona CNM. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio* 2003; 7 (1): 22-28.

<sup>15</sup> Friebel A, Ilchmann H, Aepfelbacher M, Ehrbar K, Machleidt W, Hardt WD. SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* Activate Different Sets of RhoGTPases of the Host Cell. *JBC*. 2001; 276(36): 34035–34040

<sup>16</sup> Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *PNAS*. 1998; 95(24): 14057–14059

- 
- <sup>17</sup> Murli S, Watson RO, Galán JE. Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. *Cell Microbiol* 2001; 3(12): 795–810
- <sup>18</sup> Figueroa OIM, Verdugo RA. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam de Microbiol*. 2005; 47 (1-2): 25-42.
- <sup>19</sup> González PB, Dreyfus G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico* 2003; 27:45-63.
- <sup>20</sup> Thien LK, Casanova JE. Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cell Microbiol*. 2007; 9 (9): 2103-2111.
- <sup>21</sup> Cornelis GR. The type III secretion injectisome. *Nature Rev Microbiol*. 2006; 4: 811-825.
- <sup>22</sup> González PB, Dreyfus G. Motilidad, biogénesis flagelar y quimiotaxis bacteriana. *BEB*. 1999; 18(4): 142-152
- <sup>23</sup> Kilger G, Grimont PAD. Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *fliC* gene. *JCM*. 1993; 31(5):1108-1110
- <sup>24</sup> Li J, Smith NH, Nelson K, Crichton PB, Old DC, Whittam TS, *et. al.* Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. *J Med Microbiol*. 1993; 38: 129-139.
- <sup>25</sup> Holt PS, Chaubal LH. Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. *JCM*. 1997; 35(4):1016-1020.



- 
- <sup>26</sup> Chapell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunop.* 2009; 128: 53-59
- <sup>27</sup> Ibarra JA, Steele MO. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol.* 2009; 11(11): 1579-1586
- <sup>28</sup> Pitman SD. La supuesta evolución del flagelo. NYC. 2009; abril: 1-14
- <sup>29</sup> Aldridge P, Hughes KT. Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol.* 2002 Apr; 5(2):160-5.
- <sup>30</sup> Iino T. Genetics and Chemistry of Bacterial Flagella. *Bacteriol Rev.* 1969; 33 (4): 454-475.
- <sup>31</sup> Wang Q, Susuky A, Mariconda S, Porwollik S y Harshey RM. Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *EMBO.* 2005; 24: 2034-2042
- <sup>32</sup> Krell T, Lacal J, Muñoz-Martínez F, Reyes-Darias JA, Cadirci BH, García-Fontana C, *et. al.* Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ Microbiol.* 2011; 13(5): 1115-1124.
- <sup>33</sup> Porter SL, Wadhams GH, Armitage JP. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature Rev Microbiol.* 2011; 9: 153-165.
- <sup>34</sup> Genome and Gene. National Center for Biotechnology Information  
Available from: URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <sup>35</sup> Olivares D, Gisbert JP. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Rev Esp Enfrm Dig.* 2006; 98(5): 374-386

- 
- <sup>36</sup> Torres EL, Rodríguez LB. Principales factores de la patogenia en la infección por *Helicobacter pylori*. CENIC Ciencias Biológicas. 2008; 39(1): 53-62
- <sup>37</sup> Castillo GAC, Martínez PLH, Apodaca CNL. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. Vet Mex 2008; 39(1): 81-90
- <sup>38</sup> Parra M, Durango J, Mattar S. Microbiología, Patogénesis, Epidemiología, Clínica y Diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ-CORDOBA 2002; 7(2): 187-200
- <sup>39</sup> Marinovic MMA. Receptores de Tipo Toll y su implicancia en Autoinmunidad. Reumatología. 2005; 21(2); 65-69.
- <sup>40</sup> Fernandez MC. Regulación de la expresión génica por carbohidratos. Rev Endocrinol Nutr. 1998; 6(2) : 34-40.
- <sup>41</sup> Casado PM. Regulación de la expresión génica por glucosa. Anales RANF 2009; 18:125-147
- <sup>42</sup> Thornley JM, Horne RW. Electron Microscope Observations on the Structure of Fimbriae, with Particular Reference to Klebsiella Strains, by the use of the Negative Staining Technique. J Gen Microbiol. 1962; 28: 51-56