



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

Microbiología e Inmunología

**Identificación de epítopes de la proteína PegA de *Salmonella* Enteritidis mediante
despliegue en fago.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
RODRIGO CRUZ BAUTISTA

TUTOR PRINCIPAL:
DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. KAREN MANOUTCHARIAN ARIAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. RUBÉN ZAMORA ALVARADO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

FEBRERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Dedicatoria

A mi familia que siempre me ha apoyado, gracias porque con su formación, educación y cariño he podido llegar hasta este momento.

A mi mamá Julia, por estar siempre conmigo, por su amor incondicional y por siempre estar atenta de mi, a mi papá Rodrigo por enseñarme a siempre ser constante en lo que haga en la vida, a mi hermano Mario con quien compartí y aprendí de la vida y también me ha enseñado a ser perseverante y a mi hermana Carolina quien me ha compartido la alegría de juventud. Sin su acompañamiento esto no hubiera sido posible de la misma manera.

A Zule mi compañera, con quien he compartido lo mejor y que gracias a ella disfruto este camino de vida. Gracias por todo el tiempo compartido, por apoyarme en los momentos difíciles y por estar en los momentos éxito y felicidad. Te amo.

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) pues facilitaron todo para permitir mi desarrollo como estudiante, académico y profesionista.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez de la FMVZ-UNAM por fungir como mi asesor principal, por brindarme todas las facilidades y apoyo para trabajar en el laboratorio que dirige (Laboratorio de Microbiología Molecular) y por su dirección durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por el apoyo y confianza.

A mi comité tutor por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo del proyecto al discutir y proponer en los tutorales, al Dr. Karen Manoutcharian del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (IIB-UNAM) por brindar el apoyo académico y las facilidades para trabajar la técnica de despliegue en fago en su laboratorio, así como la interpretación de los resultados obtenidos. De la misma manera, al Dr. Rubén Zamora Alvarado (IIB-UNAM) por su valiosa aportación académica, por la disposición para la solución de los problemas y discusión de los resultados.

A la M. en Biotecnología María Elena Munguía Zamudio (IIB-UNAM) por su asesoría tanto académica como técnica brindadas durante el proceso de clonación de las bibliotecas y procesos de tamizaje (bioselección).

Al Biólogo Gonzalo Asariel Acero Galindo (IIB-UNAM) por su asesoría en la técnica de ELISA, tanto para la titulación de anticuerpos como para los tamizajes y por la facilitación del anticuerpo anti IgG2b de ratón.

A mis sinodales, la Dra. Inda Marcela Figueroa Ochoa, la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva, y el Dr. Hugo Ramírez Álvarez por sus valiosas aportaciones en la revisión del escrito de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular en la FMVZ, Andrea Navarro, Carlos Vilchis, Cloé Queijeiro, Crecenciano Benítez, Dalia Mendiola, Isaac Del Real, Julio Méndez, Leonardo Villavicencio, Salvador Acevedo y Saúl Cruz, quienes cada seminario y mediante apoyo en el laboratorio aportaron a este proyecto.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Manoutcharian en el IIB, Alán Noé Domínguez, Fernando Martínez, Jesús Guzmán y Josué Odales, quienes aportaron mediante sus conocimientos en la técnica de despliegue en fago.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Salmonelosis	1
1.1.1. Epidemiología	1
1.1.2. Impacto económico	2
1.1.3. Prevención y control.....	3
1.2. <i>Salmonella</i>	4
1.2.1. Taxonomía	4
1.2.2. <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	5
1.2.3. Patogenia	5
1.2.4. Mecanismos moleculares de patogenicidad.....	7
1.2.5. Adherencia	9
1.3. Despliegue en fago	13
1.3.1. Fago filamentosos M13.....	13
1.3.2. Biología del fago M13.....	13
1.3.3. Tecnología de despliegue en fago.....	15
1.3.4. Despliegue en fago para la búsqueda de epítopes	16
II. JUSTIFICACIÓN	18
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVO GENERAL.....	19
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
6.1. Diseño de iniciadores y PCR para <i>pegA</i>	20
6.2. Cepas bacterianas y vectores	20
6.3. Producción de antisuero	20
6.3.1. Precipitación de antisuero con sulfato de amonio	21
6.3.2. Titulación del anticuerpo.....	21
6.4. Generación de bibliotecas de fagos.....	23
6.4.1. Determinación del número de clonas necesarias para representar el gen ..	23
6.4.2. Insertos	23
6.4.3. Vector (Fagémido)	24
6.4.4. Biblioteca de fagos.....	25
6.5. Tamizaje de la biblioteca de fagos	26
6.5.1. Titulación y amplificación de fagos del tamizaje	27
6.5.2. Obtención de fagos de las clonas individuales	28
6.6. Análisis de clonas seleccionadas por ELISA.....	28
6.7. Secuenciación de ADN obtenido de las clonas seleccionadas	29

6.8.	Análisis de las secuencias.....	29
VII.	RESULTADOS	30
7.1.	Diseño de iniciadores.....	30
7.2.	Reacción en cadena de la polimerasa.....	30
7.3.	Producción del antisuero	32
7.3.1.	Precipitación de anticuerpos.....	32
7.4.	Clonación de la biblioteca de fagos	34
7.4.1.	Insertos	34
7.4.2.	Vector (Fagémido)	34
7.4.3.	Número de clonas necesarias para representar el gen	35
7.4.4.	Ligación y transformación	35
7.5.	Tamizaje de la biblioteca	37
7.6.	Obtención y análisis de clonas individuales.....	38
VIII.	DISCUSIÓN	45
IX.	PROSPECTIVA	51
XI.	REFERENCIAS.....	52
XII.	ANEXOS.....	66
12.1.	Protocolos	66
12.1.1.	Componentes para la reacción de PCR en 25 µL:.....	66
12.1.2.	Elaboración de inóculo para la obtención del antisuero	66
12.1.3.	Prueba de aglutinación con el antígeno K polivalente	67
12.1.4.	Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio	67
12.1.6.	Sensibilización y bloqueo de placa de ELISA.....	69
12.1.7.	Concentración de ADN (eliminación de oligos)	69
12.1.8.	Transformación de células <i>E. coli</i> por electroporación.....	70
12.1.9.	Clonación, rescate y precipitación de la biblioteca de fagos (en matraz):	70
12.1.10.	Titulación de fagos.....	71
12.1.11.	PCR de colonia	73
12.1.12.	Clonación, rescate y precipitación de la biblioteca de fagos (en placa de 96 pozos)	73
12.2.	Soluciones:	74

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Esquema, patogenicidad de <i>Salmonella</i> Enteritidis en aves _____	6
Figura 2. Mecanismos Moleculares de Patogenicidad de <i>Salmonella</i> _____	8
Figura 3. Ensamblaje de fimbria por la vía Chaperon - Acomodador _____	10
Figura 4. Fago M13 _____	14
Figura 5. Genoma del fago filamentoso M13 _____	14
Figura 6. Componentes genéticos del fagémido _____	15
Figura 7. Diluciones para titulación de anticuerpos _____	22
Figura 8. Gel de agarosa, producto de PCR <i>pegA</i> _____	31
Figura 9. Gel de agarosa, ensayo de digestión, <i>pegA</i> con <i>EcoRI</i> _____	32
Figura 10. Precipitación de anticuerpos, gel de agarosa con fracciones séricas _____	33
Figura 11. Resultado de OD de ELISA, titulación de anticuerpo _____	33
Figura 12. Gel de agarosa, digestión de <i>pegA</i> con DNAsa I _____	34
Figura 13. Gel de agarosa, pG8SAET lineal purificado _____	35
Figura 14. Gel de agarosa, productos de PCR: variabilidad de clonas _____	37
Figura 15. ELISA de 44 clonas individuales _____	39
Figura 16. ELISA de 10 clonas individuales _____	40
Figura 17. Gel de agarosa, productos de PCR de las clonas seleccionadas _____	40
Figura 18. Predicción <i>in silico</i> del plegamiento de PegA _____	42
Figura 19. Localización de los epítopes en PegA _____	43
Figura 20. Alineamiento de los residuos en el epítope 1 con la herramienta BLAST _____	44
Figura 21. Alineamiento de los residuos en el epítope 2 con la herramienta BLAST _____	44

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Protocolo de inoculación para producción de antisuero _____	21
Cuadro 2. Iniciadores para <i>pegA</i> _____	30
Cuadro 3. Gradientes de temperatura para PCR _____	30
Cuadro 4. Componentes de la reacción de PCR _____	31
Cuadro 5. Condiciones de la PCR _____	31
Cuadro 6. Iniciadores en pG8SAET _____	36
Cuadro 7. Título de fagos en los eluidos _____	38
Cuadro 8. Secuencia de nucleótidos en insertos _____	41
Cuadro 9. Secuencia de aminoácidos de epítopes identificados _____	42

Abreviaturas

aa	Aminoácidos
°C	Grados Celsius
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América
g	Gramos
<i>g</i>	Gravedades
h	Hora
kDa	Kilo Daltones
kg	Kilogramos
kV	KiloVolts
Lb	Libras
L	Litros
M	Molar
mM	Milímolar
μM	Micromolar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetros
μL	Microlitro
μF	MicroFaraday
min	Minuto
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
Ω	Ohms
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
pM	Picomolar
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
UFC	Unidades formadoras de colonia
v/v	Volumen/volumen
V	Volts
%	Porcentaje

Resumen

En este trabajo se llevó a cabo la clonación de una biblioteca a partir del gen que codifica para la subunidad PegA y se logró la expresión de los péptidos recombinantes con tamaños de 10 a 30 aa aproximadamente sobre la superficie del fago filamentoso M13. Mediante un escrutinio de bioselección donde se enfrentó la biblioteca de fagos contra un suero de aves infectadas con SE se identificaron dos secuencias de aminoácidos codificadas en la clona E2_1 en dos marcos de lectura distintos, RYAAVENTVTPGSVEQLIHELVT y TANPRISFNRSQFVDN en los ORF+1 y +3 respectivamente. En la primera secuencia se identificaron dos regiones de 5 residuos cada una (AAVEN y PGSVE) expuestas hacia la superficie en caras opuestas de la proteína y 7 residuos de la segunda secuencia (NRSQFVD). La segunda puede haberse expresado debido a que es común que *E. coli* tenga saltos de nucleótidos en los ribosomas. Las secuencias fueron mapeadas en el análisis de la predicción tridimensional para la proteína PegA y se determinó tanto su localización como accesibilidad para su detección por anticuerpos. Además, se observó en la primera secuencia que existe una sustitución de 6 aminoácidos de las cuales, dos son sinónimas pues estos residuos tienen características similares a los que sustituyen. Éstos están seguidos por tres residuos más que conforman PegA (VLT). Aquí se demostró que es viable la construcción de una biblioteca a partir de genes fimbriales y su escrutinio con un suero generado en un ave para la identificación de epítopes. La identificación de éstos es un primer paso para el desarrollo de pruebas diagnósticas y candidatos vacunales que impidan la adherencia de la bacteria a las células hospederas, debido a que se ha demostrado que la fimbria Peg tiene un papel importante en la colonización del ciego en aves, en células en cultivo, así como en el hígado y bazo de ratones.

Abstract

In this work a phage library was cloned from the PegA coding gen and the recombinant peptides of sizes from 10 to 30 aminoacids were expressed on the surface of filamentous phage. After the biopanning process where the library was confronted against SE infected chicken serum, two aminoacids sequences coded in E2_1 clone were identified, in two different open reading frames RYAAVENTVTPGSVEQLIHELVT and TANPRISFNRSQFVDN, in ORF+1 and +3 respectively. The second sequence could be expressed because its common that *E. coli* make frameshifting in the ribosomes. It is common that *E. coli* makes frameshifting in ribosomes, for that reason, the second sequence could have been expressed. Residues were mapped and in a 3D representation of the PegA folded protein, in which the antibody localization and accessibility was determined. In the first sequence two regions of 5 residues (AAVEN and PGSVE) that are exposed to the surface in opposite faces of the protein were identified and in the second sequence one of 7 residues (NRSQFVD). Furthermore, in the first sequence a substitution of 6 aminoacids was detected in which two of them were a conservative replacement as these residues have similar characteristics with those that substitute. This are followed by three more residues that are in PegA (VLT). Here we demonstrated the viability of constructing a phage library from fimbrial genes and the biopanning with chicken sera for epitope identification. The identification of this is a first step to the development of diagnostic probes and vaccine candidates that prevent the adherence of the bacteria to the host cell, because it has been shown that the Peg fimbria plays an important role in the colonization of chicken's caeca, cultured cells and mice liver and spleen.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial causada por el género *Salmonella* que afecta mamíferos, aves, anfibios y reptiles (Bennett, Dolin and Mandell, 2010; OMS, 2018) y es una de las principales causas de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) (EU EFSA, 2011; US FDA, 2015).

Varios alimentos se han implicado en los brotes debidos a *Salmonella enterica*; sin embargo, los alimentos de origen animal y, específicamente los productos y subproductos de la avicultura incluyendo carne y huevo, se han visto implicados en mayor medida. Los principales serotipos asociados a ETAs son *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) y serovar Typhimurium (ST) (CDC, 2014; EU EFSA, 2017). En humanos estas serovariedades provocan gastroenteritis que puede ir de media a grave caracterizada por diarrea, fiebre, dolor abdominal y deshidratación (CDC, 2012; OMS, 2018). En algunos pacientes se puede presentar bacteremia y septicemia (Bhunja, 2008).

En aves SE provoca la paratifoidea aviar, que en casos agudos provoca la muerte súbita mientras que en los crónicos las aves presentan diarrea fétida de color amarillento, pérdida del apetito, debilidad y disminución en la ganancia de peso y postura de huevo (Flores Castro, 1981; Bagust, 2012).

1.1.1. Epidemiología

Los registros de casos en animales en la mayor parte del mundo se limitan a reportes clínicos sin aislamientos que corroboren la presencia de la bacteria. Por otro lado, en países desarrollados como los miembros de la Unión Europea a través de la European Food Safety Authority (EFSA) y en Estados Unidos a través de los National Veterinary Services Laboratories (NVSL) se llevan registros anuales del número de aislamientos y cepas presentes en humanos, así como en distintas especies animales. El reporte de la EFSA de 2017 indica que durante 2016 se aisló *Salmonella* spp. del 5.18% de todas las aves de producción (engorda y postura), el 2.71% de las gallinas de postura fueron positivas a *Salmonella* spp. por lo que la prevalencia de SE en gallinas de postura fue del 1.21% (EU EFSA, 2017). Por su parte los NVSL reportaron en 2016 que durante 2014 *Salmonella* fue aislada del 3.7% del total de muestras de aves tomadas durante ese año; y que tanto SE como

ST fueron las principales serovariedades (USDA, 2016). En México, únicamente se elaboran reportes clínicos que sugieren la infección por *Salmonella* y solo en algunos casos se llega al aislamiento, pero no se llega a la clasificación de serovariedades (Mancera-Martínez, Navarrete-Vázquez and Zeckua-Heneidi, 2004).

En salud pública, mundialmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima decenas de millones de casos de salmonelosis en humanos cada año que resultan en cientos de miles de muertes. Desde principios de los años 90's han surgido cepas resistentes a los antimicrobianos y que han hecho que sea considerada actualmente como un serio problema de salud pública (World Health Organization. and Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2002). También se ha observado que a partir de 1980 se produjo un aumento mundial de casos de infecciones por SE en humanos. La EFSA reporta 94,530 casos de salmonelosis confirmados en humanos durante 2016; SE fue la principal serovariedad asociada a la enfermedad en personas que se infectaron al consumir huevo y sus subproductos, representando el 48.5% del total de los brotes y además, durante este mismo periodo el 0.1% del huevo para consumo fue positivo a *Salmonella* spp (EU EFSA, 2017). Los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) reportaron 46,623 casos de salmonelosis en humanos durante el 2014, SE también fue reportada como la principal serovariedad (CDC, 2014).

En México la Dirección General de Epidemiología (DGE) reporta los casos de salmonelosis como casos de fiebre tifoidea, paratifoidea y otras salmonelosis. Hasta la semana 52 de 2017, se reportaron 90,477 casos de salmonelosis pero no se identificaron las especies y serotipos involucrados (Zaidi, Macías and Calva, 2006; Dirección General de Epidemiología., 2017). En un estudio hecho de serotipificación en humanos, en el cual de 24,349 cepas de *Salmonella* aisladas de humanos entre 1972 y 1999 se identificaron 199 serovariedades donde la más comúnmente aislada desde 1991 fue SE (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000).

1.1.2. Impacto económico

Las principales pérdidas económicas están asociadas a la cantidad de huevo para consumo humano que se dejan de producir. Aves de postura aparentemente sanas pueden disminuir su producción anual de 10 a 20% (Flores Castro, 1981). México es uno de los principales productores de huevo a nivel mundial ocupando el cuarto lugar detrás de China, Estados Unidos e India. Para el año 2017 se produjeron 2 745 millones toneladas de huevo para plato

siendo el consumo per cápita de 22.8 Kg, esto posiciona a México como el primer lugar en consumo de huevo fresco a nivel mundial. La industria avícola participó en el 63.8% de la actividad pecuaria del país, del cual el 29% corresponde a la producción de huevo (UNA, 2018). Además, la contaminación del huevo puede representar problemas para el comercio nacional e internacional. En 2004 se determinó la presencia de *Salmonella* Enteritidis en el huevo para consumo en la Ciudad de México. Para este se muestrearon 400 huevos de 10 marcas. De estos se obtuvieron 131 aislamientos de 12 géneros bacterianos y uno de SE a partir de yema. Esto representó 0.25% de las muestras (Mancera-Martínez, Navarrete-Vázquez and Zeckua-Heneidi, 2004). También es importante considerar los gastos excesivos que representan la prevención, control y erradicación de la enfermedad tanto en aves como en humanos, la baja incubabilidad y fertilidad del huevo que trae pérdidas económicas pues además de que los pollitos pueden nacer enfermos se ve afectada la capacidad de reemplazo de aves para postura y pollo de engorda (EU EFSA, 2004).

1.1.3. Prevención y control

En México no existe ningún documento de referencia para el control de SE en aves o humanos. En otros países el control se lleva a cabo mediante un estricto protocolo de bioseguridad que requiere de una gran inversión en instalaciones, equipo, químicos y capacitación de personal. Además, se realizan tratamientos al agua y comida para evitar el crecimiento de bacterias, también se aplican sistemas de exclusión competitiva permitiendo la colonización de bacterias benéficas en el intestino de las aves; este manejo se realiza con la adición de prebióticos y probióticos (EU EFSA, 2004, 2011; CDC, 2012).

El principal objetivo en el control de *Salmonella* es la prevención utilizando buenas prácticas de manejo e higiene para evitar la infección sistémica y su localización en el tracto reproductivo, así como reducir la eliminación de la bacteria por vía fecal y la contaminación del huevo por esta vía.

1.1.3.1. Vacunación

Existen vacunas vivas y atenuadas; se ha demostrado que estas evitan que las aves presenten signos, pero no eliminan la situación de los portadores asintomáticos.

La inmunización con estas vacunas es una práctica común en la industria avícola que busca prevenir la colonización para disminuir la excreción fecal y prevenir la infección sistémica

que deriva en la contaminación del huevo por la vía horizontal (Gast, 2007). Las desventajas de las vacunas basadas en bacteria inactivada son que fallan al no poder inducir una inmunidad mediada por células, la cual es importante en la eliminación de *Salmonella* (Lax *et al.*, 1995) y al no estimular una respuesta humoral a nivel de mucosa con IgA secretora que es esencial para la protección (Cerquetti and Gherardi, 2000). Por esto, las vacunas vivas atenuadas son utilizadas alrededor del mundo pues han demostrado su eficacia al desafío (Papezova *et al.*, 2008; Atterbury *et al.*, 2010) pero no logran eliminar la presencia de la bacteria en órganos ni su excreción, además de que en aquellas basadas en la delección génica existe el riesgo de una reversión a la virulencia. Por esto, solo algunas han sido aceptadas y se utilizan en países de la Unión Europea (EU EFSA, 2004).

En México se comercializan vacunas inactivadas contra *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium de manera individual o en combinación con otros antígenos y que son reguladas por la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Estas vacunas se reportan como efectivas para disminuir la excreción y presentación de enfermedad ocasionada por SE y se indican para inmunizar tanto de aves de postura como reproductoras, pero no garantizan la eliminación completa de la bacteria.

1.2. *Salmonella*

El género *Salmonella* está conformado por bacilos negativos a la tinción de Gram, móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y *Pullorum*) y son anaerobios facultativos. Poseen tres antígenos principales: H (flagelo), O (somático) y Vi (capsular), éste último solo lo poseen algunas serovariedades como *S. Typhi*. Fermentan la glucosa, frecuentemente con producción de gas, reducen los nitratos a nitritos, descarboxilan lisina y ornitina, y son negativos a la prueba de oxidasa (Wray and Wray, 2000).

1.2.1. Taxonomía

Actualmente, se usan diferentes sistemas taxonómicos para referirse a la nomenclatura del género *Salmonella*, la cual ha evolucionado del concepto inicial donde cada serotipo correspondía a una especie propuesto por Kauffmann (1934) a través de la identificación serológica de los antígenos “O”, “H” y “Vi”. También se clasifican por sus características bioquímicas que dividen a los géneros en subgéneros y más recientemente con la relación genómica entre ellas (Morse, 1996; Brenner *et al.*, 2000). El sistema más aceptado es

utilizado por el CDC y es recomendado por la OMS; este divide al género *Salmonella* en dos especies: *enterica* y *bongori*. A su vez, la especie *enterica* se subdivide en 6 subespecies, *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). La subespecie *enterica* actualmente incluye a más de 1500 serovariedades las cuales se escriben sin itálicas y con la primera letra en mayúscula para abreviar (Grimont and Weill, 2008; CDC, 2012). Por esto de ahora en adelante, en este trabajo se referirán las serovariedades con letra mayúscula y sin letra cursiva.

1.2.2. *Salmonella* Enteritidis

Es una serovariedad altamente prevalente en aves de engorda y de postura. Es la principal serovariedad asociada a casos de salmonelosis en humanos que contraen la enfermedad al consumir alimentos contaminados alrededor del mundo. Estudios epidemiológicos indican como principales fuentes al huevo y sus subproductos, aunque también se asocia al consumo de carne de pollo, bovino y vegetales contaminados. Existen otras serovariedades que infectan el huevo, como *S. Gallinarum*, *Pullorum*, *Infantis* y *Virchow*, entre otras pero hasta ahora no se ha dilucidado completamente por qué *Enteritidis* es el más exitoso (EU EFSA, 2007). Este microorganismo puede contaminar el huevo por la parte externa del cascarón o al interior, esto se sabe dado que esta serovariedad ha sido aislada de la yema y albúmina aún después de un proceso de limpieza y desinfección del cascarón (Braden, 2006; CDC, 2014; EU EFSA, 2017). La bacteria se incorpora al huevo durante su formación en el tracto reproductivo (Keller *et al.*, 1995; Gantois *et al.*, 2009), pues tiene una mayor capacidad de colonizar en ovario y oviducto que otras serovariedades (Gantois *et al.*, 2008, 2009).

1.2.3. Patogenia

Existen dos vías de transmisión para *Salmonella* Enteritidis, la horizontal y la vertical (**figura 1**). La transmisión horizontal es fecal – oral y se da a través del contacto con heces de animales o humanos infectados. Una vez que la bacteria ha sido ingerida pasa a través del esófago, llega al proventrículo y molleja (estómago muscular) donde sobrevive a las condiciones ácidas y a enzimas como la pepsina. Después recorre el intestino delgado pasando por el duodeno, yeyuno e íleon, en esta última sección es donde la bacteria adquiere un contacto estrecho con los enterocitos mediada por estructuras bacterianas conocidas como adhesinas. También puede colonizar los ciegos en el intestino grueso. Una vez adherida a las

células inicia un proceso de internación mediante la modificación del citoesqueleto de células no fagocíticas. Durante este proceso y la sobrevivencia dentro de las vacuolas, la bacteria lleva a cabo la liberación de endotoxinas, su translocación en la lámina propia del intestino provoca una respuesta quimiotáctica que conlleva a una respuesta inflamatoria y a la destrucción del tejido. Estos eventos llevan a la producción de IL-8, la migración de polimorfonucleares (PMN) y a la pérdida de líquidos provocando diarrea. Cuando hay lisis de las células del epitelio, las bacterias se liberan y son arrastradas por líquidos o heces hacia el exterior. El daño en el intestino impide una correcta absorción de líquidos y nutrimentos lo que lleva al animal a una disminución en sus parámetros reproductivos y reproductivos, depresión e incluso puede ocasionarle la muerte (Bhunja, 2008; US FDA, 2015). En el caso de los portadores asintomáticos la bacteria es eliminada a través de las secreciones de la vesícula biliar y finalmente en las heces. Por otro lado, se sabe que el huevo puede ser contaminado de manera horizontal cuando es ovopositado y entra en contacto con heces que se encuentran en el exterior (Flores Castro, 1981).

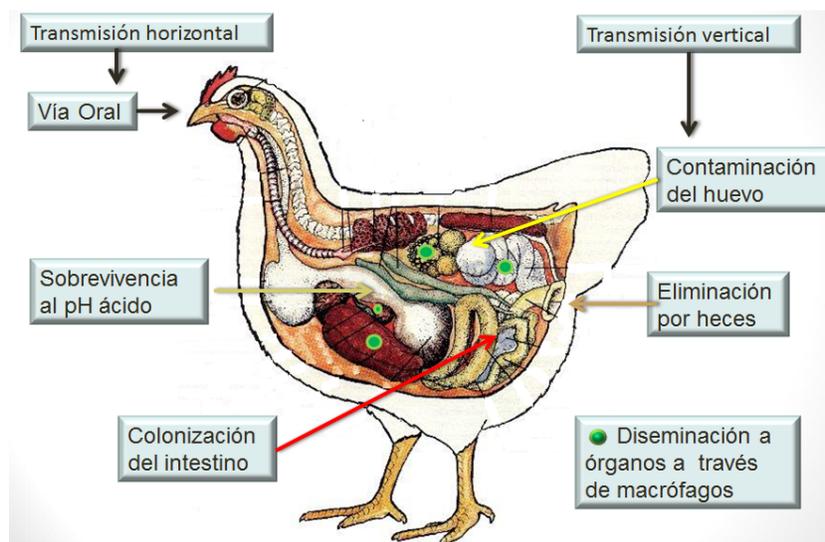


Fig. 1 Esquema donde se muestra la patogenicidad de *Salmonella* Enteritidis en aves. Vía de transmisión vertical y horizontal. (Modificado de Jaime PA.)

En aves la vía vertical se refiere a la infección directa del contenido del huevo antes de la ovoposición, como resultado de la colonización de órganos como el ovario y el oviducto del tracto reproductivo de las aves por *Salmonella*. Durante la colonización del intestino la

bacteria puede atravesar la mucosa a través de células M en las placas de Peyer, de este modo puede llegar por vía linfática a otros órganos y colonizarlos, como es el caso del ovario y oviducto (Thiagarajan, Saeed and Asem, 1994).

1.2.4. Mecanismos moleculares de patogenicidad

La primera barrera que debe superar *Salmonella* es el pH ácido del proventrículo y ventrículo provocado por el ácido clorhídrico (HCl). Factores como el consumo de alimentos ricos en grasas o con altos contenidos de proteína y el incremento del pH pueden proteger a *Salmonella* del contenido ácido, pero, además cuenta con mecanismos que buscan mantener el pH intracelular constante (7.6 – 7.8) como las bombas de protones que extraen iones del citoplasma y sistemas que inducen la descarboxilación de la lisina y arginina. Otro mecanismo es la síntesis de proteínas de choque ácido (Synthesis of acid shock proteins o ASPs) con el objetivo de prevenir o reparar el daño causado por el ácido (Lin *et al.*, 1995; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). Además, la sustitución de ácidos grasos insaturados por saturados en la membrana bacteriana se ha asociado a su sobrevivencia cuando se enfrenta a pH bajos en el estómago (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2008).

Luego en el intestino debe resistir la acción de sales biliares que tienen un efecto detergente que disuelve la membrana de la bacteria, además pueden inducir la formación de estructuras secundarias en el ARN, daño al ADN y desnaturalizando proteínas lo que impide su correcto ensamblaje. Los principales mecanismos por los cuales puede superar estas barreras incluyen bombas de flujo, sistemas de dos componentes, regulación transcripcional y proteínas involucradas en la regulación del ADN y el mantenimiento de la integridad de la membrana. También se sabe que *Salmonella* puede sobrevivir en la vesícula biliar, tanto de manera intracelular como extracelular formando biopelículas. Proteínas como Fnr y ArcAB le permiten regular la actividad metabólica en ambientes anaeróbicos, el primero es un sensor citoplasmático capaz de unirse a secuencias promotoras e interactúa con la subunidad RpoA de la ARN polimerasa para incrementar la eficiencia de la transcripción de genes requeridos para el metabolismo anaeróbico y reprime los asociados al transporte de electrones. (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011; Wagner and Hensel, 2011).

Una vez que la bacteria se ha adherido a los enterocitos activa un SST-III codificado en la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1) que atraviesa la membrana de la célula huésped. Éste transloca proteínas efectoras que promueven el reordenamiento del

1.2.5. Adherencia

La adhesión es necesaria para contrarrestar el peristaltismo del intestino y poder así iniciar la colonización. El contacto estrecho entre la célula hospedera y la bacteria es necesario para diversos eventos como la formación de biopelículas o la translocación de proteínas que permitan la entrada a la célula (Wagner and Hensel, 2011; Agnès *et al.*, 2014). Existen tres categorías para los sistemas de adhesión en *Salmonella*: adhesinas fimbriales como la fimbria ensamblada por la vía chaperón acomodador (CUP), la fimbria polar larga (Lpf) y la pequeña fimbria agregativa (Tafi), las adhesinas afimbriales que comprenden a adhesinas mono y oligoméricas secretadas por un Sistema de Secreción Tipo I y V (SST-I y V) a través de la membrana bacteriana. Por último están las adhesinas atípicas, estructuras en la superficie de la membrana cuya función principal no es la adhesión pero que pueden tenerla, por ejemplo el flagelo (Wagner and Hensel, 2011).

1.2.5.1. Adhesinas fimbriales

Las fimbrias son apéndices proteínicos en la superficie de la membrana externa de entre 0.5-10 μm de largo y 2-8 nm de ancho. (Agnès *et al.*, 2014). Existen distintas clasificaciones para las fimbrias pero la más ampliamente utilizada está hecha con base en los sistemas de ensamblaje: las ensambladas vía el sistema CUP (**figura 3**), por el sistema de secreción general, por el sistema de enucleación precipitación y por el camino alterno de las chaperonas (Soto and Hultgren, 1999; Ofek, Bayer and Abraham, 2013) siendo las primeras las más comunes dentro del género (Porwollik, 2011).

Hasta ahora se han identificado 13 operones fimbriales en SE (McClelland *et al.*, 2001; Nuccio and Baumler, 2007; Yue *et al.*, 2012; Łaniewski *et al.*, 2017) de los cuales se conocen algunos receptores, por ejemplo, la fimbria tipo 1 se une a células eucariontes que expresan el receptor α -D manosa (Korhonen *et al.*, 1980), la Lpf media la adhesión de ST con las placas de Peyer mientras que la Pef (Plasmid Encoded Fimbria) se une al carbohidrato del grupo antigénico sanguíneo Lewis X presente en el intestino delgado de ratones (Bäumler *et al.*, 1996; Chessa *et al.*, 2008). La fimbria Std se une a receptores Fuc α 1-2 presentes en la mucosa del ciego de ratones así como, en células Caco-2 (Chessa *et al.*, 2009) y que la Tafi interactúa con glicoproteínas de la matriz extracelular (Agnès *et al.*, 2014).

Se ha observado que al inmunizar ratones con ST se producen anticuerpos en contra de las subunidades fimbriales AgfA, BcfA, FimA, LpfA, PefA, StbA, StcA, StfA, SthA y StiA

(Weening *et al.*, 2005) lo que produce anticuerpos IgA secretores que impiden su función e inducen una respuesta inmune protectora (Wagner and Hensel, 2011).

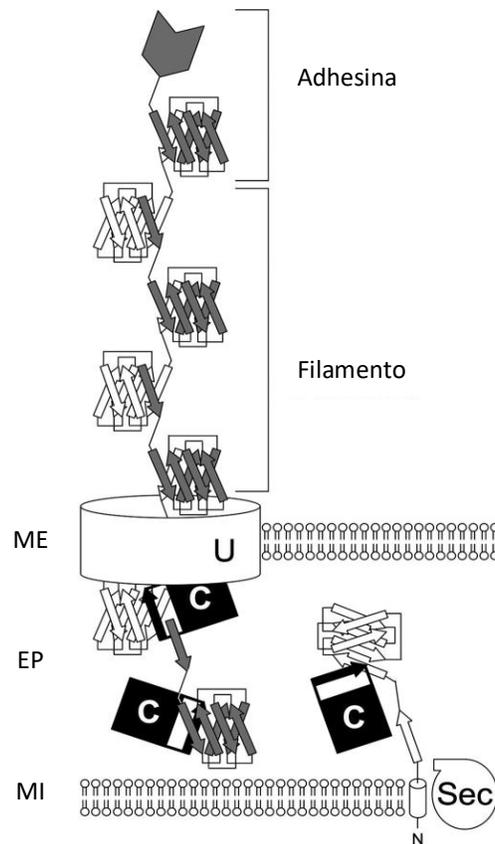


Fig. 3 Ensamblaje de fimbria por la vía chaperona acomodador. ME: membrana externa. EP: espacio periplásmico. MI: membrana interna. C: proteína chaperona. Sec: sistema general de secreción. U: proteína acomodadora (*Usher*). Tomado y modificado de: Andreas J. Bäuml, 2007.

1.2.5.2. Operón fimbrial *peg*

El operón fimbrial *peg* es ensamblado por la vía CUP (Nuccio and Bauml, 2007) y se encuentra restringido a las serovariedades Enteritidis, Gallinarum y Paratyphi B (Clayton *et al.*, 2008). Este presenta un 75% de homología con el operón *stc* de ST LT2 (Thomson *et al.*, 2008) y ha sido asociado a la invasión de células Caco-2 y LMH, mientras que en un modelo murino la ausencia de este impide la colonización de hígado y bazo. El gen *pegA* codifica para la subunidad fimbrial mayoritaria que compone el filamento, está relacionada con la adhesión y se ha demostrado que para SE tiene un rol importante en la colonización del ciego y oviducto en aves (Clayton *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012). Mediante una

inmunización con la mezcla de las subunidades StbA y PegA se ha demostrado que existe una protección en ratones contra el desafío con ST (Weening *et al.*, 2005; Velge *et al.*, 2012).

1.2.5.3. Terapias anti-adhesión

Las bacterias han evolucionado una gran cantidad de mecanismos que le permiten interactuar de manera estrecha con su célula huésped para manipular la señalización celular y facilitar su colonización. La mayoría de ellos, si es que no todos, dependen de la adhesión (Stones and Krachler, 2016).

Varios estudios han reportado el desarrollo y uso de anticuerpos o antisueros contra adhesinas bacterianas. El huésped puede ser inmunizado activa o pasivamente utilizando una adhesina bacteriana, una subunidad de la adhesina o el fragmento de un péptido de la misma. La inoculación de la combinación de varias fimbrias o subunidades también ha sido reportada (Krachler and Orth, 2013). Puesto que la habilidad de la fimbria para alargar y retraer el filamento reduce el desprendimiento de las superficies se puede suponer que la disrupción de una fimbria funcional mediante su inhibición puede tener un alto potencial para su uso como vacuna para prevenir enfermedades (Singh *et al.*, 2017). Algunos ejemplos de este tipo de estrategias son la obtención de anticuerpos contra fimbrias de *E. coli* SS142 en conejo, estos inhibieron y revirtieron la adhesión en células de intestino humano 407 además de inhibir la actividad de hemoaglutinación (Mett, Kloetzlen and Vosbeck, 1983). Otro es el de la inmunización de ratones con fimbrias aisladas a partir de *Actinomyces viscosus* T14V, estas generaron altos niveles de IgA secretoria (SIgA) e IgG en glándulas de la región submandibular (Crawford and Clark, 1986). Un caso interesante es el de la inmunización oral de ratones con una vacuna que utiliza como vector una *Salmonella* Typhimuirum atenuada, expresando la fimbria K99 recombinante de *E. coli* ETEC, que generó títulos elevados de IgA e IgG además de una protección del 90% en ratones neonatos inmunizados de manera pasiva (Ascón *et al.*, 1998). En un estudio con la fimbria K88ac de *E. coli*, se demostró de manera *in vitro* que anticuerpos monoclonales generados contra un región variable de la fimbria son capaces de bloquear la adherencia al borde de cepillo en enterocitos y a receptores intestinales de mucina en cerdos (Sun *et al.*, 2000). La adhesina T2544 de *S. Typhi* produce títulos elevados de IgG sérica y SIgA en ratones inmunizados mejorando la fagocitosis y su eliminación (Ghosh *et al.*, 2011). Un abordaje interesante fue el de realizar la fusión de la fimbria Fim2 de *Bordetella pertussis* con la subunidad B de la toxina del cólera para

inmunizar vía intranasal en un modelo murino de infección. Los resultados mostraron que hubo una disminución significativa de bacterias encontradas en pulmón (Olivera *et al.*, 2014). La fimbria CS20 de *E. coli* ETEC también es propuesta como inmunógeno, pues se demostró que anticuerpos contra esta aumentan la fuerza necesaria para desenrollar la fimbria y se acorta su longitud, esto impediría teóricamente *in vivo* la correcta unión al intestino e invasión (Singh *et al.*, 2015).

Recientemente se ha demostrado, utilizando microscopia de fuerza atómica (AFM) y por espectroscopia de fuerzas que las características biomecánicas de la resistencia de la fimbria CFA/I de *E. coli*, llamadas fuerza de extensión y longitud de extensión, son significativamente alteradas por la unión de anticuerpos policlonales bivalentes contra la subunidad mayoritaria de la fimbria. Proponen que el mecanismo por el cual los anticuerpos interrumpen el desenrollamiento natural de la fimbria es uniendo las capas del filamento helicoidal incrementando su rigidez y reduciendo su resistencia (Singh *et al.*, 2017).

Una de las mayores desventajas de las terapias antiadhesión es el alto grado de redundancia en las estrategias de adhesión en bacterias que en muchos casos interfieren con la efectividad del tratamiento. Sin embargo, existen muchas adhesinas que se encuentran altamente conservadas, lo que hace que sean buenos candidatos vacunales (Krachler and Orth, 2013). Por otro lado la utilización de anticuerpos o vacunas anti-adhesión puede aún así seguir siendo efectiva pues la opsonización puede incrementar la fagocitosis y eliminación por macrófagos y pueden iniciar la activación del complemento aún si no pueden inhibir la adhesión (Ghosh *et al.*, 2011).

Para el caso de *Salmonella* no se ha abordado la terapia anti-adhesión pero se sabe que la respuesta inmune humoral es importante ya que se ha observado que la producción de SIgA en contra de estructuras como el flagelo y el antígeno “O” del LPS de *Salmonella* Typhi impiden la colonización y promueven su eliminación por medio de una respuesta mediada por células en humanos (Iankov *et al.*, 2001, 2002). En el caso de aves se disminuye la gravedad de la infección así como la colonización de tejidos pero no eliminan a los portadores asintomáticos (Gast, Stone and Holt, 1993; Gantois *et al.*, 2006) y es que se ha observado en ratones que por lo menos para el caso de las serovariedades Enteritidis y Typhimurium se puede conferir protección a través de SIgA contra el antígeno “O” pero no con anticuerpos contra el antígeno “H” (Carter and Collins, 1974; Michetti *et al.*, 1992; Iankov *et al.*, 2004).

En gallinas infectadas naturalmente con SE, se han detectado anticuerpos séricos IgG y SIgA (Hassan *et al.*, 1991). Altos niveles de anticuerpos se correlacionan con una menor morbilidad, mortalidad, disminución en la colonización de órganos, así como la disminución en la excreción en heces y en huevo (Gast, Stone and Holt, 1993; Gantois *et al.*, 2006). Se ha medido la cantidad de anticuerpos producidos mediante Western Blot, para las porinas, proteína de la membrana externa A (OmpA), fimbria de SE (SEF) 14, SEF21, lipopolisacárido (LPS) y flagelina. Se encontró que hubo una alta frecuencia de sueros positivos cuando se enfrentaron con porinas (97.3%), LPS (81.8%), Omp de 22.1 kDa (66.2%), OmpA (64.7%), SEF21 (60.8%), SEF14 (50%) y flagelina (47.3%) (Liu *et al.*, 2001; Ochoa-Repáraz *et al.*, 2004; Salazar-González *et al.*, 2004).

1.3. Despliegue en fago

1.3.1. Fago filamentoso M13

Es un bacteriófago filamentoso lisogénico de familia *Inoviridae* de entre 6-7 nm de diámetro por 900 nm de largo y de ADN de cadena sencilla en sentido positivo (Rakonjac, 2012). La característica que lo han hecho elegible para desarrollar técnicas de biología molecular es que, en contraste con otros fagos este requiere de poco esfuerzo técnico y metodológico para purificarlo y utilizarlo (Rami *et al.*, 2017) (**figura 4**).

1.3.2. Biología del fago M13

El fago es capaz de infectar células de *E. coli* que contienen el plásmido conjugativo F' y que expresan pili sexual, ya que esta se inicia al interactuar la parte final del fago con la punta del pili. La retracción del pili por depolimerización en la membrana externa facilita el proceso de transferencia de ADN (Webster, 1996).

Su genoma consta de 6407 pb y codifica para tres grupos de proteínas: las involucradas con la replicación (pII, pX y pV), las morfogénicas (pI y pIV) y las estructurales (pVIII, pIII, pVI, pVII y pIX) (**figura 5**). Estas últimas tres se conforma la cápside, pVIII como proteína mayoritaria (~2700 copias) y pIII (5 copias) y pVI (4 copias) como minoritarias a los extremos del fago (Henry and Pratt, 1969). Una vez que el ADN de cadena sencilla (ssDNA) en sentido positivo entra al citoplasma pasa a ADN de doble cadena (dsDNA) para establecer la forma replicativa (RF), esto gracias a las enzimas propias de la bacteria. La proteína pV se une a las moléculas de ssDNA e inhibe su transformación a la RF (Pini and Bracci, 2000). El

ensamblaje de las partículas de fago inicia en la membrana interna con ayuda de las proteínas pI, pIV y pXI. Las proteínas pVII y pIX que forman un poro a través de las membranas de la bacteria para la salida del fago. La pV es reemplazada por la pVIII durante su paso por el poro (este se mantiene cerrado hasta que se da el paso del ADN del fago para evitar la lisis de la bacteria) de la ssDNA a la que está unida y al final se añaden pVI y pIII (P. Smith and A. Petrenko, 1997). Durante una primera generación de bacterias infectadas son producidos aproximadamente 1000 fagos por bacteria decreciendo a 100 – 200 en generaciones subsecuentes (Hill and Stockley, 1996).

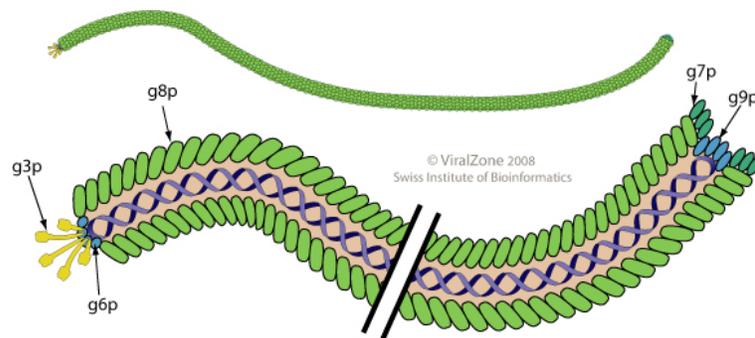


Fig. 4 Fago filamentososo M13. En morado, al centro la cadena de ADN sencilla sentido positivo. Tomado de: www.viralzone.expasy.org

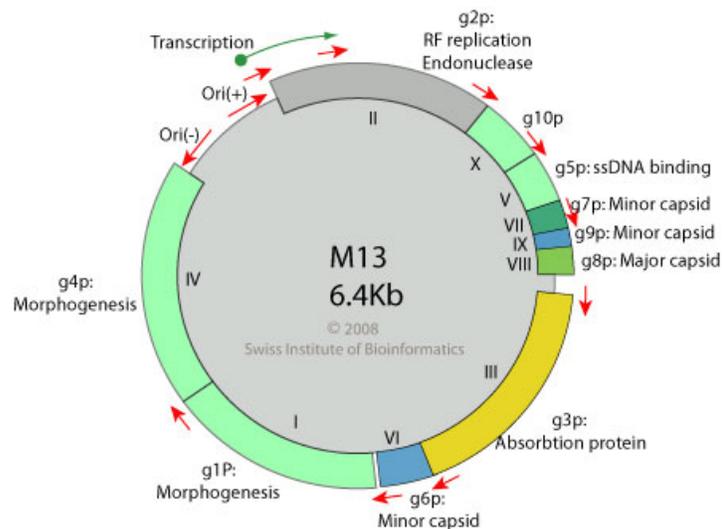


Fig. 5 Genoma completo del fago filamentososo M13. Tomado de: www.viralzone.expasy.org

1.3.3. Tecnología de despliegue en fago

El despliegue en fago es una herramienta que combina técnicas de selección (fenotipo/genotipo) donde un péptido recombinante es desplegado en fusión a una de las proteínas de la cubierta viral y la secuencia de ADN que codifica este péptido se encuentra dentro del genoma. Esta tecnología permite desplegar un gran número de péptidos aleatorios de los cuales se pueden seleccionar aquellos con una alta afinidad de unión a un anticuerpo o molécula de interés (Kügler *et al.*, 2013).

Para esto se lleva a cabo la clonación del ADN de interés en un fagémido. Este incluye un origen de replicación de un plásmido bacteriano, un marcador de selección, una región intergénica o IG (contiene la secuencia de empaquetamiento del fago y el origen de replicación de las cadenas positiva y negativa), el gen de una proteína de la cápside del fago, comúnmente pIII o pVIII (también se han descrito en menor medida con pIX), sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, un promotor y un gen que codifica para un péptido señal (**figura 6**). Adicionalmente se puede incluir una etiqueta para facilitar la detección de los péptidos recombinantes (Qi *et al.*, 2012).

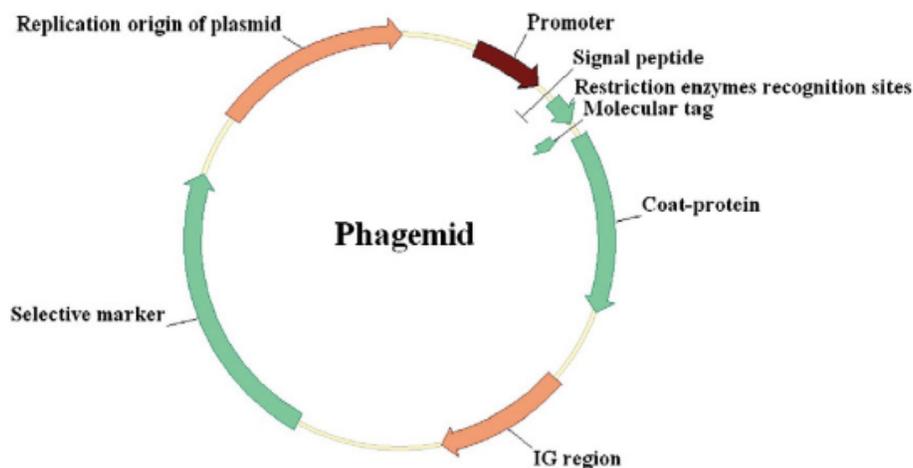


Fig. 6 Esquema de los genes elementales que contiene el vector, “fagémido”. Tomado de: Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. Huan Qi., *et. al.* 2011 Journal of Molecular Biology

Una vez que la secuencia nucleotídica de interés es clonada, el fagémido se transforma en una bacteria que exprese el pili sexual como *E. coli* TG1, que además tiene la capacidad de suprimir el codón ámbar. El fagémido transformado puede ser empaquetado como un fago (Marvin and Hoffmann-Berling, 1963) infectando las bacterias con un fago ayudador o

Helper Phage (HP), tal como M13KO7 (Vieira and Messing, 1987) variando el tamaño de las partículas con base en el tamaño del inserto en el vector (Messing *et al.*, 1977).

El fagémido como tal no es capaz de ensamblar la progenie de fagos, pero puede replicarse como cualquier plásmido bacteriano gracias a su origen de replicación ColE1. Una vez que se infecta con el FH se sintetizan las proteínas necesarias para la replicación en círculo rodante del ssDNA, para la formación del poro a través de las membranas y para la encapsidación del ADN. El origen de replicación en la región IG se activa hasta el momento en que se lleva a cabo la coinfección (Qi *et al.*, 2012). El fago ayudador provee el resto de las proteínas del fago que no están codificadas en el fagémido y puesto que este último tiene su propio origen tanto para la cadena positiva como para la negativa, se replicaran las proteínas de ambos. Pero gracias a un defecto en el origen de replicación en el fago ayudador la cantidad de partículas conteniendo el genoma del HP será mínima en comparación con las que contienen el fagémido (Vieira and Messing, 1987; Petrenko and Smith, 2005).

1.3.4. Despliegue en fago para la búsqueda de epítopes

Los epítopes antigénicos son sitios involucrados en la unión específica con un anticuerpo (epítopes de células B) o con un receptor de células T o TCR (epítope de células T) (Qi *et al.*, 2012). La determinación de la secuencia o estructura de un epítope se utiliza para estudiar interacciones proteína – proteína, desarrollo de inmunoensayos, producción de péptidos vacunales, investigación de la patogenia de enfermedades autoinmunes e investigación de la topología de proteínas en células u organelos por mencionar algunos (Morris, 2014). Así pues, los epítopes se pueden clasificar en dos grupos, los discontinuos y los continuos. Los primeros son también conocidos como epítopes conformacionales, en los cuales el punto de contacto (los residuos de aminoácidos en la proteína) se localizan separados en la secuencia lineal, pero tienen interacción gracias al plegamiento de la proteína. Los segundos, conocidos como secuenciales, están compuestos por residuos de aminoácidos que se encuentran próximos dentro de la secuencia primaria (Lin-Fa Wang, 2009).

Una de las metodologías más utilizadas para la identificación de epítopes es la generación de bibliotecas de fagos que expresan una variedad de péptidos recombinantes. Un tipo de biblioteca es la que genera péptidos al azar, a través de la utilización de oligos sintéticos degenerados. Al tener una combinación de distintos aminoácidos se pueden llegar a obtener

bibliotecas de millones de péptidos recombinantes. Estas son útiles para la identificación de mimótopos entre otras aplicaciones (Wang and Yu, 2004).

Por otro lado se encuentran las bibliotecas de fragmentos de un genoma o gen (Jacobsson and Frykberg, 1995; van Zonneveld *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996), metodología utilizada en el presente trabajo. Esta consiste en la clonación de fragmentos generados por una digestión al azar o por sonicación, lo que hace que el tamaño de los insertos sea menos uniforme. La ventaja de este tipo de bibliotecas es que se pueden identificar epítopes con secuencias idénticas a la proteína original y con un tamaño de biblioteca relativamente menor que cuando se utiliza la metodología anterior (Coley *et al.*, 2001).

El análisis detallado de epítopes es importante para el entendimiento de los eventos inmunológicos, así como para el desarrollo de vacunas y herramientas de diagnóstico más efectivas. Se ha demostrado que ciertos péptidos, a pesar de tener secuencias diferentes a las del epítope nativo de un antígeno son capaces de interactuar con el parátipo de manera similar siendo llamados mimótopos (Wang and Yu, 2004).

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no existen vacunas para aves contra *Salmonella*, que sean capaces de proteger completamente y que eliminen a los portadores asintomáticos. Además, ninguna de las existentes está enfocada en evitar la adherencia de *Salmonella* en las células de aves, lo cual, impediría la invasión y subsecuente colonización. Por otro lado, debido a la antigenicidad cruzada con bacterias Gram negativas, es difícil estandarizar una prueba diagnóstica que permita determinar la presencia de SE, lo que permite que se mantengan parvadas aparentemente sanas, provocando grandes pérdidas económicas debido a su diseminación y pérdidas productivas. De identificarse epítopes de proteínas involucradas en la adherencia, podrían desarrollarse futuros inmunógenos de subunidades capaces de proteger contra la colonización de *Salmonella* en aves y humanos. También permitiría el desarrollo de pruebas diagnósticas específicas para la detección de serovariedades.

III. HIPÓTESIS

Una biblioteca de fragmentos del gen que codifica para PegA de *Salmonella* Enteritidis y clonados en pG8SAET expresará péptidos aleatorios en unión a la proteína pVIII del fago M13, para que mediante una bioselección se determine la secuencia de aminoácidos correspondiente a los epítopes en esta proteína.

IV. OBJETIVO GENERAL

Generar una biblioteca de fagos a partir de *pegA* que permita la expresión de secuencias peptídicas aleatorias mediante la tecnología de despliegue en fago y su tamizaje con un suero generado en aves infectadas con SE, para conocer la secuencia de residuos que conforman los epítopes en la proteína.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producción de un antisuero contra *Salmonella* Enteritidis en gallinas.
- Clonación de la biblioteca de fagos con insertos del gen PegA menores a 100 pb.
- Escrutinio con el antisuero generado para la identificación de clonas reactivas en la biblioteca.
- Análisis de secuencias en las clonas seleccionadas y determinación de los epítopes.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño de iniciadores y PCR para *pegA*

Para el diseño de los iniciadores se tomó como referencia la secuencia reportada en el GenBank del gen *pegA* (locus: SEN2145B) de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis str. P125109 (número de acceso: AM933172.1). Los iniciadores se diseñaron incluyendo los sitios de restricción *KpnI*, *HindIII* en el sentido 5' y 3' respectivamente. Además, se eliminó la secuencia que codifica para el péptido señal y el codón de paro. Se estandarizaron las condiciones ideales de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ideales para la amplificación de gen mediante el uso de concentraciones estándar para los reactivos (**anexo 12.1.1**), ADN constante (100 ng) y gradientes de temperatura.

6.2. Cepas bacterianas y vectores

Se utilizó la cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC® 49214, *E. coli* TG1, el fagémido pG8SAET (Zhang et al., 1999) y el *fago helper* M13KO7 de Invitrogen™.

6.3. Producción de antisuero

La obtención del antisuero se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Anaya-Santillán, 2011). Brevemente, se inoculó SE ATCC 49214 previamente inactivada con calor en baño María a 80 °C durante 60 min (**anexo 12.1.2**). El inóculo fue preparado a una concentración del tubo 3 del nefelómetro de McFarland (9×10^8 bacterias/mL) en 20 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF). Previamente se realizó una prueba de aglutinación con el antígeno “K” polivalente para cerciorarse de que las aves estuvieran libres de un contacto previo con la bacteria (**anexo 12.1.3**).

El protocolo de inmunización consistió en cuatro inoculaciones en los tiempos indicados en el **cuadro 1**. Posteriormente se llevó a cabo el sangrado en blanco (obtención del volumen total de sangre) de las aves sin utilizar anticoagulante para obtener el suero hiperinmune. Éste se centrifugó a 3'000 rpm durante 10 min para separar los eritrocitos y otros elementos figurados; el suero fue recuperado y almacenado en alícuotas dentro de microtubos de 0.6 mL a -20 °C hasta su uso. Antes de realizar el sangrado en blanco una muestra de sangre tomada por la vena radial de la cual se separó el suero fue evaluada mediante la prueba de aglutinación directa utilizando como antígeno SE inactivado (Anaya-Santillán, 2011). Cuando se comprobó que el título fue mayor a 1:640 se llevó a cabo el sangrado.

Cuadro 1. Protocolo de inoculación

Inoculación	Tiempo (días)	Dosis (mL)
1	0	0.5
2	4	1
3	8	2
4	12	3
Sangrado	18	

Protocolo de inoculación de *Salmonella* Enteritidis inactivada por calor en aves semi-pesadas Hy-Line para la obtención de antisuero.

6.3.1. Precipitación de antisuero con sulfato de amonio

El procedimiento se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Hebert, 1974). Brevemente, el antisuero se centrifugó para eliminar detritos celulares y proteínas de gran tamaño, y por ello la pastilla fue descartada. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se agregó gradualmente solución de sulfato de amonio saturado (SAS) hasta llegar a una concentración del 35% en el volumen final. La mezcla se mantuvo durante toda la noche en temperatura de refrigeración, al día siguiente se centrifugó nuevamente y en esta ocasión se eliminó el sobrenadante. Las proteínas contenidas en la pastilla resultante fueron suspendidas en PBS 1X y posteriormente se llevó a cabo una segunda precipitación con SAS al 35%. Se centrifugó inmediatamente para obtener la pastilla y realizar una tercera precipitación. La pastilla resultante se suspendió en PBS 1X. Tras la última precipitación se dializó en una membrana con poro de 35 KDa (Spectrum™ Spectra/Por™ 3 RC Dialysis Membrane Tubing 3500 Dalton de FisherScientific®) sumergida en PBS 1X a 4°C y con agitación durante toda la noche para eliminar las sales del sulfato de amonio. Por último, se recuperó el contenido de la membrana y se guardó en congelación hasta su utilización (**anexo 12.1.4**). Para corroborar la presencia de las gammaglobulinas se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en amortiguador Tris-Glicina pH 8 y teñido con azul de Coomassie. El amortiguador de corrida utilizado fue SB (H₃BO₃-NaOH).

6.3.2. Titulación del anticuerpo

Una placa para ELISA con 96 pozos de fondo plano (NUNC Polysorp®) fue sensibilizada con proteínas de membrana externa (Omp's) de SE (**anexo 12.1.5**). Estas últimas se obtuvieron mediante un proceso de extracción de proteínas de membrana externa. Esto se

llevó a cabo colocando la proteína en los pozos diluida en buffer de carbonatos pH 9 (NaHCO₃), 5 µg de proteína por mililitro. La placa se mantuvo en refrigeración durante toda la noche. Al siguiente día se hicieron lavados para eliminar el exceso de anticuerpos, después se bloqueó con leche descremada Nestlé Svelty® (**anexo 12.1.6**). Posteriormente se llevaron a cabo 5 lavados, luego se agregó el anticuerpo policlonal en diluciones dobles seriadas con PBS1X-Tween20 0.2%-de leche descremada 2%, iniciando desde 1/100 hasta 1/25600. Como control se utilizó suero de un conejo sin inocular en una dilución 1/100 (**figura 7**). En los pozos sensibilizados se colocaron 100 µL de las diluciones correspondientes y se incubaron a 37°C durante 1h. Los blancos, el control y las diluciones de los sueros se colocaron en la placa por duplicado. Al término de la incubación con el anticuerpo primario se hicieron 5 lavados con PBS 1X-Tween20 0.2% y se adicionó el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG–Peroxidase antibody produced in goat de Sigma-Aldrich®) en una dilución 1/5000 en 5 mL colocando 100 µL por pozo e incubando 1 h a 37°C. Al término se hicieron 5 lavados y se agregaron 100 µL de ABTS (Roche®) y se incubó durante 10 min en ausencia de luz a temperatura ambiente para posteriormente llevar a cabo la lectura a 405 nm con un equipo lector de ELISA Bio-Rad 3550 Microplate Reader®.

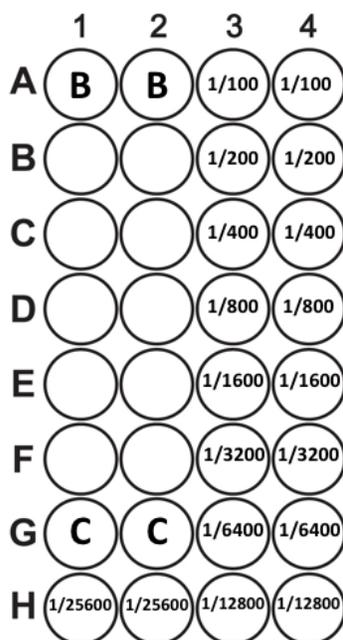


Fig. 7 Distribución de las diluciones en la placa de ELISA para la titulación. Se indican las diluciones utilizadas. La letra **C** indica el control negativo (suero de aves sin inmunizar) y la letra **B** el blanco (contiene todos los componentes de la prueba excepto el suero de interés). Los pozos en blanco no fueron utilizados.

6.4. Generación de bibliotecas de fagos

6.4.1. Determinación del número de clonas necesarias para representar el gen

Debido a que el proceso de digestión y clonación es completamente al azar aumentan las probabilidades de que algún fragmento no sea tomado en cuenta o que algunos sean clonados en más de una ocasión, por esto se utilizó una fórmula (Clarke and Carbon, 1976) que calcula un número de insertos para representar la totalidad del gen.

$$N = \ln(1-p)/\ln(1-(a/b))$$

Donde N= número de clonas necesarias para representar todo el gen o genoma.

p = nivel de confianza.

a = Tamaño de los insertos.

b = Tamaño total del gen o genoma.

ln = logaritmo negativo.

6.4.2. Insertos

El inserto fue amplificado por PCR utilizando los iniciadores diseñados para amplificar en gen *pegA*. Posteriormente se concentró el ADN con etanol y acetato de sodio como se ha descrito previamente (Ausubel et al., 2003), (**anexo 12.1.7**). La pastilla resultante se suspendió en agua Mili Q® estéril y se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000® de ThermoFisher®.

La digestión de los insertos se llevó a cabo con la enzima DNAsa I de Invitrogen® siguiendo las recomendaciones del proveedor. Brevemente, 10 µg de ADN fueron digeridos con 2 µL de DNAsa (4U/mL) en una reacción de 20 µL de volumen total durante 5 min a 37 °C. Posteriormente la enzima se inactivó con 1 µL de EDTA (25 mM) a 65 °C en baño María durante 10 min. Después de ser visualizada en un gel de electroforesis al 2% de agarosa en TAE 1X se volvió a concentrar como se describió anteriormente. Después de ello, los extremos salientes dejados por acción de la DNAsa se complementaron con la enzima *Pfu* como se ha descrito (Yang et al., 2005). Brevemente, para una reacción de 20 µL se agregó una unidad de polimerasa por cada 1.5 µg de ADN, 2 µL de buffer de enzima 10X con MgSO₄ (3 mM final), dNTPs (100 µM) a 74 °C durante 15 min. Por último, esta reacción se colocó en un gel de acrilamida al 15% en TAE 1X y se separó durante 2 h a 100 volts, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y la región del gel ocupada por el ADN por debajo de la banda del marcador de 100 pb fue escindida con una navaja de bisturí y colocada

en un tubo de 0.6 mL con un orificio en la base. A su vez este tubo se colocó dentro de otro de 1.5 mL para centrifugar a máxima velocidad y permitir así la fragmentación del gel de acrilamida al pasar a través del orificio. Se calculó el volumen ocupado por la acrilamida para agregar 2 volúmenes de buffer de elución (**anexo 12.2**) y se incubó a 37 °C en agitación durante 5 h. Al término de la incubación se centrifugó a máxima velocidad, el sobrenadante se pasó a un tubo limpio para posteriormente precipitar con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 h a -20 °C y centrifugación a 13 200 rpm durante 10 min en refrigeración. La pastilla se suspendió en 200 µL de agua Mili Q® estéril y se concentró con etanol como se describió anteriormente. La suspensión de la pastilla de ADN se llevó a cabo en 10 µL de agua Mili Q® estéril, se cuantificó y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

6.4.3. Vector (Fagémido)

El vector pG8SAET se obtuvo de células *E. coli* DH5α mediante el protocolo de lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001) y se digirió con la enzima *Sna*BI de ThermoScientific® según las recomendaciones del proveedor con algunas modificaciones. Brevemente, 10 µg de ADN se colocaron en una reacción de 20 µL totales con 20 U de enzima para asegurar que la totalidad del vector fuera digerido a 37 °C durante 1h. Posteriormente se visualizó en gel de electroforesis y se procedió a la desfosforilación del mismo con Fosfatasa Alcalina (CIAP) de Promega® para evitar la auto ligación del vector siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para eliminar el buffer y las enzimas, así como asegurar que únicamente se trabajaba con vector lineal se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 y se escindió la banda de interés con una navaja de bisturí. Estos fragmentos de agarosa fueron procesados con Monarch DNA Gel Extraction Kit de NEB® y la elución resultante fue cuantificada.

Antes de llevar a cabo los ensayos de ligación se hicieron pruebas para comprobar que la desfosforilación se llevó a cabo correctamente. Para esto se pusieron a ligar 10 ng de vector desfosforilado con T4 ligasa de Promega® durante toda la noche a 4°C y se transformaron células *E. coli* TG1 por electroporación a 2.5 volts, 25 uF y 200 ohms de resistencia. Estas células se recuperaron en 1 mL de medio SOC y se incubaron 40 min a 37 °C para posteriormente sembrar 10 y 50 µL con asa de vidrio en placas de agar LB con 50 µg/mL de carbenicilina. Al día siguiente se verificó el crecimiento para determinar si el vector estaba completamente defosforilado. Controles adicionales comprenden la transformación del

vector lineal sin ligasa y el vector súper enrollado los cuales fueron evaluados de la misma manera.

6.4.4. Biblioteca de fagos

Para clonar los insertos se llevó a cabo una reacción de ligación con 100 ng de vector pG8SAET y 60 ng de insertos que corresponden a una relación 1:10 tomando en cuenta pmol de extremos 5' y 3' en las moléculas de vector e insertos. La reacción se hizo en 20 µL y se incubó toda la noche a 4°C, posteriormente se electroporaron 10 ng y se sembraron 3 y 30 µL en placas de agar con carbenicilina, las células se recuperaron en 1mL de medio SOC. Al día siguiente se determinó la variabilidad de clonas y se realizó la PCR de colonia a clonas seleccionadas al azar utilizando los iniciadores pYSAET (iniciador sentido) y F8OLJ (iniciador anti sentido) para verificar si existía inserto en las clonas elegidas.

Una vez comprobada la variabilidad y presencia de insertos se llevó a cabo la transformación (**anexo 12.1.8**) y el rescate de la biblioteca (**anexo 12.1.9**). Para esto, se hicieron transformaciones con el resto de la ligación (conservada a -20 °C hasta su utilización), se recuperaron en medio SOC y se incubaron sin antibiótico para permitir la recuperación de las células al estrés generado durante la electroporación. Pasado el tiempo, se sembraron diluciones en placas con carbenicilina para obtener colonias que permitieran determinar la variabilidad de la biblioteca. Se aumentó el volumen con medio 2XYT para obtener la mayor cantidad de biomasa que permitiera obtener bacterias suficientes para conservarlas en medio con glicerol (biblioteca en formato bacteria); antes de recuperar las bacterias para conservar se incubó durante una hora con carbenicilina para seleccionar solo aquellas bacterias que estuvieran transformadas con el fagémido. Además, para conservar la biblioteca en formato ADN se sembró medio 2XYT adicionado con carbenicilina y se incubó durante toda la noche con agitación para posteriormente realizar un procedimiento de extracción de plásmido. Con el cultivo restante se llevó a cabo el rescate utilizando en Fago Helper M13 de Invitrogen®.

El cultivo restante se utilizó en su totalidad para sembrar un volumen mayor de medio 2XYT adicionado con carbenicilina y kanamicina. Se mantuvo durante toda la noche en incubación con agitación y al día siguiente se transfirió a botellas para centrifugar y permitir la formación de la pastilla bacteriana que posteriormente fue eliminada. Se recuperó el medio y se llevó a cabo la precipitación del fago adicionando 1/6 del volumen total de solución PEG8000 20% - NaCl 2.5M. Después de una incubación durante toda la noche a 4 °C los tubos se

centrifugaron nuevamente, en esta ocasión la pastilla formada contenía las partículas de fago por lo que se eliminó el sobrenadante. Las pastillas fueron suspendidas en TBS para luego llevar a cabo una segunda precipitación agregando en esta ocasión 1/5 del volumen en solución PEG-NaCl y se incubó durante una hora en hielo. Para recuperar los fagos se nuevamente se centrifugó esta suspensión a mayor velocidad en refrigeración durante 20 min y los fagos se suspendieron finalmente en TBS. De esta manera, la suspensión de fagos se puede conservar a 4 °C hasta por 6 meses sin perder título.

Para la titulación del fago se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de agar con antibiótico para contar las unidades formadoras de colonia y calcular el título (**anexo 12.1.10**). El título mínimo esperado para estas amplificaciones fue de 1×10^{13} /mL, por esto se hicieron tres diluciones 1/500 en 1 mL de medio 2XYT y una cuarta dilución 1/100 en 200 μ L. De esta última dilución se tomaron 3 y 30 μ L para infectar 200 μ L de células de *E. coli* TG1, la totalidad del volumen fue sembrada en placas de agar con carbenicilina, esto para obtener unidades formadoras de colonia cuantificables.

Durante este procedimiento también se hizo PCR de colonias seleccionadas al azar para verificar la presencia de insertos del tamaño deseado y la variabilidad de los mismos (**anexo 12.1.11**).

6.5. Tamizaje de la biblioteca de fagos

Para las tres rondas, se hizo una dilución 1/800 del anticuerpo policlonal anti-Omps en solución de carbonatos (NaCHO_3 pH 9). Posteriormente, se sensibilizaron 4 pozos con esta dilución y se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se hicieron cuatro lavados con TBST (Tween20 al 0.2%) y se llevó a cabo el bloqueo de los pozos con leche descremada Svelty® diluida en TBS, por último, se hicieron 4 lavados con TBST.

Primera ronda:

Se agregó un número de fagos 1000 veces superior al número de clonas en cada biblioteca. Para la biblioteca de *pegA*, al tener 2000 clonas diferentes se colocaron 2×10^6 partículas de fago por pozo. Las diluciones de la biblioteca se hicieron en TBS con 2% de leche más 0.2% de Tritón y en cada uno de los pozos se colocaron 100 μ L para dejar incubando a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente se hicieron seis lavados con TBST y se llevó a cabo la elución de los fagos con 100 μL de glicina 0.2 M pH 2.2 durante 15 min a temperatura ambiente. El contenido de los pozos se colectó en un tubo de 1.5 mL y se le adicionaron 200 μL de solución de paro (Tris 1M pH 8). Se retiraron 50 μL del volumen total para llevar a cabo la titulación, y el resto del eluido se utilizó para infectar 3 mL de células *E. coli* TG1 a una densidad óptica de 0.7 – 1 utilizando una MOI de 10:1. Se llevó a cabo el procedimiento de rescate como se ha descrito anteriormente utilizando 50 mL de cultivo de bacteria TG1. También se conservó la biblioteca en formato de bacteria, ADN plasmídico y fago. Los fagos fueron precipitados como se describió anteriormente en dos ocasiones más con PEG8000 20% y NaCl 2.5M. Los fagos amplificados fueron titulados y utilizados para llevar a cabo la siguiente ronda.

Segunda ronda:

Para esta ronda se hicieron los siguientes cambios: en cada pozo se colocaron 1×10^{11} fagos (contenidos en 100 μL) y, con el objetivo de aumentar la astringencia y enriquecer la biblioteca de fagos, el número de lavados antes de eluir la biblioteca se incrementó a ocho. El procedimiento de elución y amplificación de los fagos fue el mismo que se describió anteriormente.

Tercera ronda:

Por pozo, se agregó la misma cantidad de fagos que en la ronda anterior y se hicieron 10 lavados con TBST antes de eluir. El resto del procedimiento es como se describió anteriormente excepto que, para esta última ronda no se realizó amplificación del eluido.

6.5.1. Titulación y amplificación de fagos del tamizaje

Titulación del eluido:

Se tomaron 5 μL de los 50 μL separados anteriormente para infectar 200 μL de células *E. coli* TG1. Además 1 μL fue diluido en 100 μL de medio 2xYT, para tomar 20 μL de esta dilución e infectar 200 μL más de células. Las infecciones se incuban a 37 °C durante 40 min y posteriormente se siembra el total del volumen en placas de agar LB con carbenicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Este procedimiento se llevó a cabo para determinar el número de fagos recuperados en los eluidos de las tres rondas de tamizaje. En la segunda ronda se hizo una dilución 1/1000

y para la tercera una dilución inicial 1/1000 y una segunda 1/100 debido a que el título esperado era mayor.

Titulación del fago amplificado:

Se hicieron diluciones seriadas partiendo del supuesto de tener un cierto título (1×10^{13}), por esto se realizaron tres diluciones 1/500 en 1 mL de medio 2XYT y una cuarta dilución 1/100 en 200 μ L. De esta última dilución se tomaron 3 y 30 μ L para infectar 200 μ L de células de *E. coli* TG1 y se sembró en medio sólido con antibiótico.

6.5.2. Obtención de fagos de las clonas individuales

Se seleccionaron 22 colonias individuales del segundo eluido y 22 del tercero. En una placa de 96 pozos se colocó medio 2XYT adicionado con carbenicilina (50 μ g/mL) y se inocularon con un palillo después de haber tenido contacto con la colonia seleccionada, posteriormente se incubaron para permitir el crecimiento del primo cultivo. Al día siguiente se hizo una dilución tomando 150 μ L y colocándolos en una placa nueva con capacidad para 500 μ L en la cual se agregaron previamente 300 μ L de medio 2XYT con 30% de glicerol, se mezcló por inversión y se congeló a -70 °C, a esta placa se le denominó como “placa maestra”.

En otra placa con capacidad para 1 mL se sembraron 100 μ L de cultivo tomados de la primera placa más 300 μ L de medio 2XYT con carbenicilina, se incubó durante 6 h en agitación (200 rpm) hasta alcanzar la densidad óptica deseada y se procedió con el rescate. La siembra del primer cultivo se hizo con el objetivo de que todas las clonas se encontraran en la misma fase de crecimiento sin importar si el péptido recombinante expresado por cada una de ellas tuviera algún efecto en su tasa metabólica. El rescate y la precipitación se llevaron a cabo en la placa como se detalla en el **anexo 12.1.12**. La pastilla obtenida se mantuvo en la placa a temperatura de refrigeración hasta su uso. Para determinar el título promedio de las clonas amplificadas se seleccionaron 6 clonas al azar y se utilizaron para infectar células *E. coli* TG1 y obtener el número de unidades formadoras de colonia.

6.6. Análisis de clonas seleccionadas por ELISA

En una placa para ELISA (Nunc MaxySorp®) se fijaron los fagos amplificados anteriormente por duplicado colocando 1×10^{10} partículas de fago en 100 μ L de PBS1X por pozo y se bloqueó con leche descremada como se ha descrito previamente. Después, se

agregaron anticuerpos policlonales originados en pollo en contra de Omp's de SE en una dilución 1/800 y se incubó durante toda la noche en temperatura de refrigeración. Posteriormente se hicieron 5 lavados con PBST y se agregó un anticuerpo anti IgY conjugado con HRP, se incubó durante 1 h a 37 °C y se hicieron 5 lavados con PBST. Para revelar se agregaron 100 µL de ABTS y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Las densidades ópticas de la placa se midieron en un lector de ELISA BioRad Microplate Reader 3550® a una longitud de onda de 405 nm. Como control negativo se utilizó el fago no relacionado FB22 (Pedroza-Roldan *et al.*, 2009) y como controles positivos los fagos recuperados durante el segundo y tercer eluido, así como las proteínas con las cuales fueron evocados los anticuerpos utilizados en los tamizajes y selección de las clonas. Se seleccionaron aquellas clonas que tuvieran un valor de dos desviaciones estándar por arriba del valor del punto de corte dado por el control negativo. Posteriormente, las cinco clonas seleccionadas fueron amplificadas en un volumen de 5 mL a partir de la caja maestra para la obtención de fagos para realizar una ELISA con mayor cantidad del mismo.

6.7. Secuenciación de ADN obtenido de las clonas seleccionadas

Las clonas seleccionadas se amplificaron nuevamente a partir de la caja maestra con glicerol y se extrajo ADN de doble cadena con Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega®. La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

6.8. Análisis de las secuencias

Los resultados de la secuenciación fueron visualizados con el software 4Peaks v1.8, se verificó la calidad de la lectura en cada base y se hicieron las correcciones necesarias. Una vez identificada la secuencia de los insertos estas fueron traducidas en los 3 ORF con la plataforma de ExPASy Translate disponible en la web a través de <https://web.expasy.org/translate/>. Para el mapeo de los epítopes se llevó a cabo una predicción de plegamiento con la secuencia de aminoácidos para la proteína PegA (GenBank: AM933172.1) en el servidor para modelado por homología estructural de proteínas SWISS-MODEL disponible en <https://swissmodel.expasy.org/>. La secuencia de aminoácidos correspondiente a los epítopes identificados fue mapeada con el programa Edu-PyMOL 2.1.

VII. RESULTADOS

7.1. Diseño de iniciadores

Los iniciadores resultantes se muestran en el **cuadro 2**. Se comprobó que los productos resultantes quedarán en el marco de lectura correcto para su expresión en el vector de clonación utilizando en programa SnapGene 4.1 de GSL Biotech LLC. Se obtuvieron resultados favorables al evaluar en IDT OligoAnalyzer las temperaturas medias de alineamiento (T_m), la formación de dímeros entre ellos mismos y entre el oligo sentido y antisentido, así como la formación de *hairpins*.

Cuadro 2. Se muestran las secuencias de los iniciadores diseñados para *pegA*.

Iniciador	Secuencia	T_m (°C)	Tamaño de amplificado (pb)
pegA.FOR	5' cgg GGTACCGCTGATGAAGATATGGGGGAA 3' (21 pb)	57.2	483
pegA.REV	5' ccc AAGCTTATCAGTTAATACCGTCATCGTC 3' (22 pb)	56	

En **minúsculas** se encuentra la secuencia añadida al iniciador para facilitar la digestión con enzimas. En **negritas** se indican las secuencias de reconocimiento para la digestión con enzimas de restricción (*KpnI* para el iniciador sentido y *HindIII* para el antisentido).

Los iniciadores fueron solicitados a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Morelos, México.

7.2. Reacción en cadena de la polimerasa

En el **cuadro 3** se muestra el gradiente de temperatura utilizado para la estandarización de la PCR.

Cuadro 3. Gradiente de temperatura utilizado para estandarización de la PCR.

Gradiente	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura °C	52.7	53	53.3	54.1	55	55.9	56.3

Se indica la temperatura de media de alineamiento utilizada en cada pozo del termociclador para establecer un gradiente de temperatura.

Para todas las reacciones se utilizaron las concentraciones de reactivos indicadas en el **cuadro 4**. Después de la visualización de los productos amplificados en un gel de agarosa, se determinó que 55 °C fue la temperatura media de alineamiento óptima. En el **cuadro 5** se detallan las condiciones de la PCR. Como control positivo se utilizaron los iniciadores para

el gen *invA* de *Salmonella* spp., con los cuales se obtuvo un amplificado de 285 pb (**figura 8**).

Cuadro 4. Componentes de la reacción de PCR.	
Componente	Volumen (concentración)
Agua	36.5 μ L
Buffer 10X	5 μ L (1X)
MgCl (50 mM)	4.5 μ L (4.5 mM)
dNTPs	2.5 μ L (5 mM)
Iniciador sentido	2 μ L (20 pmol)
Iniciador antisentido	2 μ L (20 pmol)
ADN (100 ng)	2 μ L (200 ng)
Taq polimerasa (1 U)	1 μ L (1U)

Cuadro 5. Condiciones de la PCR.	
Fase	Temperatura y tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C durante 5 min
Desnaturalización*	94 °C durante 30 seg
Alineamiento *	55 °C durante 45 seg
Extensión *	72 °C durante 30 seg
Extensión final	72 °C durante 5 min

*Estos pasos se repiten 30 ciclos

El producto de PCR fue comprobado mediante un ensayo con la enzima de restricción *EcoRI*, obteniendo los resultados previamente simulados con el programa SnapGene 4.1 de GSL Biotech LLC. Tanto la predicción *in silico* como el gel de agarosa se muestra en la **figura 9**.

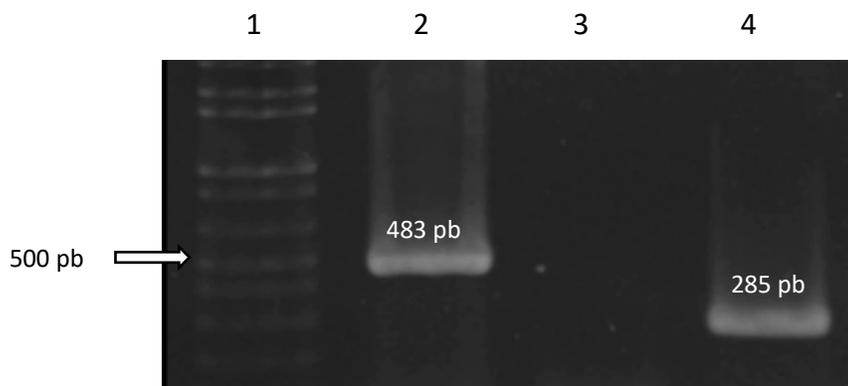


Fig. 8 gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X. **Carril 1:** marcador 1 kb Plus (ThermoScientific®). **Carril 2:** producto de PCR, *pegA*. **Carril 3:** control negativo (PCR con ADN de *E. coli*). **Carril 4:** control positivo (producto de PCR, *invA* de *Salmonella* Enteritidis).

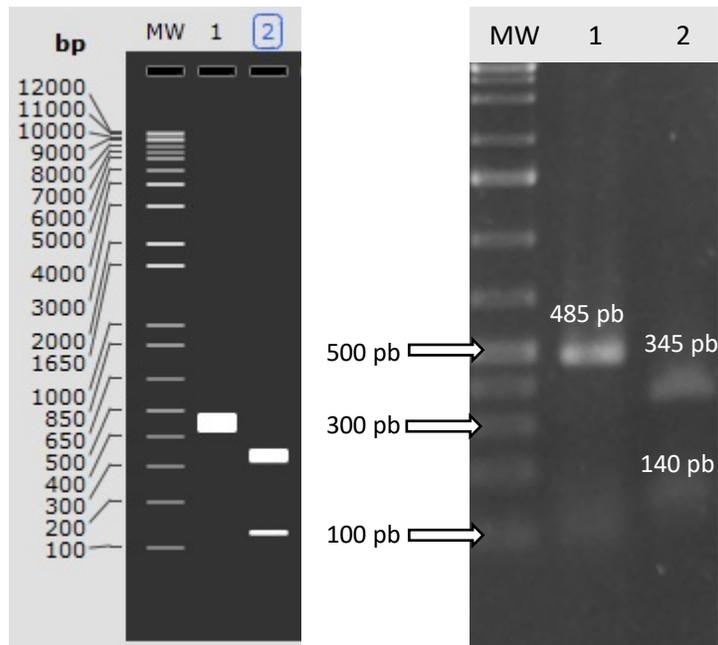


Fig 9. Izq: predicción *in silico* en SnapGene 3.0. **Der:** gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X. **MW:** marcador 1 kb Plus (ThermoScientific®). **Carril 1:** producto de PCR, *pegA*. **Carril 2:** producto de PCR, *pegA* digerido con la enzima *EcoRI*.

7.3. Producción del antisuero

Después de la tercera inmunización se llevó a cabo el sangrado de la gallina para la obtención de suero, con esta muestra se determinó que el título del antisuero fue de 1/1024 por aglutinación directa mientras que el control (muestra de suero al día cero) no mostraron reacción. La prueba se realizó utilizando como antígeno SE inactivada por calor.

Previa anestesia de la gallina, se realizó el sangrado por vía intracardiaca, obteniendo el volumen completo de la sangre. Se obtuvieron 20 mL de suero total por gallina, mismos que fueron almacenados en congelación a -20 °C.

7.3.1. Precipitación de anticuerpos

Después de la precipitación con sulfato de amonio y la diálisis los anticuerpos fueron visualizados en gel de agarosa al 0.8% para verificar la ausencia del resto de las fracciones séricas y la concentración visual de las inmunoglobulinas (**figura 10**). La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford, obteniendo como resultado una concentración de 4 µg/mL.

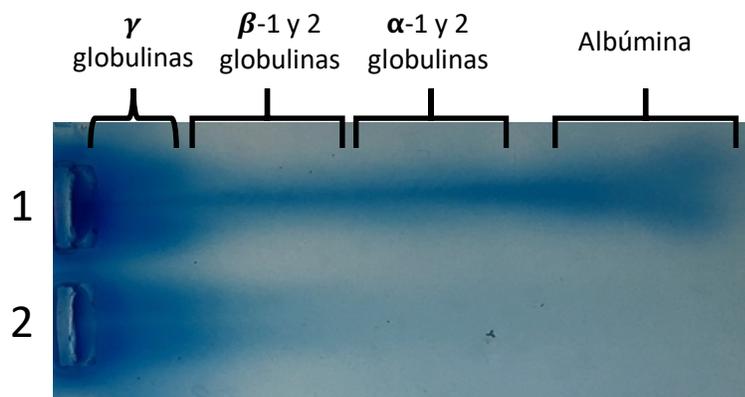


Fig. 10 gel de agarosa al 0.8% en amortiguador Tris-Glicina pH 8.2. **Carril 1:** suero sin tratar de ave hiperinmunizada. **Carril 2:** suero de ave hiperinmunizada tratada con sulfato de amonio.

Posteriormente los anticuerpos precipitados fueron titulados mediante ELISA utilizando como antígeno las proteínas con las cuales fue inducida la respuesta inmune en las aves (Omp's de SE). El título se determinó en la dilución que registrara 2 DO por arriba del valor obtenido en el control negativo (DO 0.485), la lectura se llevó a cabo con un ELISA BioRad Microplate Reader 3550® a una longitud de onda de 405 nm. El factor de dilución con este valor fue 1/800, el cual registró un valor de DO de 2.625 (**figura 11**), dilución con la cual se realizaron los ensayos de tamizaje posteriores.

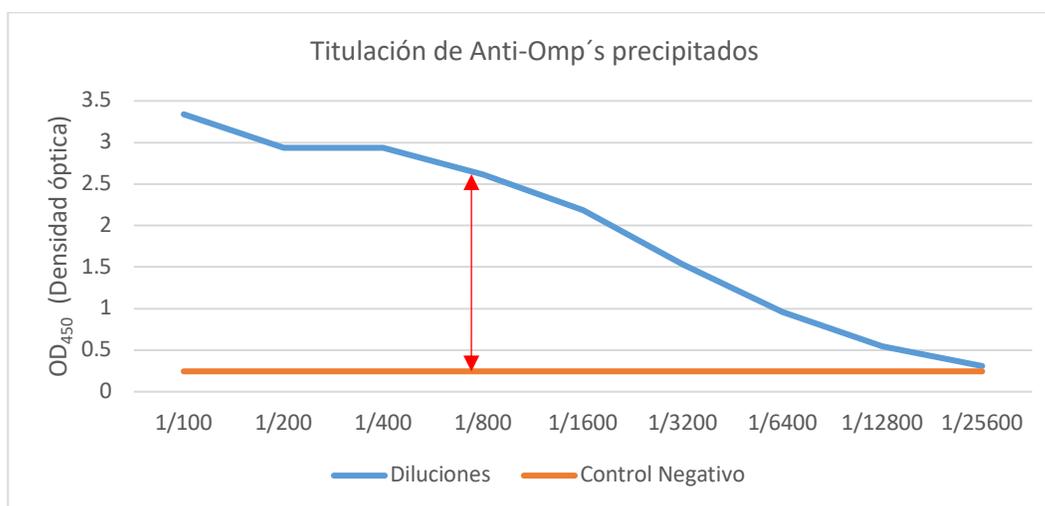


Fig. 11 Representación gráfica de los valores de OD₄₅₀ obtenidos para cada una de las diluciones y el control negativo. La flecha roja indica la dilución con dos densidades ópticas sobre el valor de la OD del blanco.

7.4. Clonación de la biblioteca de fagos

7.4.1. Insertos

Se estandarizó la concentración de DNAsa y los tiempos necesarios para la digestión del gen *pegA* (483 pb) mediante su visualización en geles de agarosa. Se utilizaron 5 µg de ADN producto de la PCR y concentraciones de enzima 4, 2 y 1 U/mL de un *stock* de DNAsa de Invitrogen® a una concentración de 512 U/µL. Los resultados mostraron que durante 5 min a 37 °C, 4 U/mL de DNAsa son suficientes para degradar el ADN obteniendo la mayor concentración de fragmentos por debajo de 100 pb (**figura 12**).

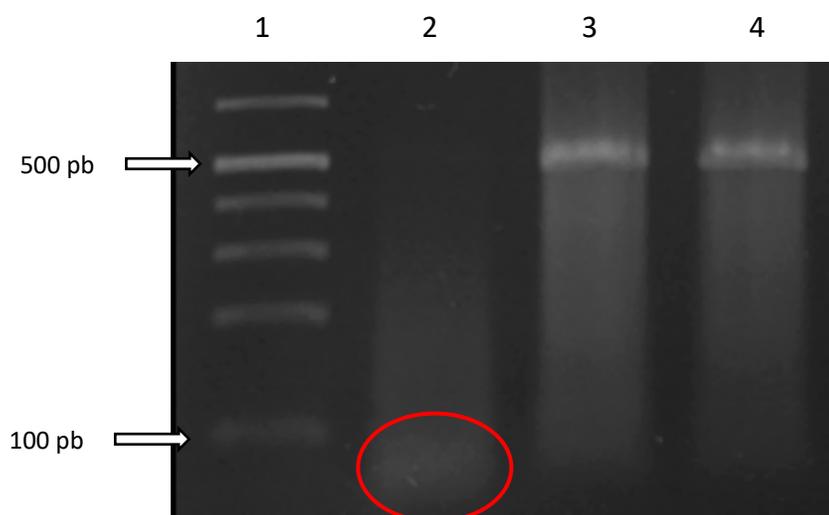


Fig. 12 gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X. Digestiones de 5 µg de ADN con 1 µL de DNAsa. **Carril 1:** marcador 1 kb Plus (ThermoScientific®). **Carril 2:** producto de PCR, *pegA* digerido con 4 U/mL de DNAsa. **Carril 3:** producto de PCR, *pegA* digerido con 2 U/mL de DNAsa. **Carril 4:** producto de PCR, *pegA* digerido con 1 U/mL de DNAsa.

7.4.2. Vector (Fagémido)

Se verificó visualmente en un gel de agarosa al 1% que el vector estuviera completamente digerido por la enzima *Sna*BI. Posterior a esto, se llevó a cabo la desfosforilación y al término de este proceso se recuperó y cuantificó obteniendo una concentración de 25 ng/µL en 20 µL totales que también se visualizaron en un gel de agarosa el 1% para verificar su concentración de manera visual, así como su integridad (**figura 13**).

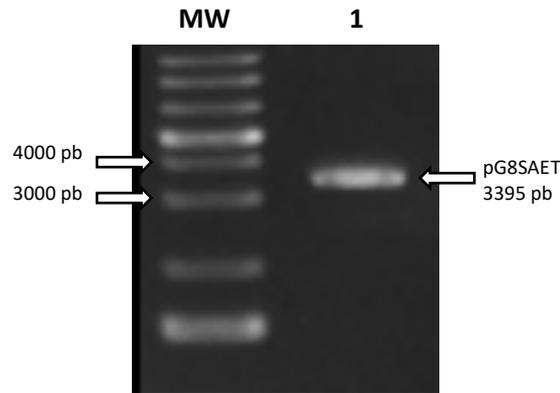


Fig. 13 gel de agarosa el 1% en TAE 1X. **MW:** marcador 1 kb plus Invitrogen®
Carril 2: pG8SAET digerido con *Sna*BI, desfosforilado y purificado.

Antes de iniciar con la clonación de la biblioteca se llevaron a cabo las pruebas necesarias para asegurar que no existiera autoligación del vector y que el plásmido fue digerido. Al analizar los resultados de la transformación de las células *E. coli* TG1 con el vector lineal desfosforilado con ligasa y sin ligasa únicamente se cuantificó 1 UFC en la autoligación y ninguna colonia con el vector lineal sin ligasa. Con esto se comprobó que la desfosforilación se llevó a cabo y que el ruido de fondo por posibles vectores autoligados sin inserto era mínimo.

7.4.3. Número de clonas necesarias para representar el gen

Utilizando la ecuación de Clarke y Carbon se calculó el tamaño mínimo necesario para representar el gen en su totalidad.

$$N = \ln(1-.99)/\ln(1-(30/483))$$

$$N = 1\ 292.58 \text{ clonas}$$

Las variables empleadas fueron: 0.99 como valor de confianza, 30 pb como el tamaño más pequeño de los insertos y 483 pb como el tamaño total del gen.

7.4.4. Ligación y transformación

En una primera transformación se electroporaron 10 ng de ADN de la reacción de ligación para verificar la variabilidad obtenida y decidir cuánto de la reacción era necesario transformar para obtener el número de clonas calculado.

Se obtuvieron 5 colonias en el plaqueo de 3 μ L, la siembra se hizo a partir de un volumen de 1 mL de recuperación por lo que para este caso se obtuvo una variabilidad de 1,666 colonias diferentes. Para tener un mejor panorama de las variantes se eligieron colonias al azar y se les realizó PCR, como control positivo se obtuvo un amplificado de 280 pb ya que los iniciadores amplifican 127 pb corriente arriba del sitio de corte de *Sna*BI y 153 pb corriente debajo de este mismo sitio (**cuadro 6**). En la **figura 14** se observan los productos amplificados, los cuales presentan diferencias de tamaños entre ellos y mayores al control, indicando que existe la presencia de insertos de distintos tamaños que visualmente se puede determinar que van de 50 a 100 pb. La verificación de estos insertos permite determinar que la biblioteca contiene variabilidad.

El título de esta biblioteca se hizo a partir de las 5 UFC's presentes en el plaqueo de 200 μ L, los factores de dilución (1/50, 1/500 y 1/1000) tomando en cuenta que se infectaron células con 3 μ L de la biblioteca de fagos en la última dilución. El resultado final arrojó un título de 8×10^{10} partículas de fago por mL.

Cuadro 6. Se muestran las secuencias de los iniciadores utilizados para la detección de los insertos en el vector pG8SAET.

Iniciador	Secuencia de nucleótidos (nt)	Tm (°C)	Tamaño del amplificado (pb)
pYSAET	5' ggaaaaacatttattcaattcgtaaactag 3' (30 nt)	54	280
F8OLJ	5' gacaatgacaacaaccatcgcccacgcata 3' (30 nt)	64	

Los iniciadores comienzan 127 pb corriente arriba del sitio de restricción *Sna*BI y 70 pb corriente abajo, respectivamente.

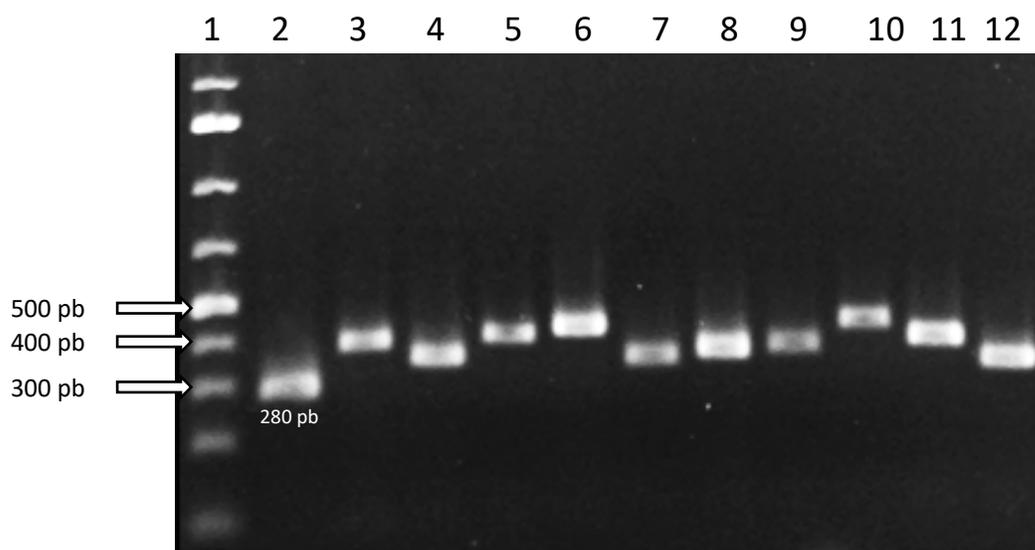


Fig. 14 gel de agarosa al 2% en TBE 1X. **Carril 1:** marcador 1 kb plus (Thermo Fisher Scientific®). **Carril 2:** producto de PCR de pG8SAET sin inserto. **Carril 3 a 12:** productos de PCR de 10 clonas seleccionadas al azar.

7.5. Tamizaje de la biblioteca

Una vez finalizado el primer tamizaje de la biblioteca se determinó que el título de partículas de fago recuperadas fue de 5×10^4 /mL del total de fagos colocados inicialmente (2×10^6 /mL). Posterior a la obtención del eluido, los fagos recuperados fueron amplificados obteniendo un título de 1×10^{13} /mL. Para el segundo tamizaje los resultados fueron; 1×10^6 /mL para el eluido y 1×10^{13} /mL para el amplificado. En el tercer tamizaje únicamente se llevó a cabo la titulación del eluido (9×10^8 /mL) y no se realizó la amplificación. El aumento en los títulos del eluido nos permite determinar que se llevó a cabo una buena selección de partículas de fago afines a los anticuerpos ya que este incremento se relaciona con el aumento del número de péptidos afines al *set* de anticuerpos utilizados para el tamizaje (**cuadro 7**). Al tener una mayor afinidad a pesar del aumento en la astringencia dada por los lavados podemos inferir que al llevar a cabo la amplificación del primer eluido, aumentaron en cantidad los péptidos que fueron seleccionados en el primer tamizaje y, por lo tanto, aumento el número de fagos recuperados para la segunda y tercera ronda.

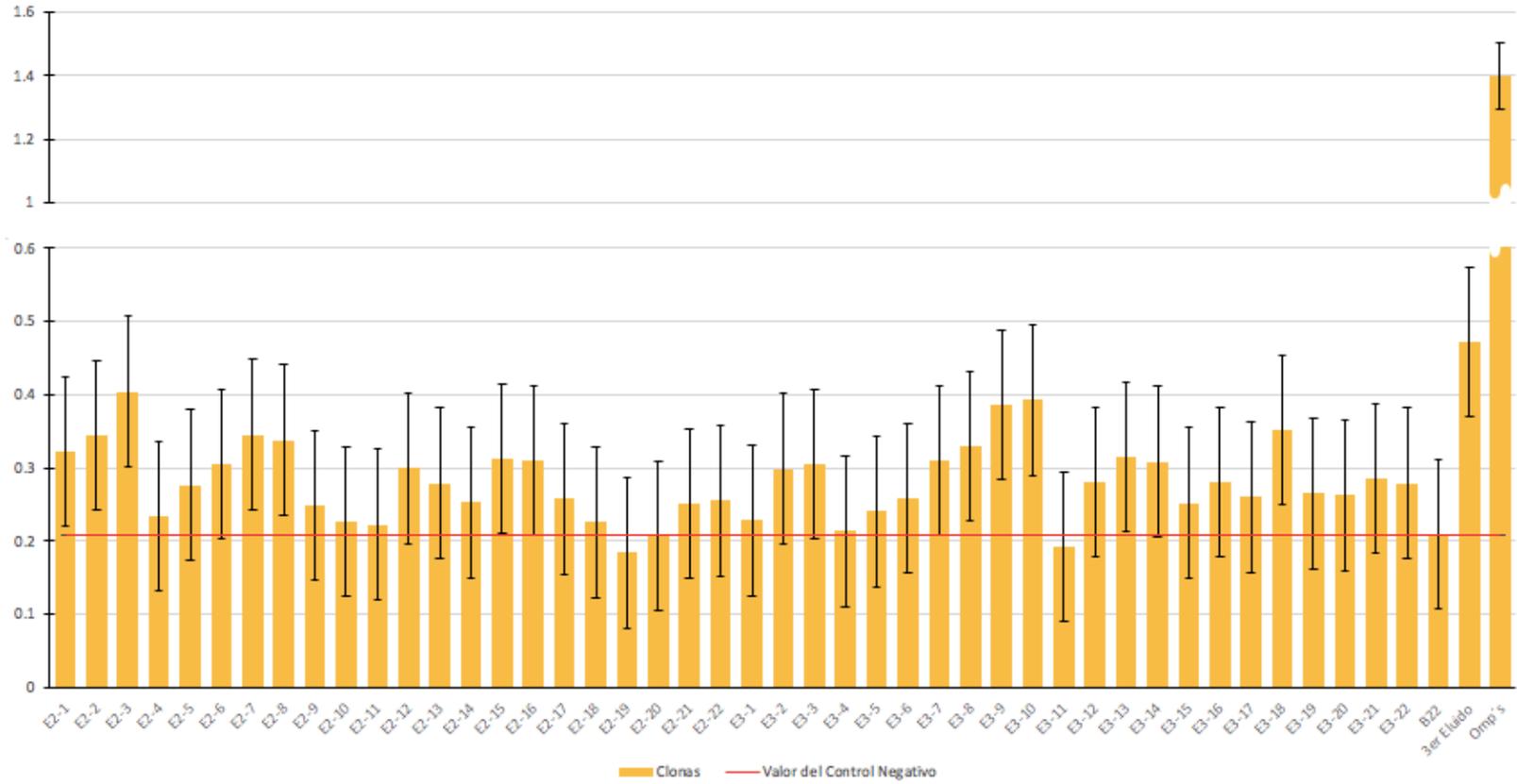
Cuadro 7. Título de fagos en los tres eluidos de las rondas de bioselección.

Ronda	Fagos eluidos
1	5×10^4
2	1×10^6
3	9×10^8

7.6. Obtención y análisis de clonas individuales

De una placa que contenía las colonias resultado de la titulación de los eluidos 2 y 3 en las rondas de tamizaje, se seleccionaron 44 clonas al azar (22 de cada eluido) para amplificar mediante la metodología de rescate en placa de 96 pozos. Los fagos se titularon obteniendo valores de $2 \times 10^{11}/\text{mL}$ y se utilizaron para realizar una prueba de ELISA para analizar su reactividad utilizando el suero policlonal obtenido de las aves inmunizadas con Omp's de SE. En la **figura 15** se muestran los resultados de absorbancia para las 44 clonas. Se seleccionaron como positivas 10 clonas (E2-1, E2-2, E2-3, E2-7, E2-8, E3-8, E3-9, E3-10, E3-13 y E3-18) que tuvieron dos desviaciones estándar por arriba del valor registrado por el control negativo, FB22 en este caso (punto de corte). Posteriormente, se realizó una amplificación de los fagos de estas 10 clonas y se seleccionaron 5 positivas (E2-1, E2-7, E2-8, E3-10 y E3-18) que registraron un valor de desviación estándar por arriba del control negativo (HF-M13), las cuales pueden observarse en la **figura 16**. En la primera selección se obtuvieron 5 clonas del segundo eluido y 5 del tercer eluido. Debido a que conforme se aumentaba la astringencia en cada proceso de bioselección esto se interpreta como un resultado favorable y para hacer aún más específico el proceso de selección se llevó a cabo la segunda ELISA. En esta segunda etapa de selección tres clonas corresponden al segundo eluido y dos al tercero, a pesar de que lo esperado sería obtener más clonas inmunodominantes en el último tamizaje. Estos resultados se consideran favorables pues clonas que probablemente hayan sido eliminadas para el tercer tamizaje debido a una desventaja en cantidad por cuestiones metabólicas de la bacteria pueden ser interesantes.

ELISA de 44 clonas individuales



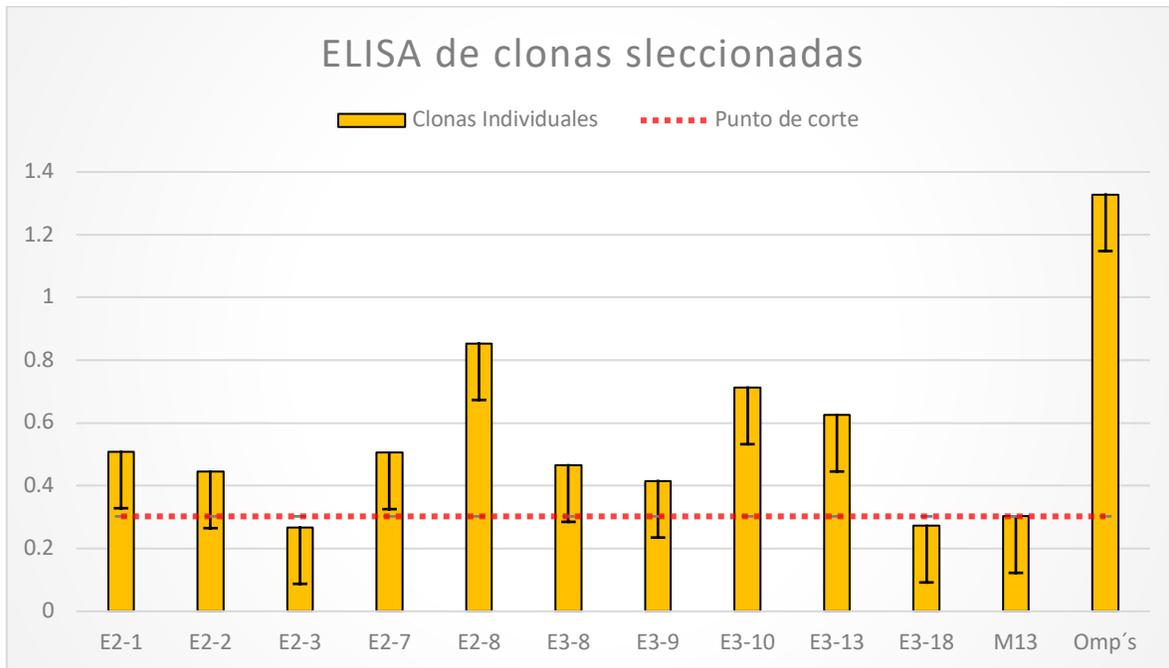


Fig. 16 Valores de absorbancia obtenidos de las 10 clonas seleccionadas posterior a la primer selección. Se muestran las barras de una desviación estándar y en una línea punteada de color rojo el valor del control negativo, M13.

Después, las clonas seleccionadas fueron amplificadas nuevamente a partir de la caja maestra para obtener bacteria y realizar extracción de ADN plasmídico para llevar a cabo la secuenciación utilizando el iniciador sentido pYSAET. También se llevó a cabo la PCR para comprobar la presencia y variabilidad de insertos (**figura 17**). Las secuencias obtenidas se muestran en el **cuadro 8**.

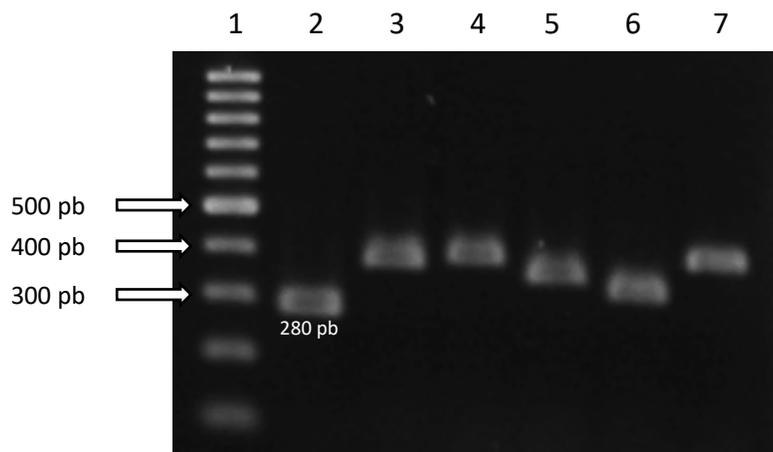


Fig. 17 gel de agarosa al 2% en TBE 1X. **Carril 1:** marcador 1 kb plus (Thermo Fisher Scientific®). **Carril 2:** producto de PCR a partir de pG8SAET sin inserto. **Carril 3 a 7:** productos de PCR de las clonas seleccionadas para secuenciar.

Clona (ID)	Secuencia	Tamaño de inserto (pb)
>E2_1	CAGTACCGCTATGCCGCCGTTGAAAATACTGTA ACACCAGGTTCTGTTGAACAGCTAATCCACGAA TTAGTTTTAACCGTTCTCAATTTGTGGATAACAG TACCC	93
>E2_7	CAGTACCACCTACCTGGGATAATTCAATAGTCG CGCTATTTGCACCTTCGAAAGTACAGGATGTTC CCACCACTTCTCCGTTTATTTTTAATTCCCCAT ATCTTCATCAGCGTACCC	106
>E2_8	CAGTACGCATTATTTTTGGTGATTTGCATGTTAT CCACAAATTGAGAACGGTTAAACTAATTCGTG GATTAGCGTACCC	68
>E3_10	CAGTACTACAGTATTTTCAACGGCGGCATAGCG GGCAGAAAAGTTCAGGGTAGTACCC	46
>E3_18	CAGTACCGCCAGGGTTTAAGTCAGTCAATCTAT CAACACCTACCTGGGATAATTCAATAGTCGCGC TATTTGCAGCGGGCAGAAAAGTTCAGGGTATAT ACACCATTTTCAAACCTTACTTGAATTCAGGTAC CC	122

Cuadro 8. Resultados de la secuenciación de 5 clonas seleccionadas en el segundo proceso de selección. En verde se muestra la región corriente arriba del inserto y en rojo la región corriente abajo en el vector pG8SAET. En negro la secuencia que corresponde al inserto.

Las secuencias fueron deducidas en los 3+ marcos de lectura posibles y en el cuadro 9 se muestran solo las que podían expresar un péptido recombinante. De todas las secuencias de aminoácidos, únicamente la clona E2_1 expresó una secuencia de 24 aminoácidos, de los cuales 18 pudieron ser localizados en la cadena peptídica de la proteína PegA al traducir el primer marco de lectura. De estos 15 fueron continuos, luego fue interrumpida por 6 residuos que no están presentes en ninguna de las secuencias de *Salmonella* reportadas en el GenBank y finalmente 3 aminoácidos más que coinciden con las secuencias de referencia (**Cuadro 9**).

ID de Clona	Secuencia de aminoácidos	Tamaño (aa)	Posición
E2_1_ORF1	PWQYRYAAVENTVTPGSVEQLIHELVLTVLNLWITVPG APVPYPDPLEPRA*GS	24	155 a 176
E2_1_ORF3	MAVPLCRR*KYCNTRFC*TANPRISFNRSQFVDNSTRC AGAVSGPTGTACLIX	16	87 a 102

Cuadro 9. Resultados de la deducción a partir de las secuencias nucleotídicas. En rojo y naranja los residuos localizables en las secuencias de referencia. En azul residuos sustituidos que no coinciden con las secuencias de referencia.

Ya que se ha descrito ampliamente el cambio de marco de lectura por la bacteria *E. coli*, se realizó la deducción en los siguientes dos marcos posibles. Con esto se observó una segunda secuencia presente en la proteína de interés utilizando el ORF +3 de la clona E2_1 (**cuadro 9**). Las dos secuencias de aminoácidos identificadas en la clona E2_1 fueron mapeadas en la predicción de plegamiento para la proteína PegA (**figura 18**) generada en ExPASy y utilizando el programa PyMol. Dos regiones de 5 aminoácidos cada una (AAVEN y PGSVE) en el primer epítipo identificado (E2_1 (1)) están ubicadas hacia la superficie externa de la proteína, en caras opuestas. Posterior a PGSVE, se encontró una secuencia de 6 residuos (QLIHEL) que no coincide con la secuencia de PegA y posteriormente tres residuos (VLT) que sí fueron localizados en la proteína. En el segundo epítipo (E2_1 (3)) se encontró otra secuencia de 7 aminoácidos (NRSQFVD) expuesta hacia la superficie (**figura 19**).



Fig. 18 Predicción *in silico* del plegamiento de los aminoácidos que constituyen la proteína PegA utilizando el algoritmo de ExPASy.

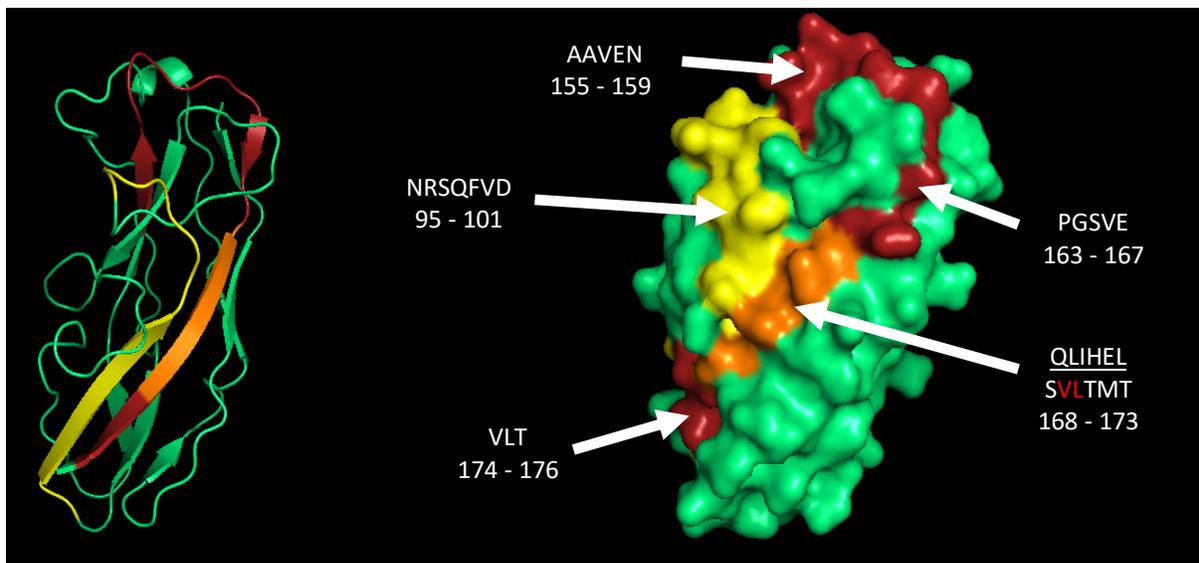


Fig. 19 Predicción *in silico* del plegamiento de los aminoácidos que constituyen la proteína PegA utilizando el algoritmo de ExPASy. **Izq.** Representación en listones de la cadena de aminoácidos plegada. En **rojo** la secuencia correspondiente al epítipo E2_1 (1) y en **naranja** los residuos que no coinciden con PegA. En **amarillo** la secuencia de residuos de la secuencia codificada en E2_1 (3). **Der.** Representación de la superficie de la proteína PegA y la localización de los epítipes.

Al hacer un análisis con la herramienta BLASTp de las secuencias E2_1 (1) y E2_1 (3) comparando las secuencias con las bases de datos en el GenBank se encontraron homologías con otras proteínas fimbriales presentes en el género *Salmonella*. En la **figura 20** y **21** respectivamente se muestran algunas de las serovariedades que presentaron un nivel de homología mayor. Todas son salmonelas del género *enterica* y coinciden con dominios conservados putativos de la superfamilia de las fimbrias. El resto de las clonas no se encontró en fase por lo que fueron descartadas.

- **E2_1_ORF1**

putative fimbrial chain protein stcA [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cubana]
 Sequence ID: [PQB21123.1](#) Length: 75 Number of Matches: 1

Range 1: 51 to 74 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
37.7 bits(86)	0.029	Compositional matrix adjust.	18/24(75%)	20/24(83%)	0/24(0%)
Query 1	RYAAVENTVTPGSVEQLIHELVLVT	24			
	RYAAVENTVTPGSVE ++ VLT				
Sbjct 51	RYAAVENTVTPGSVESVLTMTVLVT	74			

fimbrial protein YehD [Salmonella enterica]
 Sequence ID: [WP_000830681.1](#) Length: 177 Number of Matches: 1
[▶ See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 153 to 176 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
38.5 bits(88)	0.051	Composition-based stats.	18/24(75%)	20/24(83%)	0/24(0%)
Query 1	RYAAVENTVTPGSVEQLIHELVLVT	24			
	RYAAVENTVTPGSVE ++ VLT				
Sbjct 153	RYAAVENTVTPGSVESVLTMTVLVT	176			

Fig. 20 Resultados de la comparación de aminoácidos del epítipo identificado en la secuencia E2_1_ORF1 con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLASTp. Query: secuencia del epítipo. Sbjct: secuencia y posición de los aminoácidos dentro de la proteína de referencia. Los signos “+” indican la sustitución de aminoácidos con otros de características similares

- **E2_1_ORF3**

fimbrial protein YehD [Salmonella enterica]
 Sequence ID: [WP_000830681.1](#) Length: 177 Number of Matches: 1
[▶ See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 87 to 102 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
54.9 bits(122)	1e-07	16/16(100%)	16/16(100%)	0/16(0%)
Query 1	TANPRISFNRSQFVDN	16		
	TANPRISFNRSQFVDN			
Sbjct 87	TANPRISFNRSQFVDN	102		

fimbrial protein [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Infantis str. SARB27]
 Sequence ID: [EHB42424.1](#) Length: 162 Number of Matches: 1
[▶ See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 72 to 87 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
54.9 bits(122)	1e-07	16/16(100%)	16/16(100%)	0/16(0%)
Query 1	TANPRISFNRSQFVDN	16		
	TANPRISFNRSQFVDN			
Sbjct 72	TANPRISFNRSQFVDN	87		

Fig. 21 Resultados de la comparación de aminoácidos del epítipo identificado en la secuencia E2_1_ORF3 con la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLASTp. Query: secuencia del epítipo. Sbjct: secuencia y posición de los aminoácidos dentro de la proteína de referencia.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se reporta la construcción de una biblioteca a partir del gen *pegA* de *Salmonella* Enteritidis con el número de variantes suficientes para representar la totalidad del gen con péptidos recombinantes de distintos tamaños. Clarke y Carbon (1976) reportaron la generación de una biblioteca con plásmidos conteniendo fragmentos al azar de distintos tamaños que representaban la totalidad del genoma de *E. coli*. La expresión utilizada representa entre 90 y 99% del genoma, siendo utilizada con éxito desde entonces y hasta la actualidad por varios investigadores para representar genes y genomas en bibliotecas de fagos (Basler *et al.*, 1986; Carbonetti *et al.*, 1999; Houot *et al.*, 2012; Carboni *et al.*, 2017; Mathebula *et al.*, 2017). Con esta biblioteca se llevó a cabo un proceso de bioselección en el cual se enfrentaron los péptidos recombinantes obtenidos en la biblioteca contra anticuerpos policlonales de un suero generado a partir de la exposición de aves a SE inactivada por calor. Al término del proceso, se analizaron clonas al azar del segundo y tercer proceso de bioselección para seleccionar aquellas que tuvieran valores de absorbancia significativos por arriba del control negativo. Debido a que ciertas clonas de fago que expresan algún péptido en particular pueden representar una exigencia metabólica para la célula, es probable que estos estén representados en menor proporción en la colección de fagos. Es por esto que se decidió analizar clonas de la segunda bioselección, ya que estos péptidos pudieran haber sido eliminados para la tercera y puedan ser interesantes al analizarlos posteriormente.

En un primer escrutinio, los fagos se compararon con FB22 el cual, es un fago no relacionado que expresa el epítipo ALQRLFETC derivado de la proteína Gag del HIV-1 (Pedroza-Roldan *et al.*, 2009) como control negativo. Para el segundo escrutinio se compararon con el fago M13 silvestre con el fin de eliminar la posibilidad de una selección basada en la unión a un epítipo que pudiera haber estado enmascarado por la unión del péptido recombinante en FB22 y no así en la biblioteca de *pegA*. Cuando se analizaron los valores de absorbancia fue evidente el aumento en la lectura obtenida en los dos controles, que se incrementó de 0.209 para FB22 a 0.302 para M13. Esto indica que existe una unión de los anticuerpos en FB22 a una estructura que no está accesible cuando se expresa este péptido recombinante y que probablemente no sea así con la biblioteca de *pegA*, pues a pesar de aumentar las partículas de fago expresando los péptidos recombinantes en la segunda ELISA no superaron por más de una desviación estándar el valor del control negativo, mientras que cuando se

compararon con FB22 los valores se encontraban por arriba de dos desviaciones respecto al control negativo.

Tras obtener los resultados de ELISA se seleccionaron 5 clonas y se obtuvieron las secuencias de nucleótidos para ser analizadas en busca del marco de lectura que permitiera la expresión del péptido recombinante en fusión a la región N-terminal de la proteína pVIII del fago M13. Esto se llevó a cabo mediante un análisis *in silico* que permitiera determinar si las secuencias se encontraban en el marco de lectura correcto y la secuencia de aminoácidos resultante. La secuencia E2_1_ORF1 fue la única que se encontraba en el marco correcto de lectura y que en teoría permitiría la fusión a pVIII y su expresión.

Es ampliamente reconocido que los ribosomas, tanto de células eucariotas como de procariotas, son capaces de seguir rutas alternativas durante la traducción (*frameshifting*), como son los cambios de marco y el salto de los codones de paro (Parker, 1989; Weiss, 1991; Gurvich *et al.*, 2003), por esto se llevó a cabo la deducción de aminoácidos de los siguientes dos marcos de lectura posibles para cada una de las secuencias obtenidas. El resto de las secuencias analizadas, se encontraban fuera de marco e interrumpidas por uno o varios codones de paro (UGA y UAA) que sí son reconocidos por *E. coli* TG1 como tales. Aunado a que la clonación de los segmentos de ADN fue invertida. El encontrarse con esto es normal ya que la clonación de los insertos se puede dar en tres marcos de lectura distintos para cada dirección y en dos direcciones, dando como resultado una posibilidad sobre 18 de tener un segmento en dirección y en marco correctos. Es por esto último que fue aplicada la ecuación para determinar el número de clonas de Clarke y Carbon (1976). Aunque es probable que a pesar de esto el fago expresara alguna proteína recombinante en su superficie pues las lecturas de absorbancia obtenidas en estas clonas se encontraban significativamente por arriba de la obtenida cuando el suero era enfrentado al fago M13 sin expresar ninguna proteína fusionada a pVIII.

Cuando se llevó a cabo la deducción de las secuencias se hizo una comparación con la secuencia completa de aminoácidos que conforman la proteína PegA de SE (GenBank: SEN2145B) utilizando la herramienta BLAST. De éstas, sólo la secuencia E2_1_ORF1 codificó para una secuencia de 24 aminoácidos, de la cual 15 residuos continuos y 3 más separados por una sustitución de 6 (**cuadro 9**) fueron localizables en el mapa de la proteína PegA plegada (RYAAVENTVTPGSVEQLIHELVLV). Para llevar a cabo el mapeo y debido a que no existen imágenes de cristalografía que muestren la estructura tridimensional de

PegA se hizo una predicción *in silico* del plegamiento de la cadena de aminoácidos reportada. Se utilizó el servidor de modelamiento de estructura de proteínas por homología SWISS-MODEL de ExPASy (Benkert, Biasini and Schwede, 2011; Waterhouse *et al.*, 2018). De esta secuencia de 24 aminoácidos, se determinó mediante el mapeo con PyMOL, que dos secciones de 5 residuos cada una se encuentra expuestas hacia la superficie en caras opuestas, lo que permite deducir que podrían ser accesibles para el reconocimiento de anticuerpos. La primera sección compuesta por los residuos AAVEN y la segunda, PGSVE que se encuentra complementada por 6 residuos que no están presentes en las secuencias de referencia (SVLTMT) y 3 más que sí lo están (VLT). De los residuos sustituidos, dos de ellos, leucina e isoleucina, son sustituciones sinónimas pues estos guardan una estrecha similitud en cuanto a tamaño, hidrofobicidad y carga con respecto a valina y leucina, respectivamente. El resto de los aminoácidos que conforman esta secuencia no estaría expuesto, RY se encuentra en una región hidrofóbica al interior de la proteína y TVT se encuentra hacia la superficie de la proteína que tiene contacto con otra subunidad PegA para formar el filamento que conforma la fimbria. Por esto, se puede deducir que quedarían ocultos e imposibilitados para interactuar con el anticuerpo. Los epítopes lineales que se han descrito hasta la fecha varían de entre 4 y 7 aminoácidos como tamaño mínimo para la interacción con el parátipo (Geysen, Rodda and Mason, 1986; Van Regenmortel, 1989; Phalipon *et al.*, 1992; Buus *et al.*, 2012) y se ha observado que los anticuerpos son tan específicos que frecuentemente no llevan a cabo la unión después de la sustitución de un solo residuo conservado en el epítipo (Rudikoff *et al.*, 1982; Xiang *et al.*, 1993; Winkler *et al.*, 2000; Lottspeich and Engels, 2018). Esto hecho convierte a dichas secuencias en buenas candidatas para su detección por anticuerpos en el momento de que la proteína está plegada. La presencia de la sustitución sinónima de dos aminoácidos podría haber permitido que anticuerpos evocados con la proteína PegA fueran capaces de reconocer esta secuencia de aminoácidos. Por otra parte, la misma secuencia de nucleótidos, pero en el marco de lectura +3 (E2_1 (3)) se encuentra interrumpida por 2 codones de paro UGA. Este codón se ha observado que es menos eficiente en el proceso de terminación de la traducción mediante la inserción de un triptófano en una fracción importante de proteínas sobreexpresadas (MacBeath and Kast, 1998; Cridge *et al.*, 2006). Lo interesante de esta secuencia es que probablemente que el péptido también se haya expresado bajo las siguientes condiciones, es decir, que la bacteria realizara la lectura del ORF +3 y que ignorara el codón de paro ópalo dando como resultado la secuencia de 16 aminoácidos

(TANPRISFNRSQFVDN) que pudo ser mapeada en PegA. Esto también confirma que los insertos clonados corresponden a concatémeros, lo cual se comprobó al hacer un alineamiento de los nucleótidos con la secuencia de origen (información no mostrada). Al hacerlo también se pudo observar que estos concatémeros fueron de máximo dos segmentos de ADN de distintos tamaños.

Al mapear la secuencia TANPRISFNRSQFVDN se pudo observar que 7 de los residuos se encuentran hacia la superficie de la proteína y que tienen una interacción con la secuencia AAVEN de 5 aminoácidos del péptido anterior. Debido a que esta segunda secuencia se encuentra en la misma clona no se puede asegurar que el segundo péptido se haya expresado y en caso de que así sucediera, tampoco se puede saber cuál fue la proporción en que se expresaron cada uno, por lo que no se puede decir si alguno de ellos tiene mayor reactividad ante el antisuero. Pero debido a que se encuentra en la misma cara de la proteína que el otro epítipo y a su interacción con residuos de éste, sería interesante evaluar estas dos secuencias por separado. Además, si bien la estrategia utilizada en este trabajo no se enfoca en la búsqueda de epítopes discontinuos, es probable que la interacción de estas dos secuencias pueda comportarse como un epítipo conformacional.

La unión del anticuerpo con su antígeno depende principalmente de la accesibilidad del epítipo, así como de la carga presente en cada uno de los aminoácidos, aunque esta última característica es la que define en mayor medida tanto el arreglo como la estructura de las proteínas. Esto se da principalmente al plegarse hacia el interior todos aquellos aminoácidos hidrofóbicos y hacia la superficie todos aquellos que son hidrofílicos (Kauzmann, 1959; Dill, 1990) aunque se sabe que hay aminoácidos hidrófobos que se encuentran en la superficie de las proteínas (Mallehappa Gowder *et al.*, 2014).

A pesar de no conocer la contraparte que se une a los epítopes descritos en este trabajo, es importante para futuros análisis conocer la naturaleza de los aminoácidos que los componen. AAVEN tiene dos alaninas (A) y una valina (V) continuos que son aminoácidos hidrofóbicos seguidos de un ácido glutámico (E) y una asparagina (N) que son hidrofílicos. El epítipo PGSVE inician con dos aminoácidos hidrófobos que son prolina (P) y glicina (G), una serina (S) hidrofílica, una V hidrófoba y termina con un E hidrofílico. Por otro lado, el epítipo NRSQFVD se compone de una N, una arginina (R), una S y una glutamina (Q) hidrofílicas, posteriormente una fenilalanina (F) y una V hidrófoba, y, por último, un ácido aspártico (D) hidrófilo. Existe la presencia de residuos tanto hidrofílicos como hidrófobos en todas las

secuencias, pero si bien se ha identificado que la presencia de aminoácidos hidrofílicos facilitan el reconocimiento y la unión estable del parátipo con su epítipo (Peng *et al.*, 2014), también se sabe que específicamente para los epítipos reconocidos por las células del tipo CD8+, la presencia de aminoácidos hidrófobos son un sello distintivo por lo que la adición de este tipo de residuos a la predicción de epítipos incrementa la eficiencia para la identificación de secuencias reconocidas por células T (Chowell *et al.*, 2015).

Debido a que el objetivo de este estudio fue la selección de epítipos para el desarrollo futuro de inmunógenos y pruebas diagnósticas, se realizó una búsqueda de homología con otras proteínas de microorganismos similares. Los resultados arrojan un nivel de homología del 75% con la proteína StcA de *Salmonella* subespecie *enterica* (serovariedades London y Braenderup). El operón *stc* se ha descrito en las serovariedades Typhimurium, Cholerasuis y Typhi, presentando una homología de entre el 60 y 70% con el operon *peg* (Nuccio and Baumler, 2007). Por otro lado el operón *stc* también se ha visto involucrado en la invasión y persistencia a nivel intestinal en ratones (Humphries, Deridder and Bäumlner, 2005; Weening *et al.*, 2005; Łaniewski *et al.*, 2017). La importancia de esto radica en que el operón *peg* y su homólogo se encuentran en serovariedades generalistas como SE y ST, en las adaptadas a ciertos huéspedes como *S. Cholerasuis*, así como en serovariedades restringidas a un solo huésped como es el caso de *S. Typhi* (Singh, 2013). Esta situación debe ser considerada en un futuro para determinar las capacidades inmunogénicas en contra de estas serovariedades y comprobar si estos epítipos ofrecen alguna ventaja.

Estos resultados en conjunto permiten tener una primera visión de la presencia de epítipos en proteínas de importancia en la adhesión de *Salmonella*; así como su localización, y composición de residuos. Adicionalmente, la respuesta obtenida en las pruebas de ELISA que los hace interesantes para seguir siendo evaluados. Por otro lado, es importante seguir con la búsqueda de más secuencias dentro de esta proteína y de otras como StdA o StbA, por ejemplo, para tener opciones que puedan ser evaluadas posteriormente, por separado o en conjunto, y seleccionar al mejor o los mejores candidatos, tanto para ser utilizado como inmunógenos o para pruebas diagnósticas.

Si bien existe la predicción *in silico* y la síntesis de péptidos, aún existen desventajas en la predicción debido al alto grado de polimorfismo en las moléculas MHC y la disparidad en la cantidad de información en varios pasos encontrados tanto en la generación como en la presentación a las células T en los organismos vivos (Desai and Kulkarni-Kale, 2014). Lo

mismo sucede para los epítopes de células B puesto que las diferencias entre los residuos en los epítopes y el resto no son sustanciales (Sela-Culang, Kunik and Ofran, 2013). La técnica de despliegue en fago ha demostrado su utilidad y poder pues la generación de las dos bibliotecas aquí reportadas ofrece una ventaja, basta con volver a hacer un escrutinio con ellas para verificar si existen más epítopes y en su caso sintetizarlos, teniendo mayor seguridad sobre su reactividad para ser evaluados posteriormente.

Actualmente existen tres tipos de vacunas que han sido probadas en aves, las vivas atenuadas, las inactivadas por calor y las vacunas de subunidades. Todas han logrado disminuir signos y niveles de colonización pero no eliminan la bacteria completamente, lo que permite la presencia de portadores asintomáticos que la excretan (Desin, Köster and Potter, 2013). El enfoque de las vacunas anti-adhesión consiste en evitar que la bacteria tenga un contacto adecuado con la célula huésped impidiendo su invasión (Ofek, Hasty and Sharon, 2003; Technischen and Schmitt, 2010; Krachler and Orth, 2013). Por lo que, al encontrar epítopes en proteínas encargadas de la adhesión podría permitir el desarrollo de un candidato inmunogénico de subunidades que impida la adhesión y subsecuente invasión por parte de la bacteria. Por eso, en este trabajo se realizó una primera búsqueda de candidatos y mapeo de epítopes de la proteína PegA que se ha demostrado tiene una importancia en la colonización del ciego en aves de producción (Clayton *et al.*, 2008), en células en cultivo (Silva *et al.*, 2012) y en bazo e hígado de ratones (Shah *et al.*, 2012).

IX. PROSPECTIVA

- La realización de un tamizaje más meticuloso tanto del tercer y segundo eluidos como de la biblioteca completa mediante la utilización de un anticuerpo de captura anti IgY de ave.
- La síntesis de los péptidos recombinantes reconocidos como epítopes en este trabajo para su evaluación en un modelo *in vivo* para determinar su potencial inmunogénico.
- Una búsqueda de epítopes en una biblioteca a partir del gen *stdA* generada en este mismo trabajo, y en caso de identificarlos, probar la combinación de éstos con los detectados en la biblioteca de *pegA*.
- La generación de bibliotecas de otras adhesinas fimbriales que estén implicadas en la invasión exitosa por parte de *Salmonella*.
- Determinar la utilidad de estos péptidos como antígenos para la detección específica de serovariedades de *Salmonella* por técnica de ELISA.

X. CONCLUSIONES

- Es viable la construcción de una biblioteca a partir del gen *pegA* mediante la generación de segmentos aleatorios de 30 a 100 pares de bases cada uno y su clonación en el vector pG8SAET, así como el despliegue de los péptidos recombinantes en la cápside del fago.
- Las secuencias de aminoácidos RYAAVENTVTPGSVE y TANPRISFNRSQFVDN fueron mapeadas en la representación de la predicción tridimensional de la proteína PegA plegada para la determinación de su localización y accesibilidad.

XI. REFERENCIAS

- Agnès, W. *et al.* (2014) 'Interactions of *Salmonella* with animals and plants', *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), pp. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2014.00791.
- Álvarez-Ordóñez, A. *et al.* (2008) 'Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella* Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 123(3), pp. 212–219. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.01.015.
- Álvarez-Ordóñez, A. *et al.* (2011) '*Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract', *Microbiology*, 157(12), pp. 3268–3281. doi: 10.1099/mic.0.050351-0.
- Anaya-Santillán, M. G. (2011) 'Manual de Elaboración y Control de Calidad de Insumos de Soporte Biológicos y No Biológicos. 6a revisión'. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Ascón, M. A. *et al.* (1998) 'Oral Immunization with a *Salmonella* Typhimurium Vaccine Vector Expressing Recombinant Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 Fimbriae Elicits Elevated Antibody Titers for Protective Immunity', *INFECTION AND IMMUNITY*, 66(11), pp. 5470–5476. Available at: <http://iai.asm.org/> (Accessed: 23 July 2018).
- Atterbury, R. J. *et al.* (2010) 'Effect of delivery method on the efficacy of *Salmonella* vaccination in chickens.', *The Veterinary record*. British Medical Journal Publishing Group, 167(5), pp. 161–4. doi: 10.1136/vr.b4884.
- Ausubel, F. M. *et al.* (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. ringbou. Edited by M. Ausubel et al. John Wiley & Sons Inc.
- Bagust, T. (2012) *Salud de las aves de corral y control de enfermedades en los países en desarrollo - Patógenos emergentes causantes de enfermedades avícolas*. Melbourne, Australia. Available at: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/8ce48384-1515-571c-89f9-2bed335b6c42> (Accessed: 10 July 2018).
- Basler, K. *et al.* (1986) 'Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene', *Cell*. Cell Press, 46(3), pp. 417–428. doi: 10.1016/0092-8674(86)90662-8.
- Bäumler, A. J. *et al.* (1996) 'The pef fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse', *Infection and Immunity*, 64(1), pp. 61–68.
- Benkert, P., Biasini, M. and Schwede, T. (2011) 'Toward the estimation of the absolute

quality of individual protein structure models’, *Bioinformatics*. Oxford University Press, 27(3), pp. 343–350. doi: 10.1093/bioinformatics/btq662.

Bennett, J. E. (John E., Dolin, R. and Mandell, G. L. (2010) *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and practice of infectious diseases. Vol. 1*. Churchill Livingstone Elsevier.

Bhunja, A. (2008) ‘Foodborne Microbial Pathogens - Mechanisms and Pathogenesis | Springer’, in *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. 2nd edn. Springer Nature, pp. 125–134. Available at: [https://books.google.com.mx/books?id=KolcDwAAQBAJ&pg=PA273&lpg=PA273&dq=salmonellosis+septicemica+humans&source=bl&ots=Vcq3Xl2dDx&sig=FLNEETpfmA_oW4IgBtYeUM07ZYE&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwisve3asJXcAhVQRa0KHS5KBecQ6AEIWjAF#v=onepage&q=salmonellosis septicem](https://books.google.com.mx/books?id=KolcDwAAQBAJ&pg=PA273&lpg=PA273&dq=salmonellosis+septicemica+humans&source=bl&ots=Vcq3Xl2dDx&sig=FLNEETpfmA_oW4IgBtYeUM07ZYE&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwisve3asJXcAhVQRa0KHS5KBecQ6AEIWjAF#v=onepage&q=salmonellosis%20septicem) (Accessed: 10 July 2018).

Braden, C. R. (2006) ‘*Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States’, *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press, 43(4), pp. 512–517. doi: 10.1086/505973.

Brenner, F. W. *et al.* (2000) ‘Guest Commentary’, *Journal of clinical microbiology*, 38(7), pp. 2465–2467. doi: 10.1128/JB.00499-06.

De Buck, J. *et al.* (2004) ‘Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*’, *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), pp. 233–245. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02294.x.

Buus, S. *et al.* (2012) ‘High-resolution mapping of linear antibody epitopes using ultrahigh-density peptide microarrays.’, *Molecular & cellular proteomics : MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 11(12), pp. 1790–800. doi: 10.1074/mcp.M112.020800.

Carbonetti, N. H. *et al.* (1999) ‘Intracellular delivery of a cytolytic T-lymphocyte epitope peptide by pertussis toxin to major histocompatibility complex class I without involvement of the cytosolic class I antigen processing pathway.’, *Infection and immunity*. American Society for Microbiology, 67(2), pp. 602–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916065> (Accessed: 30 July 2018).

Carboni, F. *et al.* (2017) ‘Structure of a protective epitope of group B *Streptococcus* type III capsular polysaccharide’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(19), pp. 5017–5022. doi: 10.1073/pnas.1701885114.

- Carter, P. B. and Collins, F. M. (1974) 'The route of enteric infection in normal mice.', *The Journal of experimental medicine*, 139(5), pp. 1189–203. doi: 10.1084/jem.139.5.1189.
- CDC (2014) *National Salmonella Surveillance Annual Report, 2012*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014.
- CDC, C. for D. C. and P. (2012) *Salmonellosis*.
- Cerquetti, M. C. and Gherardi, M. M. (2000) 'Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella* Enteritidis', *Vaccine*. Elsevier, 18(11–12), pp. 1140–1145. doi: 10.1016/S0264-410X(99)00377-1.
- Chessa, D. *et al.* (2008) 'Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 283(13), pp. 8118–24. doi: 10.1074/jbc.M710095200.
- Chessa, D. *et al.* (2009) '*Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2) fucose residues in the cecal mucosa.', *Molecular microbiology*. NIH Public Access, 71(4), pp. 864–75. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06566.x.
- Chowell, D. *et al.* (2015) 'TCR contact residue hydrophobicity is a hallmark of immunogenic CD8+ T cell epitopes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(14), pp. E1754–62. doi: 10.1073/pnas.1500973112.
- Clarke, L. and Carbon, J. (1976) 'A colony bank containing synthetic ColEI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome', *Cell*, 9(1), pp. 91–99. doi: 10.1016/0092-8674(76)90055-6.
- Clayton, D. J. *et al.* (2008) 'Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus', *BMC Microbiology*, 8, pp. 1–15. doi: 10.1186/1471-2180-8-228.
- Coley, A. M. *et al.* (2001) 'Rapid and precise epitope mapping of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* AMA1 by combined phage display of fragments and random peptides.', *Protein engineering*, 14(9), pp. 691–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707616> (Accessed: 19 July 2018).
- Crawford, P. C. and Clark, W. B. (1986) 'Modulation of *Actinomyces viscosus* colonization of mouse teeth in vivo by immunization with fimbrial adhesins.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 54(2), pp. 516–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2876963> (Accessed: 23 July 2018).

- Cridge, A. G. *et al.* (2006) 'Comparison of characteristics and function of translation termination signals between and within prokaryotic and eukaryotic organisms', *Nucleic Acids Research*, 34(7), pp. 1959–1973. doi: 10.1093/nar/gkl074.
- Desai, D. V. and Kulkarni-Kale, U. (2014) 'T-cell epitope prediction methods: An overview', *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY, 1184, pp. 333–364. doi: 10.1007/978-1-4939-1115-8_19.
- Desin, T. S., Köster, W. and Potter, A. A. (2013) 'Salmonella vaccines in poultry: Past, present and future', *Expert Review of Vaccines*, 12(1), pp. 87–96. doi: 10.1586/erv.12.138.
- Dill, K. A. (1990) 'Dominant forces in protein folding', *Biochemistry*, 29(31), pp. 7133–7155. doi: 10.1021/bi00483a001.
- Dirección General de Epidemiología. (2017) *Histórico Boletín Epidemiológico*. Available at: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico> (Accessed: 18 July 2018).
- EU EFSA (2004) 'Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry', *EFSA Journal*, 2(12), p. 114. doi: 10.2903/j.efsa.2004.114.
- EU EFSA (2007) 'Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*', *EFSA Journal*, 5(2), p. 97r. doi: 10.2903/j.efsa.2007.97r.
- EU EFSA (2011) *Salmonella*. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>.
- EU EFSA (2017) 'The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016', *EFSA Journal*, 15(12). doi: 10.2903/j.efsa.2017.5077.
- Flores Castro, R. (1981) 'Epizootiología de la salmonelosis en bovinos, porcinos y aves', *Ciencia Veterinaria*, pp. 148–177.
- Gantois, I. *et al.* (2006) 'Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella vac*® E and TAD *Salmonella vac*® T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis', *Vaccine*. Elsevier, 24(37–39), pp. 6250–6255. doi: 10.1016/J.VACCINE.2006.05.070.
- Gantois, I. *et al.* (2008) 'A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*', *Avian Pathology*. Taylor & Francis Group, 37(4), pp.

399–406. doi: 10.1080/03079450802216611.

Gantois, I. *et al.* (2009) ‘Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis’, *FEMS Microbiology Reviews*. Wiley/Blackwell (10.1111), 33(4), pp. 718–738. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x.

Gast, R. K. (2007) ‘Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne *Salmonella* in Poultry’, *Avian Diseases*, 51(4), pp. 817–828. doi: 10.1637/8090-081807.1.

Gast, R. K., Stone, H. D. and Holt, P. S. (1993) ‘Evaluation of the Efficacy of Oil-Emulsion Bacterins for Reducing Fecal Shedding of *Salmonella* Enteritidis by Laying Hens’, *Avian Diseases*. American Association of Avian Pathologists, 37(4), p. 1085. doi: 10.2307/1591918.

Geysen, H. M., Rodda, S. J. and Mason, T. J. (1986) ‘A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant.’, *Molecular immunology*, 23(7), pp. 709–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2432410> (Accessed: 10 August 2018).

Ghosh, S. *et al.* (2011) ‘An adhesion protein of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for pathogenesis and potential target for vaccine development.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108(8), pp. 3348–53. doi: 10.1073/pnas.1016180108.

Grimont, P. and Weill, F.-X. (2008) ‘Antigenic formulae of the *Salmonella* servovars’, *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*, pp. 1–167. Available at: <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089%5Cnpapers2://publication/uuid/CA3447A0-61BF-4D62-9181-C9BA78AF0312>.

Gurvich, O. L. *et al.* (2003) ‘Sequences that direct significant levels of frameshifting are frequent in coding regions of *Escherichia coli*.’, *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 22(21), pp. 5941–50. doi: 10.1093/emboj/cdg561.

Gutiérrez-Cogco, L. *et al.* (2000) ‘*Salmonella* serotypes identified in Mexican health services’, *Salud publica de Mexico*, 42(6), pp. 490–495. doi: 10.1590/S0036-36342000000600004.

Haraga, A., Ohlson, M. B. and Miller, S. I. (2008) ‘*Salmonellae* interplay with host cells’, *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), pp. 53–66. doi: 10.1038/nrmicro1788.

Hassan, J. O. *et al.* (1991) ‘Infection and Reinfection of Chickens with *Salmonella* Typhimurium: Bacteriology and Immune Responses’, *Avian Diseases*. American

- Association of Avian Pathologists, 35(4), p. 809. doi: 10.2307/1591614.
- Hebert, G. A. (1974) 'Ammonium sulfate fractionation of sera: mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine, chicken, and cattle.', *Applied microbiology*, 27(2), pp. 389–93. doi: 10.1016/S0076-6879(07)00813-0.
- Henry, T. J. and Pratt, D. (1969) 'The proteins of bacteriophage M13.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 62(3), pp. 800–7. doi: 10.1073/PNAS.62.3.800.
- Hill, H. R. and Stockley, P. G. (1996) 'Phage presentation', *Molecular Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 20(4), pp. 685–692. doi: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02508.x.
- Houot, L. *et al.* (2012) 'A bacterial two-hybrid genome fragment library for deciphering regulatory networks of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*', *Microbiology (United Kingdom)*, 158(8), pp. 1964–1971. doi: 10.1099/mic.0.057059-0.
- Humphries, A., Deridder, S. and Bäumlner, A. J. (2005) '*Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial proteins serve as antigens during infection of mice.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology, 73(9), pp. 5329–38. doi: 10.1128/IAI.73.9.5329-5338.2005.
- Iankov, I. D. *et al.* (2001) 'Monoclonal antibodies of IgA isotype specific for lipopolysaccharide of *Salmonella* Enteritidis : production, purification, characterization and application as serotyping reagents', *FEMS Microbiology Letters*. Wiley/Blackwell (10.1111), 196(2), pp. 215–221. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10567.x.
- Iankov, I. D. *et al.* (2002) 'Production and characterization of monoclonal immunoglobulin A antibodies directed against *Salmonella* H:g,m flagellar antigen', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Oxford University Press, 33(2), pp. 107–113. doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00579.x.
- Iankov, I. D. *et al.* (2004) 'Protective efficacy of IgA monoclonal antibodies to O and H antigens in a mouse model of intranasal challenge with *Salmonella enterica* serotype Enteritidis', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson, 6(10), pp. 901–910. doi: 10.1016/J.MICINF.2004.05.007.
- Jacobsson, K. and Frykberg, L. (1995) 'Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display.', *BioTechniques*, 18(5), pp. 878–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619494> (Accessed: 19 July 2018).
- Kauzmann, W. (1959) 'Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation', in, pp.

1–63. doi: 10.1016/S0065-3233(08)60608-7.

Keller, L. H. *et al.* (1995) ‘*Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens’, *Infection and Immunity*, 63(7), pp. 2443–2449.

Korhonen, T. K. *et al.* (1980) ‘Characterization of type 1 pili of *Salmonella* Typhimurium LT2.’, *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 144(2), pp. 800–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6107289> (Accessed: 18 July 2018).

Krachler, A. M. and Orth, K. (2013) ‘Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy.’, *Virulence*, 4(4), pp. 284–94. doi: 10.4161/viru.24606.

Kügler, J. *et al.* (2013) ‘Oligopeptide M13 phage display in pathogen research’, *Viruses*, 5(10), pp. 2531–2545. doi: 10.3390/v5102531.

Łaniewski, P. *et al.* (2017) ‘Analysis of Spleen-Induced Fimbria Production in Recombinant Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Vaccine Strains.’, *mBio*. American Society for Microbiology, 8(4), pp. e01189-17. doi: 10.1128/mBio.01189-17.

Lax, A. J. *et al.* (1995) ‘Current perspectives in salmonellosis.’, *The British veterinary journal*, 151(4), pp. 351–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7552193> (Accessed: 22 November 2018).

Lin-Fa Wang, M. Y. (2009) ‘Epitope Mapping Using Phage-Display Random Fragment Libraries’, in *Epitope Mapping Protocols*. 2nd edn, pp. 315–332.

Lin, J. *et al.* (1995) ‘Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*’, *Journal of Bacteriology*, 177(14), pp. 4097–4104.

Liu, W. *et al.* (2001) ‘Induction of Humoral Immune Response and Protective Immunity in Chickens against *Salmonella* Enteritidis after a Single Dose of Killed Bacterium-Loaded Microspheres’, *Avian Diseases*. American Association of Avian Pathologists, 45(4), p. 797. doi: 10.2307/1592859.

Lottspeich, F. and Engels, J. W. (2018) *Bioanalytics: Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology*.

MacBeath, G. and Kast, P. (1998) ‘UGA read-through artifacts--when popular gene expression systems need a pATCH.’, *BioTechniques*, 24(5), pp. 789–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9591128> (Accessed: 7 August 2018).

Mallesappa Gowder, S. *et al.* (2014) ‘Prediction and analysis of surface hydrophobic residues in tertiary structure of proteins.’, *TheScientificWorldJournal*. Hindawi, 2014, p.

971258. doi: 10.1155/2014/971258.

Mancera-Martínez, A., Navarrete-Vázquez, J. and Zeckua-Heneidi, A. (2004) 'Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella* Enteritidis obtenidos de aves en México.', *Técnica Pecuaria en México*. Secretaria de Agricultura y Ganadería, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, 42(2). Available at: <http://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=61342213> (Accessed: 18 July 2018).

Marvin, D. A. and Hoffmann-Berling, H. (1963) 'Physical and Chemical Properties of Two New Small Bacteriophages', *Nature*. Nature Publishing Group, 197(4866), pp. 517–518. doi: 10.1038/197517b0.

Mathebula, E. M. *et al.* (2017) *The Onderstepoort journal of veterinary research.*, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. OpenJournals Publishing. Available at: <https://ojvr.org/index.php/ojvr/article/view/1313/1588> (Accessed: 30 July 2018).

McClelland, M. *et al.* (2001) 'Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2.', *Nature*, 413(6858), pp. 852–6. doi: 10.1038/35101614.

McGhie, E. J. *et al.* (2009) '*Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 12(1), pp. 117–124. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.001.

Messing, J. *et al.* (1977) 'Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 74(9), pp. 3642–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/333444> (Accessed: 19 July 2018).

Mett, H., Kloetzlen, L. and Vosbeck, K. (1983) 'Fimbria-specific antibodies detach *Escherichia coli* from human cells.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 40(3), pp. 862–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189785> (Accessed: 23 July 2018).

Michetti, P. *et al.* (1992) 'Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella* Typhimurium.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 60(5), pp. 1786–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373399> (Accessed: 19 July 2018).

Morris, G. E. (2014) 'Choosing a Method for Epitope Mapping', *Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press, pp. 1–9. doi: 10.1385/0-89603-375-9.

Morse, S. A. (1996) 'Medical Microbiology', in S., B. (ed.) *Medical Microbiology 4th edition*. 4th edn. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>.

Nuccio, S.-P. and Baumler, A. J. (2007) 'Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial Classification Goes Greek', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(4), pp. 551–575. doi: 10.1128/MMBR.00014-07.

Ochoa-Repáraz, J. *et al.* (2004) 'Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella* Enteritidis against outer membrane proteins and other surface structural antigens', *Veterinary Research*. EDP Sciences, 35(3), pp. 291–298. doi: 10.1051/vetres:2004011.

Ofek, I., Bayer, E. A. and Abraham, S. N. (2013) 'Bacterial Adhesion', in *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 107–123. doi: 10.1007/978-3-642-30144-5_50.

Ofek, I., Hasty, D. L. and Sharon, N. (2003) 'Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: Prospects and problems', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38(3), pp. 181–191. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00228-1.

Olivera, N. *et al.* (2014) 'Immunization with the recombinant Cholera toxin B fused to Fimbria 2 protein protects against *Bordetella pertussis* infection.', *BioMed research international*. Hindawi, 2014, p. 421486. doi: 10.1155/2014/421486.

OMS (2018) *Salmonella no tifoidea, Nota informativa*.

P. Smith, G. and A. Petrenko, V. (1997) 'Phage Display'. American Chemical Society. doi: 10.1021/CR960065D.

Papezova, K. *et al.* (2008) *Comparison of live and inactivated Salmonella Typhimurium vaccines containing different combinations of SPI-1 and SPI-2 antigens in poultry, Veterinarni Medicina*. Available at: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/01577.pdf> (Accessed: 22 November 2018).

Parker, J. (1989) 'Errors and alternatives in reading the universal genetic code.', *Microbiological reviews*, 53(3), pp. 273–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2677635><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC372737><http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC372737/pdf/microrev00042-0009.pdf><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid>.

- Pedroza-Roldan, C. *et al.* (2009) 'Variable epitope library-based vaccines: Shooting moving targets', *Molecular Immunology*, 47(2–3), pp. 270–282. doi: 10.1016/j.molimm.2009.09.024.
- Peng, H.-P. *et al.* (2014) 'Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(26), pp. E2656-65. doi: 10.1073/pnas.1401131111.
- Petrenko, V. A. and Smith, G. P. (2005) 'Vectors and Modes of Display'. CRC Press, pp. 83–130. doi: 10.1201/9780849359125-7.
- Phalipon, A. *et al.* (1992) 'Identification and characterization of B-cell epitopes of IpaC, an invasion-associated protein of *Shigella flexneri*.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM), 60(5), pp. 1919–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373401> (Accessed: 10 August 2018).
- Pini, A. and Bracci, L. (2000) 'Phage Display of Antibody Fragments', *Current Protein and Peptide Science*, 1(2), pp. 155–169. doi: 10.2174/1389203003381397.
- Porwollik, S. (2011) *Salmonella : from genome to function*. Caister Academic Press.
- Qi, H. *et al.* (2012) 'Phagemid vectors for phage display: Properties, characteristics and construction', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 417(3), pp. 129–143. doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.038.
- Rakonjac, J. (2012) 'Filamentous Bacteriophages: Biology and Applications', in *eLS*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9780470015902.a0000777.
- Rami, A. *et al.* (2017) 'An overview on application of phage display technique in immunological studies', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), pp. 599–602. doi: 10.1016/j.apjtb.2017.06.001.
- Van Regenmortel, M. H. (1989) 'Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity.', *Immunology today*, 10(8), pp. 266–72. doi: 10.1016/0167-5699(89)90140-0.
- Rudikoff, S. *et al.* (1982) 'Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 79(6), pp. 1979–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6804947> (Accessed: 10 August 2018).
- Salazar-González, R. M. *et al.* (2004) 'Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar Typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever', *Immunology Letters*. Elsevier,

93(2–3), pp. 115–122. doi: 10.1016/J.IMLET.2004.01.010.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (David W. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Available at: https://books.google.com.mx/books/about/Molecular_Cloning.html?hl=es&id=YTxKwWUiBeUC&redir_esc=y (Accessed: 11 June 2018).

Sela-Culang, I., Kunik, V. and Ofran, Y. (2013) ‘The structural basis of antibody-antigen recognition.’, *Frontiers in immunology*. Frontiers Media SA, 4, p. 302. doi: 10.3389/fimmu.2013.00302.

Shah, D. H. *et al.* (2012) ‘Transposon mutagenesis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis identifies genes that contribute to invasiveness in human and chicken cells and survival in egg albumen’, *Infection and Immunity*, 80(12), pp. 4203–4215. doi: 10.1128/IAI.00790-12.

Silva, C. A. *et al.* (2012) ‘Infection of mice by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar typhimurium’, *Infection and Immunity*, 80(2), pp. 839–849. doi: 10.1128/IAI.05497-11.

Singh, B. *et al.* (2015) ‘Antibody-mediated disruption of the mechanics of CS20 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 13678. doi: 10.1038/srep13678.

Singh, B. *et al.* (2017) ‘Antibodies Damage the Resilience of Fimbriae, Causing Them To Be Stiff and Tangled.’, *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 199(1), pp. e00665-16. doi: 10.1128/JB.00665-16.

Singh, V. (2013) ‘*Salmonella* Serovars and Their Host Specificity’, *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*. Annex Publishers, 1(3), p. 1. doi: 10.15744/2348-9790.1.301.

Soto, G. E. and Hultgren, S. J. (1999) ‘Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly.’, *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology, 181(4), pp. 1059–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973330> (Accessed: 24 July 2018).

Stones, D. H. and Krachler, A. M. (2016) ‘Against the tide: the role of bacterial adhesion in host colonization.’, *Biochemical Society transactions*. Portland Press Ltd, 44(6), pp. 1571–1580. doi: 10.1042/BST20160186.

Sun, R. *et al.* (2000) ‘Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* k88ac fimbria to its receptor, intestinal mucin-type glycoproteins, by a monoclonal antibody directed against a variable domain of the fimbria.’, *Infection and immunity*. American Society for Microbiology (ASM),

68(6), pp. 3509–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816505> (Accessed: 23 July 2018).

Technischen, F. Der and Schmitt, M. (2010) ‘Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections Expert’, 3(5), pp. 1051–1067.

Thiagarajan, D., Saeed, A. M. and Asem, E. K. (1994) ‘Mechanism of Transovarian Transmission of *Salmonella* Enteritidis in Laying Hens’, *Poultry Science*. Oxford University Press, 73(1), pp. 89–98. doi: 10.3382/ps.0730089.

Thomson, N. R. *et al.* (2008) ‘Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways.’, *Genome research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 18(10), pp. 1624–37. doi: 10.1101/gr.077404.108.

UNA (2018) *Unión Nacional de Avicultores, INDICADORES ECONÓMICOS*. Available at: <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos> (Accessed: 19 July 2018).

US FDA (2015) *Bad Bug Book: Salmonella*. Available at: <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/ucm069966.htm>.

USDA (2016) ‘United States Department of Agriculture Food Safety And Inspection Service Serotypes Profile of *Salmonella* Isolates from Meat and Poultry Products’. Available at: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/3866026a-582d-4f0e-a8ce-851b39c7390f/Salmonella-Serotype-Annual-2014.pdf?MOD=AJPERES> (Accessed: 18 July 2018).

Velge, P. *et al.* (2012) ‘Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms , a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis’, *MicrobiologyOpen*, pp. 243–258. doi: 10.1002/mbo3.28.

Vieira, J. and Messing, J. (1987) ‘[1] Production of single-stranded plasmid DNA’, *Methods in Enzymology*. Academic Press, 153, pp. 3–11. doi: 10.1016/0076-6879(87)53044-0.

Wagner, C. and Hensel, M. (2011) ‘Bacterial Adhesion’, in, pp. 17–34. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9.

Wang, L.-F. and Yu, M. (2004) ‘Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics.’, *Current drug targets*, 5(1), pp. 1–15. doi: 10.2174/1389450043490668.

Waterhouse, A. *et al.* (2018) ‘SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures

and complexes', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(W1), pp. W296–W303. doi: 10.1093/nar/gky427.

Webster, R. (1996) 'Chapter 1. Biology of the filamentous bacteriophage', *Phage Display of Peptides and Proteins. A*, pp. 1–20. doi:10.1016/B978-012402380-2/50003-4.

Weening, E. H. *et al.* (2005) 'The *Salmonella enterica* Serotype Fimbrial Operons Are Required for Intestinal Persistence in Mice sth Fimbrial Operons Are Required for Intestinal Persistence in Mice', *Infection and Immunity*, 73(6), pp. 3358–3366. doi: 10.1128/IAI.73.6.3358.

Weiss, R. (1991) 'Ribosomal frameshifting, jumping and readthrough', *Current Opinion in Cell Biology*, pp. 1051–1055.

Winkler, K. *et al.* (2000) 'Changing the antigen binding specificity by single point mutations of an anti-p24 (HIV-1) antibody.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 165(8), pp. 4505–14. doi: 10.4049/JIMMUNOL.165.8.4505.

World Health Organization. and Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2002) *Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens*. World Health Organization.

Wray, C. (Clifford) and Wray, A. (2000) *Salmonella in domestic animals*. CABI Pub.

Xiang, J. *et al.* (1993) 'Differences in antigen-binding affinity caused by single amino acid substitution in the variable region of the heavy chain', *Immunology and Cell Biology*. Nature Publishing Group, 71(4), pp. 239–247. doi: 10.1038/icb.1993.28.

Yang, S. *et al.* (2005) 'A method for filling in the cohesive ends of double-stranded DNA using Pfu DNA polymerase', *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42(3), p. 223. doi: 10.1042/BA20040195.

Yu, M. *et al.* (1996) 'Fine Mapping of a C-Terminal Linear Epitope Highly Conserved among the Major Envelope Glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of Different Pestiviruses', *Virology*. Academic Press, 222(1), pp. 289–292. doi: 10.1006/VIRO.1996.0423.

Yue, M. *et al.* (2012) 'Diversification of the *Salmonella* Fimbriae : A Model of Macro- and Microevolution', *PLoS ONE*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0038596.

Zaidi, M. B., Macías, C. L. and Calva, E. (2006) 'Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular', *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), pp. 121–125. Available at: <http://www.medigraphic.com/cgi->

bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=11455 (Accessed: 22 November 2018).

Zhang, L. *et al.* (1999) 'Staphylococcus aureus expresses a cell surface protein that binds both IgG and 2-glycoprotein I', *Microbiology*. Microbiology Society, 145(1), pp. 177–183. doi: 10.1099/13500872-145-1-177.

van Zonneveld, A.-J. *et al.* (1995) 'Identification of functional interaction sites on proteins using bacteriophage-displayed random epitope libraries', *Gene*. Elsevier, 167(1–2), pp. 49–52. doi: 10.1016/0378-1119(95)00614-1.

XII. ANEXOS

12.1. Protocolos

12.1.1. Componentes para la reacción de PCR en 25 μ L:

Reactivo	Concent. inicial	Volumen	Concent. final
Buffer <i>Taq</i> Pol.	10X	2.5 μ L	1X
MgCl ₂	25mM	4.5 μ L	4.5mM
dNTP's	10 mM c/u	1 μ L	0.4 mM
PYSAET F'	10 μ M	1 μ L	0.4 μ M
F08 R'	10 μ M	1 μ L	0.4 μ M
<i>Taq</i> Pol.	5 U/ μ L	0.2 μ L	1 U/ μ L
DNA (sobrenadante)	--	5 μ L	--
Agua Mili Q	--	9.8 μ L	--

12.1.2. Elaboración de inóculo para la obtención del antisuero

- La bacteria se siembra en placas de agar LB por estría cerrada y se incuban a 37 °C durante toda la noche.
- Al siguiente día se cosechan con un asa bacteriológica y se suspenden en solución salina fisiológica. Asegurarse de que las bacterias queden totalmente suspendidas sin la formación de grumos.
- El frasco se coloca en baño María a 80 °C durante 1 h para inactivar. Mover por agitación el frasco varias veces durante el proceso sin que se pierda el contacto con el agua.
- Una vez inactivado verificar que no haya crecimiento bacteriano. Homogenizar la suspensión y tomar 100 μ L para sembrar en una placa de agar LB por estría continua e incubar toda la noche a 37 °C (Si es necesario volver a someter la suspensión a 80 °C en baño María y verificar nuevamente que no haya crecimiento).
- Ajustar la dilución del antígeno a inocular mediante el método visual de MacFarland a la concentración de bacterias necesario.
- La suspensión bacteriana se puede mantener en refrigeración hasta su uso por no más de 1 mes.

12.1.3. Prueba de aglutinación con el antígeno K polivalente

1. La prueba puede realizarse obteniendo una muestra de sangre completa o suero.
2. La prueba debe realizarse a temperatura ambiente y tanto el antígeno como la muestra problema deben atemperarse durante 10 minutos.
3. Antes de iniciar mezclar el antígeno mediante movimientos circulares y de inversión. Se depositan 0.05 mL de antígeno sobre una placa de vidrio y posteriormente sobre esta gota 0.02 mL de muestra.
4. Inmediatamente se mezclan con ayuda de un palillo limpio y estéril en un área de no más de 2.5 cm de diámetro.
5. Una vez mezclado se agita la placa con movimientos rotatorios y llevar a cabo la lectura en máximo dos minutos. La reacción positiva se da con la formación de pequeños grumos de color morado.

NOTA:

- Es importante realizar la prueba junto con un control positivo y uno negativo.
- La lectura se facilita si hay una fuente de luz por debajo de la placa.

12.1.4. Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio

- a) Centrifugar el suero hiperinmune a 10 000 gravedades durante 20 min en refrigeración.
- b) Recuperar el sobrenadante y eliminar la pastilla.
- c) Agregar solución de sulfato de amonio saturado hasta alcanzar la concentración deseada (35%).
- d) Incubar durante toda la noche a 4 °C.
- e) Centrifugar a 8 000 gravedades durante 20 min a temperatura de refrigeración.
- f) La pastilla formada se suspende en un volumen igual al del suero inicial de PBS 1X.
- g) Agregar nuevamente sulfato de amonio saturado hasta la concentración deseada (35%).
- h) Centrifugar inmediatamente a 8 000 g durante 20 min a 4 °C.
- i) Suspender la pastilla resultante en un volumen igual al inicial y agregar sulfato de amonio por tercera ocasión.
- j) Centrifugar bajo las mismas condiciones.

- k) La pastilla resultante se suspende en el mismo volumen de PBS 1X que los pasos anteriores.
- l) La solución contenedora de las inmunoglobulinas se coloca en una membrana con poro de 35 kDa con los extremos atados y perfectamente asegurados para evitar que haya fuga del líquido.
- m) La membrana se sumerge en solución PBS 1X previamente refrigerada y en agitación.
- n) Se mantiene en refrigeración durante toda la noche haciendo cuatro cambios de solución PBS.

Al día siguiente se recupera el contenido de la membrana y se guarda en congelación a -70 °C hasta su utilización.

12.1.5. Purificación de proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis

(Dr. Ricardo Oropeza Navarro, Lab. E. Calva. Instituto de Biotecnología - UNAM)

- a) Inocular la cepa en 5 mL de caldo LB e incubar toda la noche a 37 °C a 220 rpm.
- b) Concentrar el cultivo en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.
- c) Suspender en 1 mL de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2; si se requiere se guardan 100 µL y el resto se procesa.
- d) Centrifugar 2 min a 12000 rpm a temperatura ambiente.
- e) Tirar el sobrenadante, suspender en 500 µL de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2, por medio de pipeteo, tratando de no hacer espuma.
- f) Sonicar (por pulsos) hasta que la muestra clarifique.
- g) Centrifugar 2 min a 12000 rpm a temperatura ambiente.
- h) Pasar el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga limpio, centrifugar 30 min a 4 °C y tirar el sobrenadante.
- i) Suspender la pastilla del lisado celular en 500 µL de Na₂HPO₄ 10 mM pH7.2/Triton X-100 al 2%.
- j) Incubar a 37 °C por 30 minutos.
- k) Centrifugar 30 min a 4 °C y tirar el sobrenadante.
- l) Suspender 500 µL de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2.
- m) Centrifugar 30 min a 4 °C y tirar el sobrenadante.
- n) Suspender en 50 µL de PBS pH 7.4.

- o) Analizar el perfil de proteínas de membrana externa mediante electroforesis en gel PAGE-SDS.

12.1.6. Sensibilización y bloqueo de placa de ELISA

- a) Se hace una dilución en el buffer adecuado* del antígeno o anticuerpo que se desea adsorber.
- b) Se agregan 100 μL de la dilución anterior en cada pozo, se cubre la placa de la luz y se mantiene en refrigeración a 4 °C durante toda la noche.
- c) Posteriormente se realizan de 3 a 5 lavados con 300 μL de PBS1X-Tween 20 al 0.2%. Si los lavados se hacen manualmente, entre cada uno evitar que el líquido se intercambie entre los pozos y secar golpeando la placa contra una toalla de papel (especialmente en el último lavado).
- d) El bloqueo se lleva a cabo depositando 200 μL de PBS1X con leche descremada Svelty® al 2%. Incubar durante 1 h a 37 °C.
- e) Seguidamente se hacen de 3 a 5 lavados con 300 μL de PBS1X-Tween 20 al 0.2%.

NOTA: La adición de antígenos (fagos), anticuerpos primarios y secundarios se hace en el buffer adecuado, con la concentración deseada. Los lavados se hacen de la misma manera.

*En este trabajo se utilizó buffer de carbonatos (NaHCO_3) pH 9 para anticuerpos y PBS pH 7.5 para fagos.

12.1.7. Concentración de ADN (eliminación de oligos)

- a) Se agregan 300 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcla con vórtex.
- b) Se centrifuga a 13 200 rpm durante 3 min en refrigeración.
- c) El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio y el ADN se precipita durante 1 h a -20 °C con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto
- d) El ADN se recupera centrifugando a 13 200 rpm durante 10 min a 4°C.
- e) La pastilla se limpia de sales con 1 mL de etanol al 70% y centrifugando a 13 200 rpm, 10 min a 4°C.
- f) Se suspende en buffer TE o agua mili Q® estéril.

12.1.8. Transformación de células *E. coli* por electroporación

- a) Se descongela una alícuota de células electrocompetentes en hielo.
- b) Se toman 45 μL de células y se depositan en la celda para electroporación previamente enfriada (por cada transformación a realizar).
- c) Añadir el ADN a transformar y evitar a toda costa la formación de burbujas (las burbujas pueden provocar que el pulso reviente las células).
- d) Colocar la celda en el electroporador previamente programado, dar el pulso y posteriormente recuperar las células en 1 mL de medio SOC en un microtubo para centrifuga de 1.5 mL.
- e) Incubar a 37 °C durante 1 h en agitación suave a 100 rpm.
- f) Tomar 200 μL de cultivo y sembrar en LB con antibiótico utilizando un asa de vidrio (o perlas de vidrio) distribuyendo el líquido por toda la superficie.
- g) Una vez que el líquido se seca completamente se colocan en incubadora a 37 °C durante toda la noche.
- h) Las colonias resultantes son analizadas en busca de la construcción.

12.1.9. Clonación, rescate y precipitación de la biblioteca de fagos (en matraz):

- a) La transformación se recupera en 1 mL de medio SOC por cada transformación realizada y se incuba durante 40 min a 37 °C.
- b) De estos se toman 3 y 30 μL que se siembran con 200 μL de medio líquido 2XYT en una placa con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina cada uno. Se incuban durante toda la noche a 37 °C y con el número de colonias resultantes se calcula la variabilidad de la biblioteca.
- c) El medio con células restante se adiciona con 3 mL más de medio 2XYT fresco y se incuba durante 2 o más horas a 37 °C con agitación para llegar a 1 OD a una longitud de onda de 600 nm.
- d) Se adiciona el cultivo con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina y se incuba durante 1 h más en agitación y a 37 °C.
- e) Posteriormente se toman 3 mL y se centrifugan a 3 000 rpm durante 10 min para recuperar la bacteria y suspender en 3 mL de medio 2XYT con 30% de glicerol y se conservan a -70 °C*. Del volumen restante se toman 30 μL y se inoculan 3 mL de

medio 2XYT adicionados con 50 µg/mL de carbenicilina que se dejan toda la noche a 37 °C y con agitación para realizar extracción de plásmido**.

- f) El rescate se inicia agregando 10 µL de Fago Helper M13 de Invitrogen® a 1 mL del volumen restante (MOI de 1:10).
- g) Se incuba durante 30 min a 37 °C sin agitación y 30 min más con agitación.
- h) El volumen total se utiliza para inocular 100 mL de medio 2XYT con 50 µg/mL de carbenicilina y 50 µg/mL de kanamicina; se mantiene durante 18 h a 37 °C con agitación (250 rpm).
- i) Se eliminan las bacterias colocando el cultivo en botellas para 50 mL y se centrifugan a 8 000 rpm en temperatura de refrigeración durante 20 min. El medio se recupera en botellas nuevas y la pastilla se descarta.
- j) Del volumen recuperado se agrega 1/6 de solución PEG8000 20% - NaCl 2.5M.
- k) Se mezcla completamente y se incuba durante toda la noche a 4 °C.
- l) Al día siguiente se centrifuga a 8 000 rpm en temperatura de refrigeración durante 20 min y se descarta el sobrenadante.
- m) Las pastillas se suspenden en 1 mL de TBS cada uno y se centrifugan a 3 000 rpm durante 5 min para verificar que no haya presencia de bacterias.
 - De haber bacterias se recupera el líquido y se pasa a un tubo nuevo cuidando no llevarse la pastilla de bacterias.
- n) Se precipita nuevamente pero ahora con 1/5 del volumen de solución PEG8000 20% - NaCl 2.5M. Se incuba durante 1 h en hielo.
- o) Se centrifuga a 10 000 rpm durante 20 min a temperatura de refrigeración y la pastilla se suspende en TBS (el volumen dependerá del tamaño de la pastilla).
- p) Se conservan a 4 °C hasta su utilización.

Notas:

*Así se conserva la biblioteca en formato de bacteria.

**De esta manera la biblioteca se guarda en formato de ADN.

12.1.10. Titulación de fagos

- a) A partir de un cultivo de *E. coli* TG1 en agar LB, inocular una asada en medio líquido 2XYT e incubar a 37 °C a 250 rpm hasta alcanzar una OD de 0.7.

- b) Realizar diluciones seriadas de la suspensión de fagos a titular. Se realizarán tantas diluciones como sean necesarias en función de los títulos esperados.
- c) Las diluciones se realizan utilizando medio 2XYT estéril en microtubos con capacidad para 1.5 mL.

Ejemplo:

Dilución	Factor de dilución
I	1:1000
II	1:1000
III	1:100
IV	1:10

- d) Infectar individualmente un tubo con cultivo de *E. coli* TG1 silvestre, con 100 µL de la dilución en turno. Repetir este proceso con cada una de las diluciones necesarias, incluyendo al menos las dos últimas.
- e) Incluir un tubo con células sin infectar como control.
- f) Incubar a 37°C sin agitación durante 40 min.
- g) Tomar 10 µL de cada suspensión de células infectadas, así como el control de células sin infectar. Colocar los 10 µL, dejando caer como gota en medio sólido LB previamente suplementado con 50 µg/mL de carbenicilina.
- h) Adicionalmente, tomar otros 10 µL del control de células sin infectar y colocarlos en medio LB sin antibiótico.
- i) Incubar a 37 °C al menos por 12 h.
- j) Contar el número de colonias obtenidas para cada suspensión de células infectadas y calcular el título correspondiente, considerando los factores de dilución correspondientes.

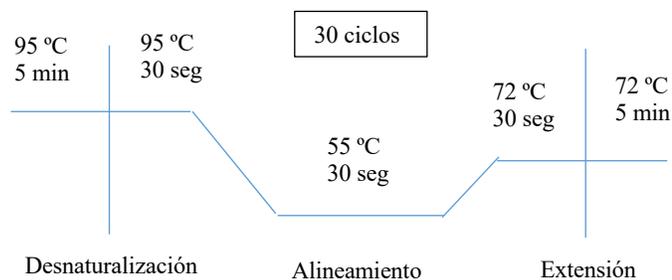
Nota: el volumen de fago para infectar, el de las células y el de siembra puede variar dependiendo del título esperado. El objetivo es calcular un número cuantificable de colonias infectadas por los fagos y que por lo tanto podrán crecer en agar con presencia de antibiótico.

12.1.11. PCR de colonia

- Con un palillo de madera estéril se toca la colonia seleccionada en la placa de medio sólido y se enjuaga en 20 μL de agua mili Q estéril contenidos en un microtubo de 0.6 mL.
- El tubo(s) se coloca en un termo bloque a 85 °C durante 10 min.
- Se centrifuga a 3 000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las bacterias y detritos celulares.
- Se toman 5 μL del sobrenadante y se colocan en la mezcla preparada para la reacción de PCR.
- Reactivos para la PCR:

Reactivo	Concent. inicial	Volumen	Concent. final
Buffer <i>Taq</i> Pol.	10X	2.5 μL	1X
MgCl ₂	25mM	4.5 μL	4.5mM
dNTP's	10 mM c/u	1 μL	0.4 mM
PYSAET F'	10 μM	1 μL	0.4 μM
F08 R'	10 μM	1 μL	0.4 μM
<i>Taq</i> Pol.	5 U/ μL	0.2 μL	1 U/ μL
DNA (sobrenadante)	--	5 μL	--
Agua Mili Q	--	9.8 μL	--

- Condiciones para la PCR:



12.1.12. Clonación, rescate y precipitación de la biblioteca de fagos (en placa de 96 pozos)

- Este protocolo puede partir de un cultivo líquido o de colonias individuales de *E. coli*, portadoras de la biblioteca de interés.

- b) En una placa estéril de polipropileno con 96 pozos y de una capacidad de al menos 700 μL , agregar a cada pozo 300 μL de medio 2xYT estéril y suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina.
- c) A continuación, sembrar una colonia individual en cada pozo de la placa o si se parte de un cultivo líquido, agregar 50 μL del mismo.
- d) Incubar a 37 °C en agitación a 250 rpm hasta obtener una OD de 0.7.
- e) Adicionar fago ayudador (M13K07) a una MOI de 10, diluyendo el volumen de la suspensión de fago ayudador, en 100 μL de medio 2xYT estéril, suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina.
- f) Tras adicionar el fago ayudador, incubar el cultivo a 37 °C por 30 min sin agitación.
- g) Enseguida continuar la incubación a 37 °C durante otros 30 min, pero ahora en agitación a 250 rpm.
- h) A cada pozo agregar 100 μL de medio 2xYT estéril, suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina y con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina.
- i) Colocar en incubación a 30 °C y en agitación a 250 rpm durante un periodo de 16 a 20 h.
- j) Centrifugar a 3 000 rpm y a 4 °C durante 30 min.
- k) Recuperar el sobrenadante en otra placa de 96 pozos estéril, cuidando no tomar restos de la pastilla formada en el fondo.
- l) Agregar solución PEG8000 20%/NaCl 2.5M estéril en un volumen equivalente a 1/6 del volumen total de sobrenadante recuperado en cada pozo.
- m) Mezclar por inversión
- n) Incubar a 4°C por un mínimo de 12 h.
- o) Centrifugar a 3 000 rpm y a 4 °C durante 30 min.
- p) Desechar el sobrenadante.
- q) Suspender el botón con 100 μL de TBS estéril y frío.
- r) Centrifugar a 3 000 rpm y a 4 °C durante 5 min.
- s) Si se observa la formación de un botón en el fondo de los pozos, transferir el sobrenadante a otra placa de 96 pozos estéril.
- t) Almacenar a 4 °C.

12.2. Soluciones:

Solución Salina Fisiológica

0.9% de NaCl en agua libre de pirógenos

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min y con 20 lbs de presión

Solución saturada de Sulfato de Amonio

Debido a que la saturación del sulfato de amonio depende de la temperatura se recomienda seguir la información del cuadro:

Temperatura (°C)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g) para saturar 1000g de H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g) añadidos por litro de solución saturada	Moles de (NH ₄) ₂ SO ₄ en 1000 g de H ₂ O	Porcentaje por peso	Molaridad de solución saturada de (NH ₄) ₂ SO ₄	Volumen aparente específico en la solución saturada	VG/1000
0	706.86	514.72	5.35	41.42	3.90	0.5262	0.271
10	730.53	525.05	5.53	42.22	3.97	0.5357	0.281
20	755.82	536.34	5.73	43.09	4.06	0.5414	0.290
25	766.80	541.24	5.82	43.47	4.10	0.5435	0.294
30	777.55	545.88	5.91	43.85	4.13	0.5458	0.298

Adaptado de Dawson *et al.* (1986) y Taylor (1953)

Solución Buffer de Fosfatos 10X (PBS 10X)

Para preparar 1 L

80 g de NaCl

2 g de KCl

14.4 g Na₂HPO₄

2.4 g de KH₂PO₄

Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.4

Aforar a 1000 mL y esterilizar en autoclave (121 °C durante 15 min y con 20 lbs de presión)

Amortiguador Tris-Glicina pH 8

1.4 g de Tris Base

2.26 g de Glicina

Disolver en agua destilada y ajustar el pH a 8

Amortiguador SB

2 g de Hidróxido de Sodio

9.28 g de Ácido Bórico

Disolver en 800 mL de agua destilada y aforar a 1 L

Solución salina tamponada con Tris (TBS)

50 mM Tris-Cl pH 7.6

150 mM NaCl

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min y con 20 lbs de presión

Buffer para elución de ADN en acrilamida

0.5M Acetato de Amonio

10mM de Acetato de Magnesio tetrahidratado

1mM de EDTA pH 8.0

0.1% de SDS (p/v)

Medio 2xYT

Caldo:

16 g de Bacto Triptona

10 g de extracto de levadura

5 g de NaCl

Disolver en 900 mL de agua, aforar a 1 L y esterilizar en autoclave (121 °C durante 15 min y con 20 lbs de presión)

Agar:

Agregar 12 g de agar bacteriológico y aforar a 1 L y esterilizar en autoclave