



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**Tamizaje de dos bibliotecas de fagos para la identificación
de epítopes en PegA y StdA de *Salmonella enterica*
subespecie enterica serovar Enteritidis**

TESIS

PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JESÚS SERVÍN TOLEDO

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Ricardo Oropeza Navarro

Instituto de Biotecnología

Dr. Lázaro Felipe Verdiguél Fernández

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

SEPTIEMBRE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por todo mi desarrollo y formación académica.

A la FMVZ por ser mi segundo hogar y brindarme todas las herramientas para mi vida profesional.

Al CONACYT por el apoyo que recibí para realizar este trabajo.

Al Dr. Verdugo por siempre creer en mi, ser un ejemplo a seguir y hacerme sentir parte de la familia del laboratorio.

Al Dr. Castañeda por sus observaciones y críticas constructivas en la mejora de este trabajo.

Al Dr. Lázaro por su tolerancia, apoyo y guía durante toda mi formación.

Al Dr. Oropeza por su paciencia, por siempre estar dispuesto a ayudarme y por su detallada revisión del escrito.

A la Dra. Figueroa por sus consejos y observaciones que me permitieron mejorar en gran medida este trabajo.

A la Dra. Estela Mendez Olvera por sus observaciones y cuestionamientos que me permitieron mejorar este trabajo.

A la Dra. María Antonieta Mójica por brindarme su confianza, compartirme sus conocimientos y experiencias, además de estar siempre dispuesta a ayudarme.

A todos los integrantes del laboratorio de microbiología molecular, quienes siempre compartieron sus conocimientos conmigo y me asesoraron durante este trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	2
Biogénesis fimbrial.....	3
Vía chaperona acomodador.....	3
Sistema enucleación / precipitación.....	5
Sistema de secreción general o pili tipo IV.....	5
Operones fimbriales.....	6
Epidemiología.....	8
Patogenia.....	9
Inmunización.....	10
Uso de anticuerpos contra fimbrias.....	11
Inmunoglobulinas en pollos.....	12
Terapia anti-adhesión.....	13
II. JUSTIFICACIÓN	14
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVO GENERAL	14
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	15
Panorama general experimental.....	15
6.1 Medios de cultivo, cepas bacterianas y vectores de clonación utilizados.....	15
6.2 Diseño de iniciadores.....	17
6.3 Extracción de ADN.....	18
6.5 Ensayo de restricción para el producto de PCR.....	19
6.7 Ensayo de restricción con pBAD / Myc-His A con la enzima <i>EcoRV</i>	20
6.8 Producción de células electrocompetentes <i>E.coli</i> BL21 y electroporación.....	21
6.9 Clonación del gen <i>stdA</i> en el plásmido pCR TM 2.1-TOPO.....	21
6.11 Predicción de epítomos de las proteínas StdA y PegA.....	22
VII. RESULTADOS	22
7.1. Determinación del péptido señal y diseño de iniciadores.....	22

7.2 Extracción de ADN cromosómico de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	24
7.3 Reacción en cadena de la polimerasa	25
7.4 Ensayo de digestión del producto de PCR.....	25
7.5 Clonación del gen <i>stdA</i> en el plásmido pCR™2.1-TOPO.....	26
7.6 Extracción del plásmido pBAD/Myc-His A.....	27
7.7 Ensayo de restricción pBAD/Myc-His A.....	27
7.8 Preparación de células electrocompetentes y electroporación	28
7.9 Alineación de aminoácidos de las proteínas StdA y PegA	28
7.10 Predicción de plegamiento de PegA y StdA	29
7.11 Predicción <i>in silico</i> de epítomos de las proteínas StdA y PegA.....	30
VIII. DISCUSIÓN.....	33
IX. CONCLUSIONES	36
X. PROSPECTIVAS.....	36
VII. REFERENCIAS	37
Anexo 1 Revisión del “Estado del arte” en fimbrias como herramientas de diagnóstico e inmunización	45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación esquemática del ensamblaje fimbrial por la vía chaperona acomodador.	4
FIGURA 2. Representación esquemática del repertorio de operones fimbriales en <i>Salmonella</i> Enteritidis ..	7
FIGURA 3. Modelo conceptual de bacterias fimbriadas en el intestino.	11
FIGURA 4. Estrategias de terapia anti-adherencia.	13
FIGURA 5. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.	15
FIGURA 6. Mapa del vector de clonación pCR TM 2.1-TOPO.	16
FIGURA 7. Mapa del vector de clonación pBAD Myc-His A.	17
FIGURA 8. Predicción del péptido señal en la proteína PegA.	23
FIGURA 9. Predicción del péptido señal en la proteína StdA.	23
FIGURA 10. Alineamiento <i>in silico</i> de los iniciadores para el gen <i>stdA</i>	24
FIGURA 11. ADN cromosómico de <i>Salmonella</i> Enteritidis.	24
FIGURA 12. Gel de agarosa, producto de la PCR de <i>stdA</i>	25
FIGURA 13. Gel de agarosa, ensayo de restricción del gen <i>stdA</i> digerido con <i>EcoRV</i>	26
FIGURA 14. Gel de agarosa, clonas positivas del plásmido pCR TM 2.1-TOPO	26
FIGURA 15. Gel de agarosa, extracción del plasmido pBAD/Myc-His A	27
FIGURA 16. Ensayo de digestión enzimática del vector pBAD/Myc-His A.	28
FIGURA 17. Alineación de aminoácidos de las proteínas StdA y PegA en el servidor BLAST	29
FIGURA 18. Predicción de plegamiento de la proteína PegA generado en el servidor SWISS-MODEL.....	34
FIGURA 19. Predicción de plegamiento de la proteína StdA generado en el servidor SWISS-MODEL....	30
FIGURA 20. Predicción de epítomos de la proteína PegA en el servidor Bepipred 2.0.	30
FIGURA 21. Predicción de epítomos de la proteína StdA en el servidor Bepipred 2.0.	31
FIGURA 22. Modelado 3D de los epítomos seleccionados de la proteína PegA generados en el servidor PEP-FOLD3.....	32
FIGURA 23. Modelado 3D de los epítomos seleccionados de la proteína StdA generados en el servidor PEP-FOLD3.....	33

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Clados fimbriales con sus operones descritos presentes en <i>Salmonella</i> spp	6
CUADRO 2. Ejemplos de vacunas inactivadas contra <i>Salmonella</i> registradas en SAGARPA México.	10
CUADRO 3. Algunas vacunas vivas atenuadas	10
CUADRO 4. Estandarización de la PCR para <i>stdA</i>	18
CUADRO 5. Condiciones de temperatura y tiempo para la PCR del gen <i>stdA</i>	19
CUADRO 6. Condiciones de temperatura y tiempo para la PCR del gen <i>pegA</i>	19
CUADRO 7. Reactivos y concentraciones para el ensayo de restricción de <i>stdA</i> con <i>EcoRV</i>	20
CUADRO 8. Reactivos y concentraciones para el ensayo de restricción de pBAD / Myc-His A con la enzima <i>EcoRV</i>	21
CUADRO 9. Reactivos y concentraciones para el ensayo de doble digestión de pBAD / Myc-His A con las enzimas <i>EcoRV</i> Y <i>Sall</i>	21
CUADRO 10. Iniciadores para <i>stdA</i>	23
CUADRO 11. Iniciadores para <i>pegA</i>	24
CUADRO 12. Predicción de epítomos de la proteína PegA en el servidor BepiPred 2.0.....	31
CUADRO 13. Predicción de accesibilidad de epítomos de la proteína PegA	31
CUADRO 15. Predicción de accesibilidad de epítomos de la proteína StdA	32

ABREVIATURAS

Amp (Ampicilina)

CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades en Estados Unidos)

CU (Vía de ensamblaje chaperona acomodador)

EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

kDa(Kilo Daltones)

L (Litros)

M (Molar)

mM (Milímolar)

μM (Micromolar)

mg (Miligramo)

mL (Mililitro)

mm (Milímetros)

μL (Microlitro)

μF (MicroFarada)

ng (Nanogramo)

nm (Nanómetro)

OMS (Organización Mundial de la Salud)

pb (Pares de bases)

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

pH (Potencial de Hidrógeno)

rpm (Revoluciones por minuto)

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación)

***Salmonella* Enteritidis (*Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad Enteritidis)**

SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica)

TAE (solución amortiguadora de tris, acetato y EDTA)

V (Volts)

aa (Aminoácidos)

°C (Grados Celsius)

RESUMEN

Previamente, en nuestro grupo de investigación se llevó a cabo la construcción de dos bibliotecas de fagos a partir de los genes fimbriales que codifican para las subunidades PegA y StdA, logrando la expresión de péptidos recombinantes con tamaños de 10 a 30 aminoácidos aproximadamente sobre la superficie del fago filamentoso M13.

Las fimbrias son estructuras que no se expresan de manera constitutiva, su estudio *in vitro* se ve obstaculizado por su estricta regulación que rara vez permite que se expresen en condiciones de laboratorio a excepción de las fimbrias fim y csg. Bajo esta premisa se buscó producir las proteínas recombinantes PegA y StdA de *Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis), para ser utilizadas en la generación de anticuerpos específicos en el antisuero de gallinas inmunizadas y llevar a cabo el tamizaje de las bibliotecas de fagos. Se lograron clonar los genes *pegA* y *stdA* en el plásmido pBAD Myc-His A y pCRTM2.1-TOPO, respectivamente y se realizó el análisis *in silico* de ambas proteínas utilizando herramientas bioinformáticas para predecir la localización y accesibilidad de sus epítomos para su detección con anticuerpos.

La identificación de éstas secuencias de aminoácidos, abre el camino para el desarrollo de pruebas diagnósticas y candidatos vacunales que impidan la adherencia de la bacteria a las células hospedadoras, debido a que se ha demostrado la importancia de estas subunidades fimbriales en la colonización del ciego en aves, en células en cultivo, así como en el hígado y bazo de ratones.

I. INTRODUCCIÓN

La supervivencia de *Salmonella* Enteritidis depende de su capacidad para adherirse a la célula huésped. La adhesión bacteriana ocurre cuando *Salmonella* interactúa con las células animales, antes de la invasión o cuando se inicia la formación de biopelículas en las superficies del huésped, como el epitelio intestinal o los cálculos biliares (Wiedemann *et al.*, 2015).

La mayoría de las estructuras adhesivas de *Salmonella* se expresan solo *in vivo*, lo que dificulta su estudio. Incluso, aunque la expresión constitutiva de estos componentes de superficie y el estudio de la regulación de su expresión han promovido los estudios *in vitro* en los últimos años, aún se requiere mucho trabajo para comprender el papel de cada uno de ellos y su potencial cooperación y redundancia en la mediación de la interacción de *Salmonella* con sus células blanco (Wiedemann *et al.*, 2015).

Existen tres categorías para los sistemas de adhesión en *Salmonella*: adhesinas fimbriales como la fimbria ensamblada por la vía chaperóna acomodador (CU), las adhesinas afimbriales que comprenden adhesinas mono y oligoméricas secretadas por un sistema de secreción tipo I y V y por último 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 y Hensel 2011).

Fimbrias

Las fimbrias son apéndices protéicos de 0.5 a 10 μm de longitud y de 2 a 8 nm de ancho, poseen una o más proteína que interactúa con su receptor de hospedaje, mediando así la adhesión de la bacteria a la célula huésped o a superficies inertes (Wiedemann *et al.*, 2015).

Están compuestas por subunidades de proteínas denominadas mayoritarias y minoritarias en un orden específico, y su función es la adhesión a los receptores de otras bacterias o células huéspedes, la fuerza adhesiva se vuelve más fuerte a medida que aumenta la fuerza de tensión mecánica resultante del flujo de fluidos que actúan sobre la fimbria (Aprikian 2011). Las diferentes fuerzas de unión que participan en este mecanismo adhesivo son las fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno (Robinson *et al.*, 2012). Son estructuras que poseen la capacidad de adaptarse al entorno, ofreciendo protección a las bacterias, contra diversas fuerzas de arrastre cambiantes del medio en el que se encuentren como el ejercido por los fluidos en el tracto urinario (Mortezaei *et al.*, 2013).

Las fimbrias son un factor de virulencia importante para muchas bacterias patógenas, que las requieren comúnmente para iniciar la colonización, su éxito como organelos de adhesión radica en su capacidad para iniciar y mantener la unión bacteriana a las células epiteliales (Singh *et al.*, 2016).

Biogénesis fimbrial

Existen distintas clasificaciones para las fimbrias pero la más ampliamente utilizada es con base en los sistemas de ensamblaje. Existen tres vías para el ensamblaje fimbrial en bacterias Gram negativas. La vía chaperona acomodador , vía nucleación precipitación y la vía de secreción general .

La mayoría de las fimbrias identificadas en el genoma de *Salmonella* Enteritidis se ensamblan mediante la vía chaperona acomodador y están compuestas de varias subunidades. Algunas de estas subunidades pueden servir como adhesinas, mientras que otras presentes en la base de la fimbria desempeñan el papel de proteínas de anclaje (Dufresne y Daigle 2017).

Vía chaperona acomodador

Las fimbrias de la vía chaperona acomodador son las más comúnmente detectadas en el genoma de *Salmonella* (Dufresne y Daigle 2017). Actúan como sistemas redundantes en la patogénesis de *Salmonella* spp. mediando interacciones entre bacterias, bacterias y células del huésped y formación de biopelículas (Dufresne *et al.*, 2018).

Las fimbrias ensambladas por esta vía, poseen una forma fimbrial a base de la repetición de subunidades principales que emergen de la proteína acomodadora insertada en la membrana externa. Las subunidades principales pueden estar acompañadas por subunidades menores y / o adhesinas (Thanassi *et al.*, 2007).

La biogénesis de estas fimbrias comienza con la producción de las subunidades en el citoplasma y su exportación a través de la membrana interna por el sistema general de secreción (Gerlach y Hensel 2007). El ensamblaje se caracteriza por una interacción entre las subunidades, una chaperona periplásmica y una proteína acomodadora de membrana externa (Gerlach y Hensel 2007).

Para evitar el plegamiento temprano de las subunidades, la chaperona fimbrial forma un complejo con la subunidad translocada en el periplasma. La chaperona además de prevenir la formación prematura de fimbrias en el periplasma, prepara el ensamblaje a través del acomodador. Se requiere una interacción entre la proteína acomodadora y la subunidad y también entre la acomodadora y la chaperona. Esta interacción es importante para que la proteína acomodadora pueda discriminar la subunidad cargada de la chaperona descargada (Zavialov *et al.*, 2007).

La proteína acomodadora cataliza la polimerización fimbrial, la estructura cuaternaria de la subunidad se logra cuando la proteína pasa a través del poro. Se ensamblan en un orden de arriba hacia abajo, con la adhesina incorporada primero, seguida del resto de la punta de la fimbria. El canal de inicio es lo suficientemente ancho como para permitir la secreción de una fibra lineal de subunidades plegadas (Remaut *et al.*, 2008).

Muchas de estas fimbrias tienen una única subunidad localizada en la punta que contiene la actividad de unión al receptor y se han denominado “mono adhesivas” e incluyen las fimbrias tipo 1 y P. Sin embargo no todas las fimbrias ensambladas por esta vía contienen una estructura de punta distinta o una adhesina ubicada en la punta. La subunidad estructural que construye la fimbria también puede contener varios sitios de unión al receptor, permitiendo a toda la fimbria funcionar en la adhesión. Estas fimbrias “poli adhesivas” generalmente se construyen a partir de 1 a 2 subunidades (Zavialov *et al.*, 2010).

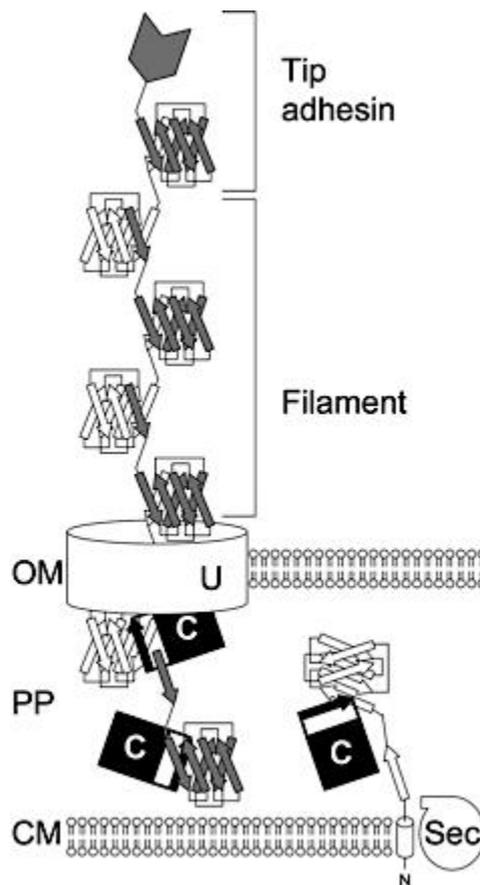


FIGURA 1. Representación esquemática del ensamblaje fimbrial por la vía chaperona acomodador. CM: membrana citoplasmática, OM: membrana externa, PP: periplasma, C: proteína chaperona, Sec: sistema general de secreción, U: proteína acomodadora. Tomado y modificado de Nuccio y Baumler 2007.

Sistema enucleación / precipitación

Las fimbrias curli se descubrieron inicialmente en *Escherichia coli* y están muy conservadas entre la familia Enterobacteriaceae. El grupo específico de genes fimbriales para las fimbrias curli se denomina *csg* (gen de la subunidad curli) para *E. coli* y *agf* (fimbrias agregativas delgadas) para *Salmonella*, pero el término *csg* ahora se usa comúnmente para *Salmonella* spp. El mecanismo de ensamblaje de las fimbrias curli se caracteriza por la exportación de las subunidades y su precipitación entre sí en presencia de un nucleador que fija la fimbria en la superficie bacteriana (Dufresne y Daigle 2017). La exportación de proteínas curli también utiliza la vía de secreción general para pasar a través de la membrana interna al periplasma. Una vez en la superficie bacteriana, el nucleador polimeriza las subunidades en fimbrias agregativas (Remaut y Ben-Tal 2014).

La formación de las fimbrias curli depende de dos operones divergentes, *csgBAC* y *csgDEFG*. El operón *csgBAC* tiene los genes que codifican para CsgA, la subunidad principal, CsgB, el nucleador y CsgC, una oxidoreductasa de función desconocida. Los genes del operón *csgDEFG* codifican para el regulador de transcripción del operón (CsgD) y para las proteínas de ensamblaje ubicadas en el periplasma (CsgE) o en la membrana externa (CsgG y CsgF) (Brombacher *et al.*, 2006).

Sistema de secreción general o pili tipo IV

La fimbria tipo IV utiliza el sistema de secreción general para su ensamblaje, es un sistema independiente de chaperonas, debido a que la plataforma de anclaje se ubica en la membrana interna, siendo innecesario el transporte de las subunidades fimbriales a través del periplasma. Esta vía tiene la maquinaria más compleja en la cual se forma un aparato compuesto de varias proteínas, que atraviesa las membranas interna y externa permitiendo el anclaje y la accesibilidad energética para el ensamblaje fimbrial. Este tipo de fimbrias se subdivide en dos grupos según la homología de las subunidades principales: las fimbrias tipo IVa y tipo IVb. La diferencia entre los dos tipos, se debe a la longitud de la secuencia de péptidos y la secuencia de la proteína principal. Algunas de estas fimbrias tienen la capacidad de extenderse y retraerse dinámicamente, proporcionándoles un tipo de movimiento denominado espasmódico en superficies sólidas y la capacidad de absorción de ADN (Mattick 2002; Burrows 2005).

Clados fimbriales

Cada tipo de fimbria tiene su subunidad estructural y genes de biogénesis codificados por un grupo de genes fimbriales.

Las proteínas acomodadoras son las proteínas más conservadas (Yue *et al.*, 2012). Basado en las secuencias de aminoácidos de la proteína acomodadora, la clase de ensamblaje CU se subdivide en seis clados filogenéticos principales, llamados α , β , γ , κ , π y σ . Los miembros de cada clado comparten estructuras de operón relacionadas y codifican subunidades fimbriales con dominios proteicos similares (Nuccio y Baumler 2007).

CLADOS CU	OPERONES FIMBRIALES
α	<i>tcf</i>
β	<i>sbs, sib, stj</i>
γ_1	<i>bcf, fim, lpf, sdd / smf, stg, sth, sti</i>
γ_3	<i>saf, sde, sef</i>
γ_4	<i>mrk, peg, peh, sba, sdh, sdi, sdj, ssf, sta, stb, stc, stk</i>
κ	<i>fae / skf, pef, sbc, / spf</i>
π	<i>sbb / sbf, sdk, sdl, std, ste, stf</i>
σ	<i>sdc / sas</i>

CUADRO 1. Clados fimbriales con sus operones fimbriales descritas presentes en *Salmonella* spp. tomado y modificado de: Dufresne y Daigle 2017.

Operones fimbriales

Los sistemas fimbriales están organizados en grupos de cuatro a quince genes que codifican proteínas estructurales, de ensamblaje y reguladoras (Dufresne y Daigle 2017).

Los genes involucrados en la biosíntesis de las fimbrias pertenecientes a la clase de ensamblaje chaperona acomodador, se agrupan casi invariablemente en operones. Estos operones codifican, como mínimo, tres proteínas diferentes: una subunidad fimbrial estructural principal, una chaperona y una proteína acomodadora. Los operones fimbriales a menudo contienen genes adicionales que codifican proteínas estructurales (subunidades fimbriales minoritarias), proteínas de ensamblaje (chaperonas) o proteínas reguladoras (Nuccio y Baumler 2007).

Diferentes operones fimbriales han sido descritos en cada una de las variedades de *Salmonella enterica*, participando cada uno de ellos en la adhesión a diferentes superficies y tipos celulares. La expresión de los genes de cada operón depende de las condiciones físicoquímicas así como la disponibilidad de nutrientes presentes. Hasta el momento han sido identificados 13 operones fimbriales en *Salmonella Enteritidis* (Nuccio y Baumler 2007; Yue *et al.*, 2012; Laniewski *et al.*, 2017).

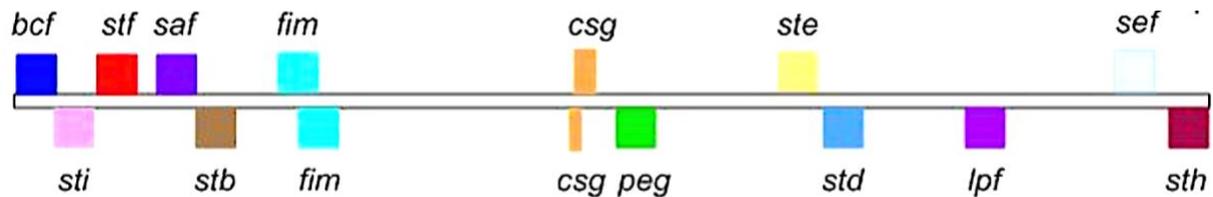


FIGURA 2. Representación esquemática del repertorio de operones fimbriales y la ubicación genómica relativa de loci fimbriales en el genoma de *Salmonella* Enteritidis P125109. Tomado y modificado de Clayton *et al.*, 2008.

std

El operón fimbrial *std*, codifica las fimbrias Std de la clase π , llamadas así por el prototipo de la fimbria P de *E. coli*, se ha descrito que se unen a residuos de fucosa α -1,2 terminales. La unión a estos residuos media la adhesión bacteriana a las glucoproteínas o glucolípidos del huésped (Suwandi *et al.*, 2019).

El operón está conformado de 6 genes, *stdA*, *stdB*, *stdC*, *stdD*, *stdE* y *stdF*, los cuales coordinan la expresión de un operón policistrónico (Jakomin *et al.*, 2008). Tiene más de 85 % de identidad en la secuencia del operón entre las diferentes especies de *Salmonella* spp. (Clayton *et al.*, 2008).

El gen *stdA* (708pb) codifica para la subunidad fimbrial principal, importante contribuyente a la adhesión de *Salmonella* a la mucosa intestinal de las aves de corral. StdA es una proteína fimbrial de 19 kDa que forma parte del operón *std* y es un factor importante en las primeras etapas de la infección de *Salmonella* en aves de corral (Shippy *et al.*, 2013). El gen *stdB* codifica para la proteína acomodadora encargada de permitir el paso de StdA y su anclaje en la membrana externa, *stdC* codifica para la proteína chaperona; StdE y StdF, tienen capacidad de unión al ADN y activan o reprimen la transcripción de múltiples genes. StdE activa la transcripción del gen *hdfR* y StdF activa la transcripción del operón *std* junto con HdfR. La unión de HdfR corriente arriba del promotor de *std* se ve obstaculizada por la metilación de sitios GATC situados dentro de la secuencia de activación corriente arriba (García Pastor *et al.*, 2019).

Este operón fimbrial está conservado entre los serotipos de *Salmonella* enterica pero ausente en especies bacterianas relacionadas (Townsend *et al.*, 2001). Mutantes con delección de este operón muestran una persistencia intestinal reducida en ratones (Chessa *et al.*, 2008).

Regulación de *std*

La expresión bacteriana de las fimbrias Std es un tema de regulación compleja y estricta, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sólo una porción pequeña de la población de *Salmonella* expresa fimbrias Std *in vitro* y el operón *std* está completamente ausente en *E. coli* (Suwandi *et al.*, 2019).

Existe una atenuación de la virulencia en *Salmonella*, debido a la regulación negativa de la isla de patogenicidad 1, por dos proteínas codificadas por *std*, StdE y StdF (López-Garrido y Casadesús 2012).

La unión de HdfR al ADN dificulta la metilación de la secuencia de activación corriente arriba, permitiendo la activación del bucle StdE-StdF-HdfR y la expresión de fimbrias Std (García Pastor *et al.*, 2019).

pegA

El operón *peg* consta de cuatro genes (*pegABCD*), *pegA* (534 pb) codifica para la subunidad fimbrial principal relacionada con la adhesión y se ha demostrado que tiene un rol importante en la colonización del ciego y oviducto en aves, *pegB* codifica para la proteína acomodadora, el gen *pegC* codifica una proteína chaperona (Hultgren y Normark 1991) y *pegD* codifica una supuesta adhesina exportada de tipo fimbrial (Shah *et al.*, 2012). El operón *peg* está restringido hasta ahora a *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Paratyphi (Silva *et al.*, 2012).

Clayton y cols. en 2008 inactivaron sistemáticamente cada uno de los 13 operones fimbriales descritos en *Salmonella* Enteritidis e informaron que solo la inactivación del operón *peg* resultó en una reducción significativa en la colonización intestinal en pollos de 18 días de edad inoculados oralmente.

***Salmonella* spp.**

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está constituido por bacterias Gram negativas, intracelulares facultativas (Barreto *et al.*, 2016), es un género de patógenos entéricos que consta de dos especies; *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, que pueden causar enfermedades en una amplia variedad de huéspedes (Ilyas *et al.*, 2017).

Salmonella Enteritidis es capaz de generar enfermedad gastrointestinal en el ser humano, infección sistémica en el ratón y un cuadro crónico asintomático en aves (Barreto *et al.*, 2016).

El sistema de clasificación de Kauffman y White clasifica a *Salmonella* en serotipos con base en el reconocimiento de antígenos de superficie como el antígeno somático (O) y el antígeno flagelar (H). También es posible subdividir estos serotipos mediante la fagotipificación de acuerdo al patrón de lisis obtenido cuando las cepas de *Salmonella* son infectadas con bacteriófagos específicos del serotipo (Echeita *et al.*, 2005).

Epidemiología

Las especies de *Salmonella* son bacterias responsables de una amplia gama de enfermedades transmitidas por alimentos y agua, tanto en humanos como en animales representando una gran amenaza para la salud pública (World Health Organization 2018).

Salmonella Enteritidis es una de las mayores causas de salmonelosis en el mundo, siendo los huevos contaminados y la carne de pollo cruda sus principales fuentes de infección (Fandiño *et al.*, 2019). La Salmonelosis esta reconocida como una de las enfermedades zoonóticas más importantes que se transmite al ser humano a través de alimentos de origen animal (Asma *et al.*, 2018) y su gravedad depende de los factores del huésped y del serotipo de *Salmonella* (World Health Organization 2018).

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades en Estados Unidos (CDC) estiman que *Salmonella* causa alrededor de 1.35 millones de infecciones, 26,500 hospitalizaciones y 420 muertes en los Estados Unidos cada año (CDC 2022). Además de

generar brotes grandes y continuos asociados con el comercio internacional de huevos de mesa (EFSA 2019). El 11 de enero de 2022, se detectaron 801 casos de infectados con un brote de *Salmonella* Enteritidis , en siete países de la Unión Europea y el Reino Unido (EFSA 2022).

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 2022, se reportaron 45183 casos de salmonelosis pero no se identificaron las especies y serotipos involucrados (Dirección General de Epidemiología 2022).

Patogenia

La infección por *Salmonella* se compone de varios pasos, en cada uno de estos, factores de virulencia específicos se activan para interactuar con el huésped y crear un entorno más propicio para su supervivencia y replicación.

Una barrera importante a la que *Salmonella* debe enfrentarse una vez que ingresa por vía oral, es el pH ácido del estómago o proventrículo y ventrículo en el caso de las aves, provocado por la secreción de ácido clorhídrico. El estómago también contiene altas concentraciones de ácidos débiles que pueden actuar como desacopladores de la fuerza protón motriz (Bavishi y Dupont 2011). El consumo de alimentos ricos en grasas o elevados contenidos de proteína, pueden proteger a *Salmonella* spp. de la acidez del estómago (Avilés *et al.*, 2013). También el cambio del pH por el uso de antiácidos o inhibidores de la bomba de protones permite aumentar la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* (Bavishi y Dupont 2011).

Una vez en el intestino el curso de la infección es impulsado por factores de virulencia adquiridos horizontalmente y genes codificados en las islas de patogenicidad de *Salmonella* (Ilyas *et al.*, 2017). La presencia de microbiota puede competir con *Salmonella* para la colonización o captura de nutrientes, por ello *Salmonella* puede eliminar a las bacterias comensales a través de la expresión de un sistema de secreción tipo VI , utilizada principalmente para el antagonismo interbacteriano (Sana *et al.*, 2016).

Superados estos retos, *Salmonella* debe adherirse a las células huésped siendo un paso fundamental, permitiéndole contrarrestar el arrastre de la bacteria por los movimientos peristálticos del intestino y poder iniciar la colonización. Una vez adherida a los enterocitos *Salmonella* activa un sistema de secreción tipo III codificado en la Isla de patogenicidad 1, translocando proteínas efectoras que promueven el reordenamiento del citoesqueleto (ruffling) y permitiendo el ingreso de la bacteria a células no fagocíticas. SipC y SipA son proteínas que se unen directamente a los microtúbulos de actina promoviendo su polimerización y estabilización, SopE y SopE2 lo promueven de manera indirecta actuando como factores de intercambio de guanina. Estos eventos forman una vacuola contenedora de *Salmonella*, debido a la unión de membranas por SopD y el citoesqueleto retorna a su forma original gracias a SptP (Haraga *et al.*, 2008; McGhie *et al.*, 2009).

Salmonella también infecta la vesícula biliar, donde se sabe que las bacterias persisten como biopelículas unidas a los cálculos biliares (Kurtz, *et al.* 2017).

Inmunización

El principal objetivo de vacunar a las gallinas ponedoras contra *Salmonella* Enteritidis es reducir o prevenir la contaminación de los huevos ya que la infección bacteriana en los órganos reproductivos de las gallinas ponedoras puede causar la contaminación de estos a través de la yema o la albúmina, por lo que la respuesta inmune juega un papel esencial en la prevención de la infección por *Salmonella* (Yoshimura 2004).

La vacunación con productos de *Salmonella* Enteritidis viva está prohibida en algunos países debido a variaciones en sus legislaciones (Huberman *et al.*, 2019). Este tipo de vacuna protege a las gallinas al reducir la excreción de *Salmonella* Enteritidis, el aislamiento en órganos y la contaminación del huevo (Huberman *et al.*, 2019).

En el caso de México se comercializan vacunas inactivadas contra *Salmonella* Enteritidis de manera individual o en combinación con otros antígenos, reguladas por la SAGARPA. Estas vacunas se reportan como efectivas para disminuir la excreción y presentación de la enfermedad ocasionada por *Salmonella* Enteritidis y se indican para inmunizar tanto aves de postura como reproductoras, pero no garantizan la eliminación completa de la bacteria.

CUADRO 2. Ejemplos de vacunas inactivadas contra *Salmonella* registradas en SAGARPA en México.

VACUNA	EMPRESA	SEROVAR .
Layermune SE	Ceva Salud Animal S.A. de C.V.	SE
Cevac Corymune 4K	Ceva Salud Animal S.A. de C.V.	SE
Cevac Corymune 7K	Ceva Salud Animal S.A. de C.V.	SE
Avipro 109 SE Conc	Lohmann Animal Health S.A. de C.V.	SE

CUADRO 3. Algunas vacunas vivas atenuadas.

SEROTIPO DE SALMONELLA	CEPA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
Enteritidis	<i>Salmonella</i> Enteritidis cepa mutante metabólica	Oral
	<i>Salmonella</i> Enteritidis cepa 441/014 auxotrófica para adenina e histidina	Oral

Todas estas vacunas han logrado disminuir signos y niveles de colonización por *Salmonella* pero no eliminan la bacteria completamente, lo que permite la presencia de portadores asintomáticos que la excretan (Desin *et al.*, 2013).

Gast y cols. en 1992 observaron una respuesta humoral primaria rápida después de la vacunación de pollos libres de patógenos específicos con una vacuna de *Salmonella* Enteritidis y hubo protección parcial contra la exposición experimental. La presencia de *Salmonella* Enteritidis en los órganos y el contenido en óvulos se redujo, pero el tracto entérico aún era susceptible a la colonización. Por lo que la mejor manera de prevenir o controlar la infección en aves de corral es el uso de medidas de bioseguridad (Penha Filho *et al.*, 2009), económicamente es poco práctico eliminar al patógeno de las granjas y la vacuna solo produce protección y control parcial (Penha Filho *et al.*, 2009).

Uso de anticuerpos contra fimbrias

Estudios han permitido entender los mecanismos por los cuales los anticuerpos se dirigen al proceso de adhesión bacteriana, alterando las propiedades físicas de las fimbrias e interrumpiendo su desenrollamiento natural mediante la unión de las capas del filamento helicoidal, aumentando así su rigidez y reduciendo su resistencia durante el flujo de fluidos. Otro mecanismo reportado consiste en que los anticuerpos son capaces de enredar a dos fimbrias individuales a través de uniones bivalentes. Siendo aplicable a una gran cantidad de bacterias Gram negativas que dependen de estas moléculas de adhesión superficial como un factor de virulencia esencial (Singh *et al.*, 2016).

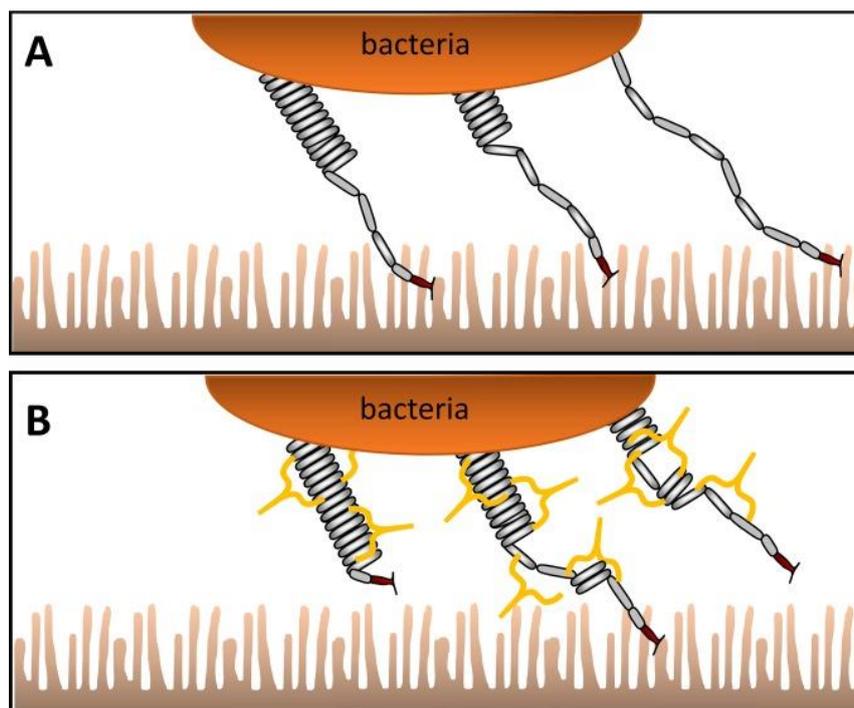


FIGURA 3. Modelo conceptual de bacterias fimbriadas en el intestino. (A) Las fimbrias en ausencia de anticuerpos se unen a las microvellosidades y se desenrollan cuando se exponen a las fuerzas del flujo del fluido intestinal. (B) Las fimbrias con anticuerpos no pueden desenrollarse y rebobinarse libremente, lo que limita su unión sostenida a las microvellosidades (Singh *et al.*, 2016).

Dos características biomecánicas de la resiliencia fimbrial son la fuerza de extensión y la longitud de extensión, que pueden ser alteradas por la unión de anticuerpos a las fimbrias. Se habla de que al inhibir esta resiliencia podría tener un alto potencial de uso como vacunas para prevenir la enfermedad (Singh *et al.*, 2016).

Inmunoglobulinas en pollos

Las aves producen tres tipos de inmunoglobulinas que son la IgM, IgY e IgA (Müller *et al.* 2015). La IgY es la principal inmunoglobulina presente en la sangre aviar, se transmite a su descendencia y se acumula en las yemas de huevo permitiendo la recolección de altas cantidades de anticuerpos (Pereira *et al.* 2019). Hasta 200 mg de IgY están presentes en la yema en el momento de la puesta de huevos (Lanzarini *et al.* 2018). Es el ancestro evolutivo de la IgG de mamíferos y es el principal mecanismo de defensa contra las infecciones sistémicas, estando presente en aves, reptiles y anfibios (Warr 1995).

La IgY se ha denominado IgG debido a su función y concentración similares en el suero. Esta terminología es incorrecta, debido a las diferencias que presentan en su estructura molecular (Müller *et al.*, 2015). La IgY policlonal de pollo presenta ventajas éticas y económicas sobre la IgG de mamífero para aplicaciones biomédicas, como la falta de necesidad de sangrado animal porque los anticuerpos se extraen de los huevos después de la inmunización de las gallinas y el bajo costo de los métodos de producción y purificación (Lanzarini *et al.*, 2018).

Producción de IgY específicas

Gallinas inmunizadas con un antígeno específico de *Salmonella* pueden dar una IgY específica producida en la yema de huevo contra el antígeno dado. Por lo tanto, la IgY se ha aplicado con éxito en fines diagnósticos, profilácticos, terapéuticos y en la formulación de suplementos alimenticios debido a la estabilidad de la IgY en condiciones de procesamiento de alimentos (Schade *et al.* 2005). Se han usado varios tipos de antígenos para producir IgY específica en aves, como antígenos complejos (virus, bacterias y parásitos) y antígenos individuales (proteínas, polisacáridos, péptidos y ácidos nucleicos). También es posible combinar diferentes concentraciones de antígeno con adyuvante (Antonysamy *et al.* 2010).

Se ha demostrado que la administración oral de anticuerpos IgY específicos es efectiva contra una variedad de patógenos intestinales que causan diarrea en humanos y animales, como, *Salmonella* spp., rotavirus bovinos y humanos, coronavirus bovino, virus de gastroenteritis porcina transmisible y virus de diarrea epidémica porcina (Diraviyam *et al.* 2014).

Terapia anti-adhesión

Las terapias anti adhesión son técnicas que interfieren con la capacidad de las bacterias para adherirse a los tejidos del huésped o separarlos de los tejidos en las primeras etapas de la infección (Asadi *et al.*, 2019). Estas terapias son una posible alternativa al uso de antibióticos, las bacterias no mueren, pero se impide que causen daño a un huésped al inhibir la adhesión a las células y tejidos del huésped. Los mecanismos de estos agentes incluyen la inhibición de las adhesinas y sus receptores huéspedes (Cozens y Read 2012).

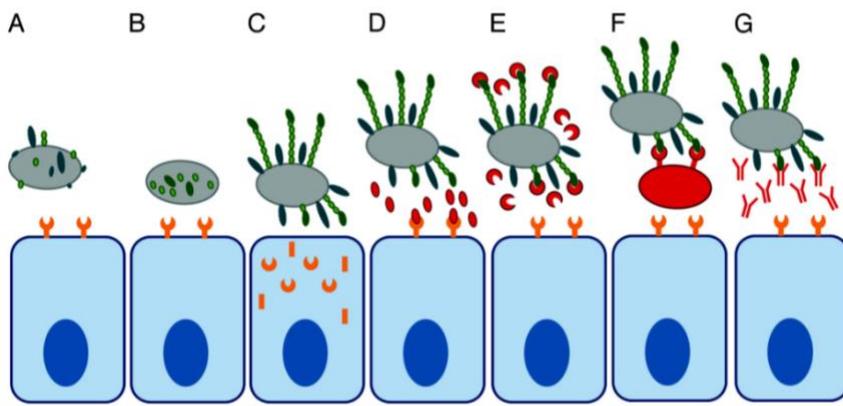


FIGURA 4. Estrategias de terapia anti-adherencia. La unión bacteriana puede inhibirse interfiriendo la biosíntesis de la adhesina (A), el ensamblaje de la adhesina (B) o el ensamblaje del receptor del huésped (C). La unión puede inhibirse mediante el reemplazo competitivo de la adhesina del huésped (D) o del receptor del huésped de la adhesina (E) usando moléculas solubles o usando microbios de diseño (F). Los anticuerpos contra las adhesinas bacterianas pueden bloquear los epítomos de superficie necesarios para la unión (G) (Krachler y Orth 2013).

El huésped puede inmunizarse activa o pasivamente usando una adhesina bacteriana, subunidades fimbriales, o un fragmento de péptido inmunogénico basado en una adhesina individual o en el consenso derivado de un grupo de adhesinas. También el huésped puede inmunizarse usando una vacuna de ADN que codifica la adhesina o parte de ella (Krachler y Orth 2013).

II. JUSTIFICACIÓN

Las fimbrias al ser estructuras superficiales, constituyen antígenos de elección para el desarrollo de vacunas contra *Salmonella*. Dado que son un factor de virulencia importante en la adhesión de *Salmonella* Enteritidis, son objetivos potenciales para el uso de anticuerpos específicos, por lo que al identificar los epítomos de unión a estos anticuerpos es posible el desarrollo de inmunógenos que eviten la colonización de *Salmonella* Enteritidis.

III. HIPÓTESIS

Bibliotecas de fragmentos de los genes que codifican para PegA y StdA de *Salmonella* Enteritidis, clonados en pG8SAET expresarán péptidos aleatorios fusionados a la proteína pVIII del fago M13, para que mediante selección con antisueros específicos, determine la secuencia de aminoácidos correspondiente a los epítomos en esta proteína.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Identificar epítomos de las proteínas PegA y StdA de *Salmonella* Enteritidis mediante el Tamizaje con ELISA de dos bibliotecas de fagos para determinar su secuencia de aminoácidos y localización.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expresión y purificación de las proteínas StdA y PegA
- Análisis de secuencias en las clonas seleccionadas y determinación de los epítomos de manera *in silico*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

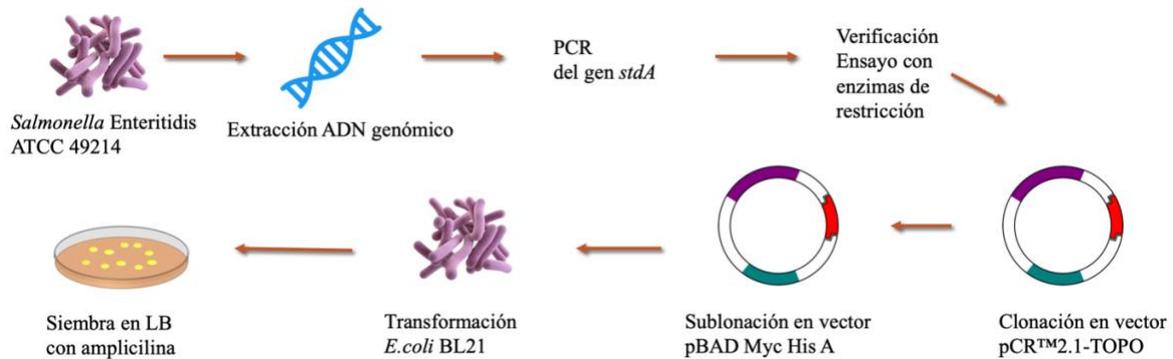


FIGURA 5 . Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

Panorama general experimental

Se llevó a cabo la extracción del ADN genómico de *Salmonella* Enteritidis 49214. Se amplificó el gen *stdA* mediante PCR y se clonó en el vector comercial pCR™2.1-TOPO, para su posterior subclonación en el vector de expresión pBAD Myc-His A. El gen *pegA* ya se encuentra clonado en pBAD Myc-His A y transformado en *E. coli* BL21, para llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante.

6.1 Medios de cultivo, cepas bacterianas y vectores de clonación utilizados

Se utilizaron las cepas bacterianas de *Salmonella* Enteritidis 49214, y *Escherichia coli* BL21 las cuales se mantuvieron en congelación a -70 °C hasta ser utilizadas.

La siembra de estas bacterias se llevó a cabo en caldo y agar Luria Bertani (LB) así como en medios de cultivo adicionados con ampicilina (Amp) a una concentración de 100 µg/ml para la selección de clones y plásmidos en las cepas utilizadas en el estudio.

pCR™2.1-TOPO: Plásmido abierto con extremos cohesivos con timidina. Tiene unida covalentemente topoisomerasa I para la clonación rápida y generación de recombinantes. Posee casetes de resistencia a kanamicina y ampicilina.

pBAD Myc-His A: Expresa proteínas con una etiqueta de polihistidina C-terminal. Posee un promotor araBAD para una expresión regulada. La etiqueta His permite una purificación con resina quelante de níquel o detección con un anticuerpo anti-His.

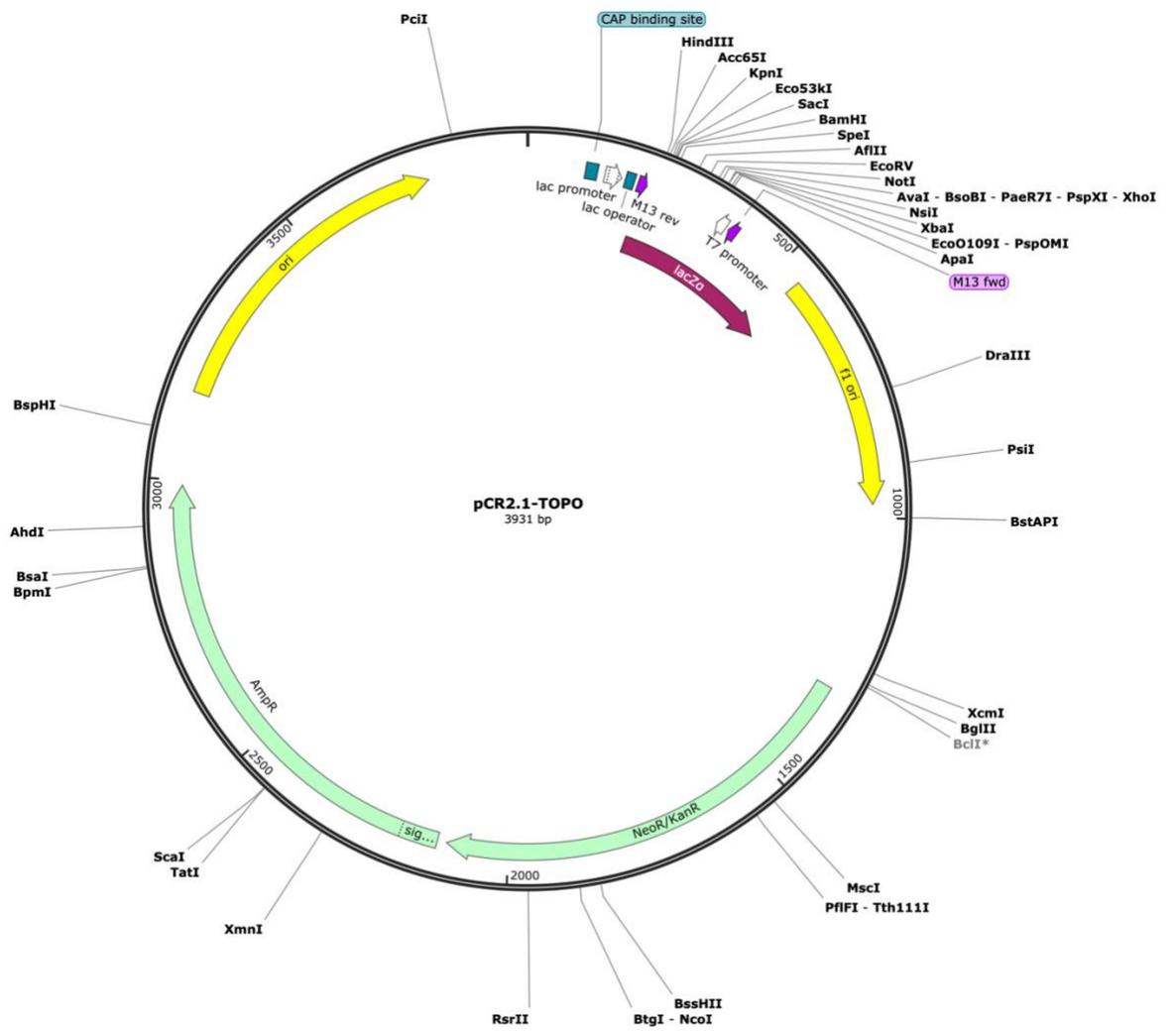


FIGURA 6. Mapa del vector de clonación pCR™2.1-TOPO. Se muestra el sitio múltiple de clonación y el casete de resistencia a ampicilina y kanamicina, imagen creada en SnapGene®6.1.1.

6.3 Extracción de ADN

La cepa de *Salmonella* Enteritidis 49214 fue cultivada en medio LB e incubada en condiciones de aerobiosis a 37°C durante toda la noche, al día siguiente el cultivo se cosechó por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. La extracción y purificación del ADN genómico se realizó mediante el método de tiocianato de guanidina descrito por Pitcher y cols. en 1989.

Se agregó 500 µL de solución de lisis, se homogenizó en el vortex hasta deshacer la pastilla. Se precipitaron las proteínas usando 250 µL de acetato de amonio 7.4 M y se homogenizó manualmente 7 veces, para dejarlo en hielo por 10 minutos. Posteriormente se añadió 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico y se sometió a centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos, se extrajo la fase acuosa a tubos nuevos y se precipitó el ADN con etanol absoluto a 0.7 volúmenes y por último se lavó con 1 ml de etanol al 70% para eliminar las sales .

Al ADN obtenido se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 70 V por 1 hora para comprobar su integridad y pureza, posteriormente se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop®.

6.4 PCR(reacción en cadena de la polimerasa) para *stdA* y *pegA*

El gen *stdA* (708 pb) se amplificó mediante PCR. Se siguió el protocolo general descrito por Sambrook y Russell 2001 y se estandarizó para un volumen de reacción en 50 µL.

REACTIVO	VOLUMEN
H ₂ O	31 µl
Buffer 10x	5 µl
MgCl ₂ (2.5mM)	4.5 µl
dNTPs (10 mM)	2.5 µl
Iniciadores F (10pmol)	2 µl
Iniciadores R (10 pmol)	2µl
DNA (3.4 ng/ µl)	2 µl
Taq polimerasa (1U/ ul)	1 µl

CUADRO 4. Estandarización de la PCR.

Se utilizó el termociclador Esco Swift™ MiniPro® configurado con las siguientes condiciones por 30 ciclos:

FASE	TEMPERATURA Y TIEMPO	
Desnaturalización inicial	95°C	5:00 minutos
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Alineamiento	69°C	30 segundos
Extensión	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	5:00 minutos

CUADRO 5. Condiciones de temperatura y tiempo para la PCR del gen *stdA*.

En el siguiente cuadro se muestran los reactivos y volúmenes para la amplificación del gen *pegA* (534 pb). Siguiendo el protocolo general descrito por Sambrook y Russell 2001 y estandarizando la reacción para un volumen de 55.5 µL.

REACTIVO	VOLUMEN
H ₂ O	36.5 µl
Buffer 10x	5 µl
MgCl ₂ (2.5mM)	4.5 µl
dNTPs (10 mM)	2.5 µl
Iniciadores F (10pmol)	2 µl
Iniciadores R (10 pmol)	2µl
DNA (100 ng/ µl)	2 µl
Taq polimerasa (1U/ ul)	1 µl

FASE	TEMPERATURA Y TIEMPO	
Desnaturalización inicial	94°C	5:00 minutos
Desnaturalización	94°C	30 segundos
Alineamiento	55°C	30 segundos
Extensión	72°C	30 segundos
Extensión final	72°C	5:00 minutos

CUADRO 6. Condiciones de temperatura y tiempo para la PCR del gen *pegA*.

6.5 Ensayo de restricción para el producto de PCR

Para corroborar la presencia del gen *stdA* en el producto de PCR, se llevó a cabo un ensayo de restricción. Se siguieron las instrucciones del proveedor (Thermo Fisher Scientific) sobre las características del uso e inactivación de cada enzima utilizada en el ensayo para obtener el mejor rendimiento (cuadro 6, 7 y 8).

Cada reacción constó de las mismas cantidades de reactivos que se presentan en el siguiente cuadro:

REACTIVO	CANTIDADES
H ₂ O libre de nucleasas	13 µl
Buffer de la enzima	2 µl
ADN (0.17 µg/µL)	3 µl
Enzima <i>EcoRV</i>	2 µl

CUADRO 7. Reactivos y concentraciones para el ensayo de restricción de *stdA* con *EcoRV*.

Una vez mezclados todos los reactivos se procedió a incubarlo a 37°C por 20 minutos. Posteriormente la digestión fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio.

6.6 Extracción del plásmido pBAD Myc-His A

El vector de expresión pBAD Myc-His A, se encuentra localizado en células *E. coli* BL21 transformadas, por lo que se realizó la extracción del ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina, descrita por Sambrook y Russell en 2001. Se cultivo 10 ml de caldo LB con la bacteria transformada y se incubó a 37°C durante toda la noche, al día siguiente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante; el sedimento se suspendió en 100 µl de la solución 1 (glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM) con agitación vigorosa, después se elaboró la solución 2 (NaOH 10N, SDS 1%) y se añadieron 200 µl, se homogenizó volteando el tubo 5 veces y se colocó en hielo por 2 minutos; Se adicionó 150 µl de la solución 3 a pH 4.8 (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial absoluto, H₂O) y se homogenizó con ayuda de un vortex; Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se realizó la precipitación del ADN añadiendo dos volúmenes de etanol frío, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y se lavó con 1ml de etanol al 70% frío, se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se volvió a decantar el sobredante. Por último se dejó secar y se suspendió el ADN con 20µl de agua libre de nucleasas. Se comprobó la extracción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con TAE 1X y teñida con bromuro de etidio.

6.7 Ensayo de restricción con pBAD / Myc-His A con la enzima *EcoRV*

Se realizó el ensayo de restricción para verificar la identidad del vector pBAD / Myc-His A. Se obtuvo el patrón electroforetico *in silico* con el software SnapGene®6.1.1. y posteriormente se procedió hacer las digestiones de forma *in vitro*.

REACTIVO	CANTIDAD
H ₂ O libre de nucleasas	13 µl
10X Buffer R	2 µl
ADN (0.5 µg/µL)	3 µl
Enzima <i>EcoRV</i>	2 µl

CUADRO 8. Reactivos y concentraciones para el ensayo de restricción de pBAD / Myc-His A con la enzima *EcoRV*.

REACTIVO	CANTIDAD
H ₂ O libre de nucleasas	12.5 µl
ADN (0.5 µg/µL)	1.5 µl
10X Buffer 0	2 µl
Enzima <i>EcoRV</i>	2 µl
Enzima <i>SalI</i>	2 µl

CUADRO 9. reactivos y concentraciones para el ensayo de doble digestión de pBAD / Myc-His A con las enzimas *EcoRV* Y *SalI*.

Las reacciones se incubaron a 37°C por 1 hora a baño maria y posteriormente se inactivaron incubando a 80°C por 20 minutos en el termociclador.

6.8 Producción de células electrocompetentes *E.coli* BL21 y electroporación

Se prepararon células electrocompetentes de la cepa de *E.coli* BL21 siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Rusell 2001. Para la electroporación se utilizó el electroporador Genepulser II de Biorad® programado con las siguientes constantes: 25µF, 2.5 KV a 200 ohm. Se realizó una dilución 1:10 del plásmido en 100µl de agua libre de nucleasas y se colocó 4 µl de esta dilución en las alícuotas de 200 µl de las células competentes de *E.coli* BL21, posteriormente se colocaron en las cubetas para electroporar. Las células electroporadas fueron rápidamente colocadas en 1 ml de medio SOC e incubadas a 37°C por 1 hora, la selección de las clonas se realizó en agar LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. La placa se incubó a 37 °C por 24 horas.

6.9 Clonación del gen *stdA* en el plásmido pCR™2.1-TOPO

El producto de la PCR del gen *stdA* se clonó en el vector comercial pCR™2.1-TOPO. El plásmido con el inserto, se transformó en la cepa *E. coli* DH5α y fue sembrado en medio LB con ampicilina (100µl/ml). Se realizó la PCR de colonia a las clonas con resistencia a ampicilina utilizando los iniciadores para *stdA*, para comprobar la clonación del gen *stdA* en el plásmido .

Posteriormente las clonas positivas fueron resembradas en placas de medio LB con carbenicilina (100µl/ml), de donde fueron cosechadas para preparar viales de caldo LB con glicerol para su almacenaje a -70°C hasta su uso.

6.10 Análisis *in silico* de las proteínas

Se utilizaron las secuencias reportadas en el GenBank del gen *pegA* (locus: SEN2145B) y el gen *stdA* (locus: SEN2873) de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis P125109 (número de acceso: AM933172.1) para obtener la secuencia de aminoácidos. Se guardaron en formato FASTA para su posterior análisis.

Se determinó la estructura 3D de StdA y PegA y su porcentaje de homología entre ellas. la secuencia de cada una de las proteínas se alineó empleando el servidor BLAST, (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

También se llevó a cabo la predicción de plegamiento con las secuencias de aminoácidos para la proteína PegA (GenBank: AM933172.1) en el servidor para modelado por homología estructural de proteínas SWISSMODEL disponible en <https://swissmodel.expasy.org/>.

6.11 Predicción de epítomos de las proteínas StdA y PegA

Se realizó la predicción de epítomos lineales, enviando las secuencias de las proteínas StdA y PegA a la base de datos de epítomos inmunes (IEDB) (Fleri *et al.* 2017). El umbral de análisis se estableció con un valor predeterminado por el mismo servidor, con el cual se generó un gráfico, dónde las regiones con puntuaciones superiores al umbral indican las probabilidades más altas de tratarse de un epítomo.

También se llevó a cabo un análisis de accesibilidad de epítomos en el servidor BcePred. El cuál realiza sus predicciones utilizando propiedades fisicoquímicas como la hidrofilia, polaridad, superficies expuestas y giros en la estructura polipeptídica o combinación de propiedades (Saha y Raghava 2004).

Posteriormente se utilizó el servidor PEP-Fold3 para predecir la estructura terciaria de los epítomos seleccionados con más de 5 aminoácidos y modelar las estructuras 3D para cada epítomo (Lamiable *et al.* 2016).

VII. RESULTADOS

7.1. Determinación del péptido señal y diseño de iniciadores

Se utilizó el servidor SignalP 6.0 para predecir la presencia de los péptidos señal y la ubicación de sus sitios de escisión de ambas proteínas.

El sitio de escisión para la proteína StdA se predijo entre los residuos de aminoácidos 64 y 65. Para la proteína PegA se predijo entre la posición 22 y 23.

Iniciadores para *pegA*

Iniciador	Secuencia	TM	%GC	pb
<i>pegA F</i>	5' cggGGTACCGCTGATGAAGATATGGGGGAA 3'	54°C	68%	21
<i>pegA R</i>	5' cccAAGCTTCAGGTATTTTCAGGGTGTAGG 3'	54°C	52%	22

CUADRO 11. Iniciadores para *pegA*. En rojo secuencias de reconocimiento añadidas para ser reconocidas por las enzimas de restricción *Kpn I* y *Hind III*, en azul secuencias añadidas para mejor actividad enzimática.

Se obtuvo la alineación de los iniciadores en la plataforma de SnapGene® 6.1.1., con la secuencia reportada en el NCBI/GeneBank.

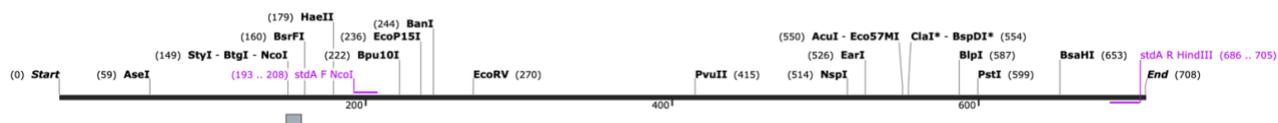


FIGURA 10. Alineamiento *in silico* de los iniciadores para el gen *stdA* con la secuencia específica de *Salmonella Enteritidis* generado en SnapGene® 6.1.1

7.2 Extracción de ADN cromosómico de *Salmonella Enteritidis*

1 2 3



FIGURA 11. ADN cromosómico de *Salmonella Enteritidis*. Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los productos de la extracción de ADN cromosomal de la cepa de *Salmonella Enteritidis*. Carril 1: marcador Lambda DNA/HindIII (ThermoScientific®), Carriles 2 y 3: ADN de *S. Enteritidis*.

7.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Se amplificó el gen *stdA* de *Salmonella* Enteritidis 49214 mediante PCR, obteniendo un tamaño de producto de 531 pb. Se cuantificó la cantidad de producto obtenido de la PCR en un espectrofotómetro NanoDrop®. Se obtuvo la concentración de 177 ng/ uL, el índice de absorción 260/280 con 1.83 indicó valores óptimos de pureza del ADN.

Para todas las reacciones se utilizaron las mismas concentraciones de los reactivos **cuadro 4**. Después de la visualización de los productos amplificados en gel de agarosa al 1% con TAE 1x, se determinó que 69 °C fue la temperatura de alineamiento óptima.

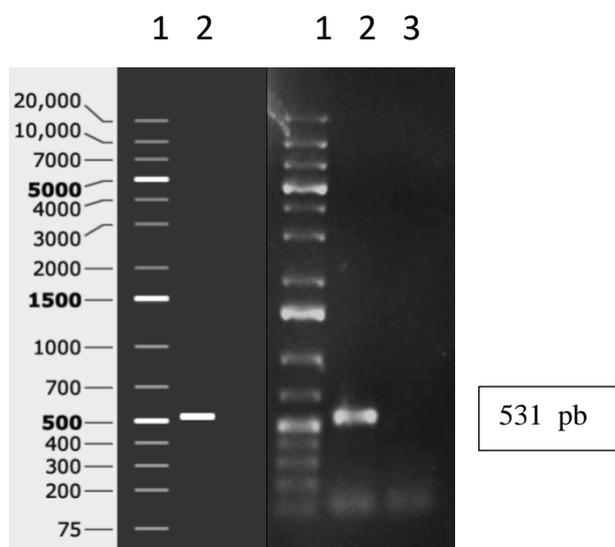


FIGURA 12. Izquierda: predicción *in silico* en SnapGene® 6.1.1 Derecha: Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific®). Carril 2: producto de PCR. Carril 3: control negativo.

7.4 Ensayo de digestión del producto de PCR

Se realizó un ensayo de digestión con la enzima de restricción *EcoRV* para verificar el producto obtenido de la PCR y se comparó con los resultados *in silico* simulados con el programa SnapGene®6.1.1. obtenido una banda de 444 pb y otra de 87 pb.

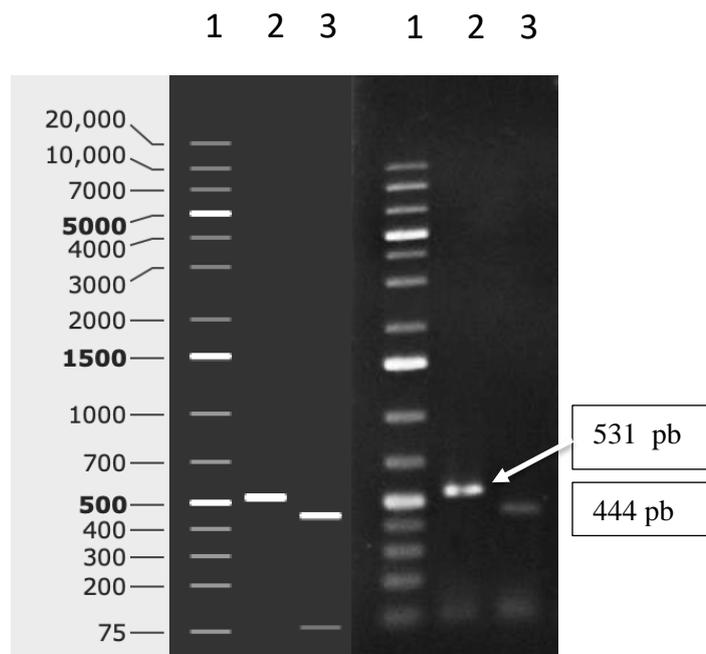


FIGURA 13. Ensayo *in silico* e *in vitro* de los perfiles de restricción del gen *stdA* digerido con *EcoRV*. Izquierda: predicción *in silico* en SnapGene®6.1.1 Derecha: Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific®). Carril 2: producto de PCR. Carril 3 y 4: Producto digerido con la enzima *EcoRV*.

7.5 Clonación del gen *stdA* en el plásmido pCR™2.1-TOPO

Se realizó la PCR de colonia y los resultados mostraron que 6 colonias fueron positivas a la presencia del gen *stdA*. Las cuales se sembraron en agar LB con carbenicilina.

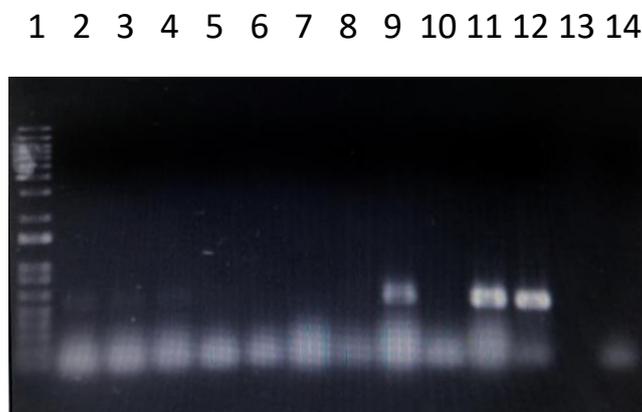


FIGURA 14 . Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1: marcador GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific®). Carril 2,3,4,9 y 11 clonas positivas del plásmido pCR™2.1-TOPOstdA. Carril 12: Control positivo. Carril 14 control negativo.

7.6 Extracción del plásmido pBAD/Myc-His A

Se extrajo el vector de clonación pBAD/Myc-His A de la cepa de *E. coli* BL21 mediante el procedimiento de lisis alcalina y se realizó su electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE para visualizarlo. Se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop®. Obteniendo la concentración de 526.7 ng / μ l, el índice de absorción 260/280 con 1.81 indicó valores óptimos de pureza del ADN.

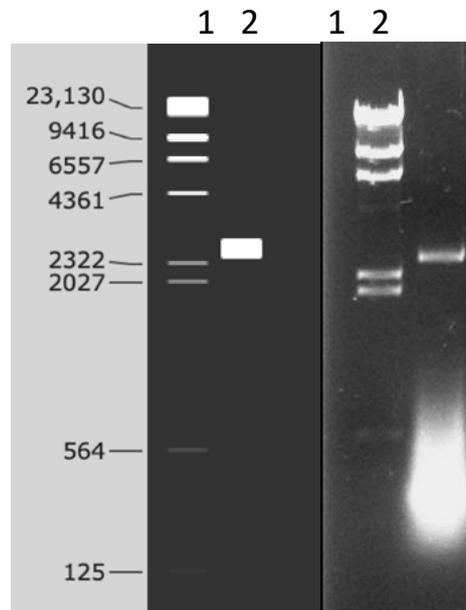


FIGURA 15. Izquierda: predicción *in silico* en SnapGene® 6.1.1 Derecha: Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Carril 1: marcador Lambda DNA/HindIII (ThermoScientific®). Carril 2: pBAD Myc-His A superenrollada.

7.7 Ensayo de restricción pBAD/Myc-His A

El plásmido pBAD/Myc-His A se verificó realizando un ensayo de restricción con la enzima *EcoRV* linealizando con un peso de 4094 pb y una doble digestión con las enzimas *EcoRV* y *SalI* generando dos fragmentos, uno de 3064 pb y el otro de 1030pb.

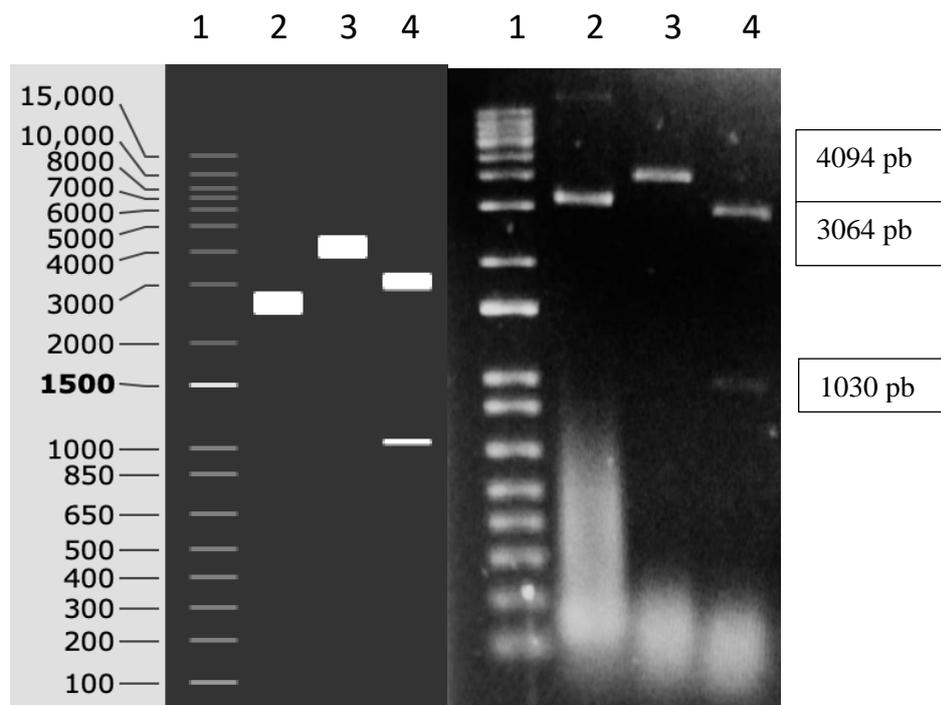


FIGURA 16. Ensayo de digestión enzimática del vector pBAD/Myc-His A. Izquierda: predicción *in silico* en SnapGene® 6.1.1 Derecha: Fotografía de un gel agarosa al 1% en TAE 1X tenido con bromuro de etidio Carril 1: marcador 1kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific®). Carril 2: pBAD Myc-His A superenrollada Carril 3: pBAD Myc-His A digerido con *EcoRV* Carril 4: pBAD Myc-His A digerido con *EcoRV* y *SalI*.

7.8 Preparación de células electrocompetentes y electroporación

Se obtuvieron células electrocompetentes de *E.coli* BL21 para ser utilizadas en la transformación con el vector pBAD Myc-His A. Se almacenaron en ultracongelación a -70°C hasta su uso.

La cepa de *E.coli* BL21 transformada con el vector pBAD Myc-His A fue sembrada en agar LB con ampicilina a una concentración de $100\mu\text{g/ml}$, se obtuvieron aproximadamente 50 clonas con resistencia a ampicilina.

7.9 Alineación de aminoácidos de las proteínas StdA y PegA

Los resultados de alineación de aminoácidos entre ambas proteínas, mostraron una homología del 23 % de identidad.

ANF20100.1 fimbrial protein StdA [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis]

Sequence ID: Query_25092 Length: 193 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 190 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
32.0 bits(71)	4e-06	Compositional matrix adjust.	45/195(23%)	80/195(41%)	26/195(13%)
Query 1		MKRSLIAASVLSAVFMSAGVFAAEDM-----GELKINGEVVGTSCTF-EGANSATIEL			53
Sbjct 1		.RNKI.L.MAAAGMMYG.S.Y.V.PPTAGPFGS.KITFT.TITNSP.DIAP.DDAI.VPF			60
Query 54		SQVGVDRLTDLNPGDIYTGYSPEAILKVRCTNTANPRISFNRSQFVDNMQITKNNATNN			113
Sbjct 61		G.ISYRK.---.TA.AT.-ESK.FT.HLQN.AFDP.TPDTAGSAGKMSKVTVSFSG.A.T			116
Query 114		G-----AGFAVYLDGIQV-KPDEAGNYTLNS-----SKFENGVTLNFSARYAAVEN			159
Sbjct 117		SKKAYTS.I.QHV-.V.LL.S.N.TIIDP.TPMPDGDAAQLQA.NNE...F..LI.LD.			175
Query 160		TVTPGSVESVLTMTV	174		
Sbjct 176		G....DFNASV.Y.L	190		

23 % de identidad

FIGURA 17. Alineación de aminoácidos de las proteínas StdA y PegA en el servidor BLAST (letras negra corresponden a la secuencia de la proteína PegA y letras rojas a la secuencia de la proteína StdA).

7.10 Predicción de plegamiento de PegA y StdA

El servidor SWISS-MODEL permitió generar un modelo por homología de las proteínas StdA y PegA, con un porcentaje de identidad del 39.6 % en StdA y 22.6 % en PegA en su secuencia de aminoácidos, extrapolando la información experimental de la biblioteca de estructuras de proteínas relacionadas evolutivamente del servidor SWISS-MODEL.

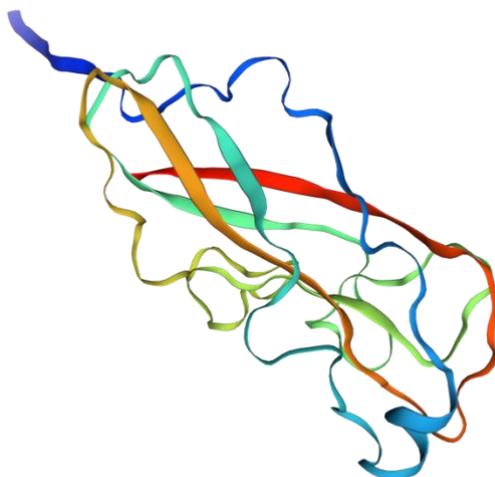


FIGURA 18. Predicción de plegamiento de la proteína PegA generado en el servidor SWISS-MODEL.

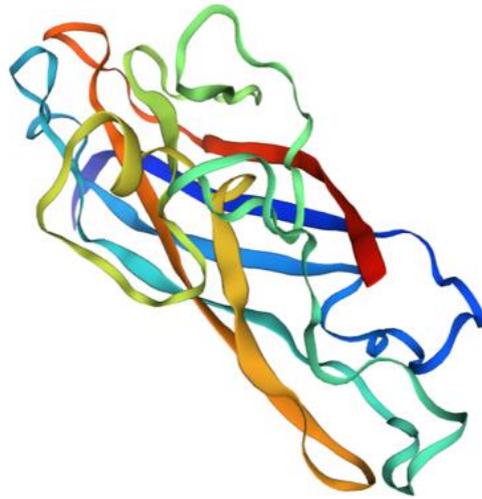


FIGURA 19. Predicción de plegamiento de la proteína StdA generado en el servidor SWISS-MODEL.

7.11 Predicción *in silico* de epítomos de las proteínas StdA y PegA

PegA

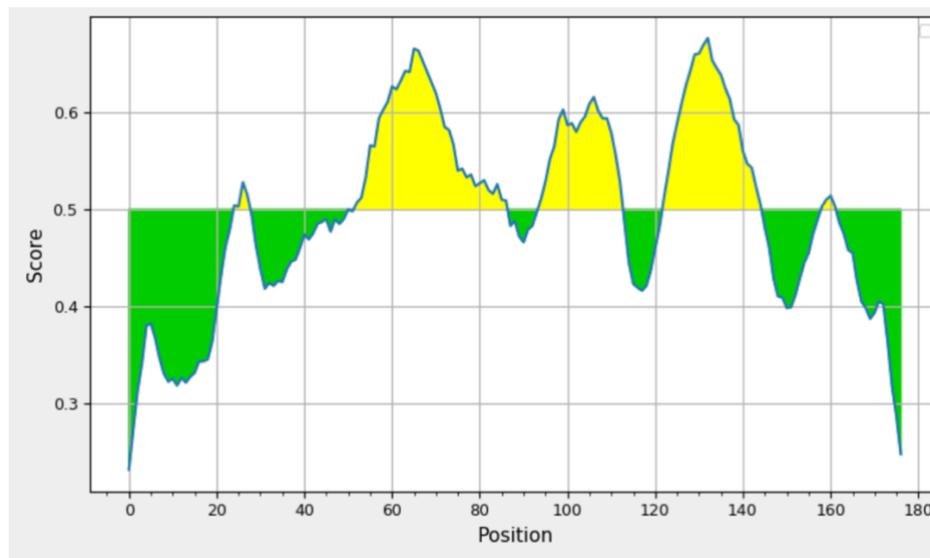


FIGURA 20. Predicción de epítomos de la proteína PegA en el servidor Bepipred 2.0. En amarillo se muestran las regiones con puntajes superiores al umbral de 0.5 definiéndose como epítomos. El umbral de 0.5 corresponde a una sensibilidad del 58% y una especificidad del 57% aproximadamente. Si el umbral aumenta, la sensibilidad disminuye mientras que la especificidad aumenta (Jespersen *et al.*, 2017).

N o	Comienzo	Final	Epítipo	Longitud a.a
1	53	87	LSQVGVDRLTDLNPGDIYTGYSPEAILKVRCTN T	35
2	95	113	NRSQFVDNMQITKNNATNN	19
3	123	145	GIQVKPDEAGNYTLNSSKFENG	23

CUADRO 12. Predicción de epítipos de la proteína PegA en el servidor BepiPred 2.0. Se muestra la secuencia de aminoácidos y posición dentro de la proteína de los epítipos definidos.

MKRSLIAASVLSAVFMSAGVFAADEDMGELKINGEVVGTSCTFEGANSATIE
 LSQVGVDRLTDLNPGDIYTGYSPEAILKVRCTNTANPRISFNRSQFVDNMQ
ITKNNATNNGAGFAVYLDGIQVKPDEAGNYTLNSSKFENGVYTLNFSARYAA
 VENTVTPGSVESVLTMTVLTLD

CUADRO 13. Predicción de accesibilidad de epítipos de la proteína PegA . Los epítipos de linfocitos B pronosticados se muestran en color azul y subrayados. umbral respectivo: 1.9 (obtenido con BcePred).

StdA

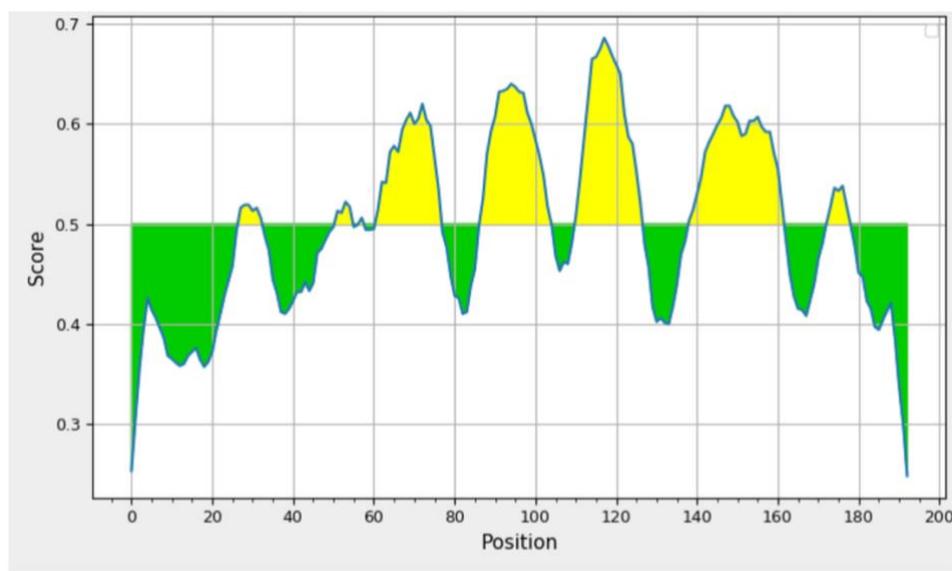


FIGURA 21. Predicción de epítipos de la proteína StdA en el servidor BepiPred 2.0. En amarillo se muestran las regiones con puntajes superiores al umbral de 0.5 definiéndose como epítipos.

No	Comienzo	Final	Epítipo	Longitud
4	62	77	QISYRKLNTADATTES	16
5	88	104	AFDPNTPDTAGSAGKMS	17
6	111	127	SGAANTSKKAYTTSGIA	17
7	139	162	NATIIDPNTMPDGDAAQQLQAGNN	24

Cuadro 14. Predicción de epítipos de la proteína StdA en el servidor BepiPred 2.0. Se muestra la secuencia de aminoácidos y posición dentro de la proteína de los epítipos definidos.

MRNKIILAMAAAGMMYGASVYAVDPPTAGPFGSGKITFTGTITNSPCDIAP
 GDDAITVPFGQISYRKLNTADATTESKPFTIHLQNCAFDPNTPDTAGSAGK
 MSKVTVSFSGAANTSKKAYTTSGIAQHVGVQLLKSDNATIIDPNTMPDGD
AQQLQAGNNELNFFARLIALDNGVTPGDFNASVTYTLKYL

CUADRO 15. Predicción de accesibilidad de epítipos de la proteína StdA . Los epítipos de linfocitos B pronosticados se muestran en color azul y subrayados. Umbral respectivo: 1.9 (obtenido con BcePred).

PegA

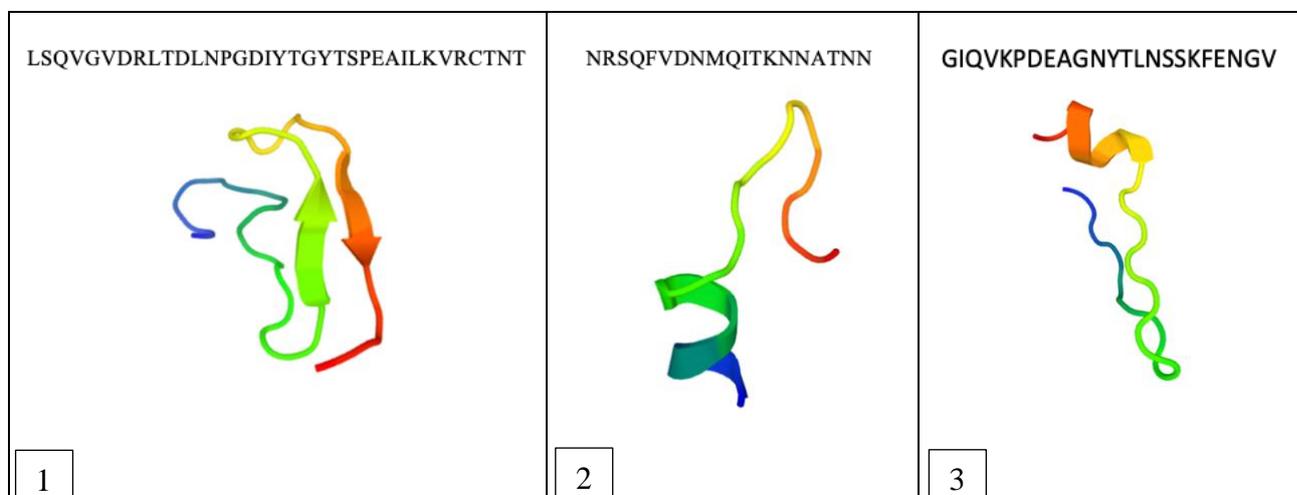


FIGURA 22. Modelado 3D de los epítipos seleccionados de la proteína PegA generados en el servidor PEP-Fold3, en la parte superior de cada modelo se muestra su secuencia de aminoácidos.

StdA

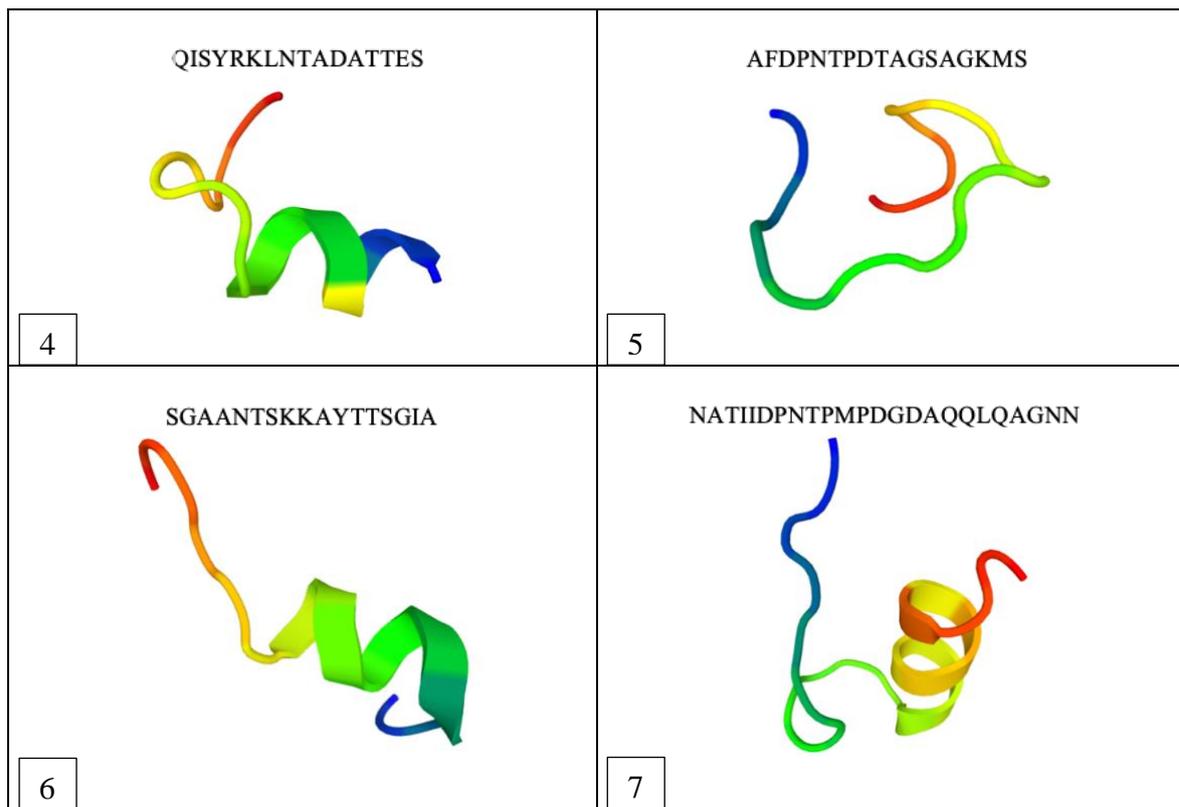


FIGURA 23. Modelado 3D de los epítomos seleccionados de la proteína StdA generados en el servidor PEP-Fold3, en la parte superior de cada modelo se muestra su secuencia de aminoácidos.

VIII. DISCUSIÓN

La salmonelosis es una de las enfermedades zoonóticas más importantes y se transmite a los humanos a través de alimentos crudos de origen animal. Los huevos contaminados son una de las principales fuentes de infecciones humanas por *Salmonella* spp. siendo un problema y desafío para las autoridades de salud pública y las industrias del huevo en todo el mundo (Gast *et al.*, 2021). Los huevos pueden contaminarse con *Salmonella* spp. en su superficie externa de la cáscara e internamente. La contaminación directa del contenido del huevo puede deberse a la infección de los órganos reproductivos del ave antes de la oviposición, o ser el resultado de la penetración a través de la cáscara del huevo (Gantois *et al.*, 2009), lo cual fue estudiado por Padrón en 1990 quien rociando huevos con *Salmonella* Typhimurium demostró la capacidad de la bacteria de penetrar huevos intactos. Las aves infectadas con la mayoría de las serovariedades de *Salmonella* spp. no muestran signos clínicos de la enfermedad, lo que dificulta el diagnóstico en la granja.

El primer paso de la patogenia de *Salmonella* Enteritidis implica la adherencia de la bacteria a las células huésped, que está mediada por fimbrias que son proteínas que se proyectan desde la superficie bacteriana y hacen el primer contacto interactuando con receptores específicos. El genoma de *Salmonella* spp. posee una extensa diversidad fimbrial. La mayoría de las fimbrias centrales pertenecen al clado γ al cual pertenece el operón *peg* lo que destaca el potencial de este clado para la adaptabilidad, supervivencia e infección de *Salmonella* spp. (McClelland *et al.*, 2001). Por otro lado el operón *std* codifica fimbrias del clado π , que tienen la capacidad de

unirse residuos de fucosa α -1,2 terminales (Chessa *et al.*, 2009) estas fimbrias facilitan que *Salmonella* spp. se establezca en el intestino grueso que esta altamente fucosilado (Suwandi *et al.*, 2019). Sin embargo estas fimbrias no se expresan o tienen una débil expresión cuando *Salmonella* spp. se cultiva en condiciones de laboratorio. En 2013 Kröger y cols. compararon 22 condiciones tratando de simular las señales ambientales presentes en la infección *in vivo* por *Salmonella* spp. y mediante un análisis basado en ARN-seq, revelaron que la expresión de los operones fimbriales estaban ausentes o deficientemente expresados. Debido a esta razón el estudio de estas fimbrias se ha visto limitado. Sin embargo Chessa y sus colegas en 2008 lograron la expresión fimbrial del operón *std* mutando los genes *dam* y *rosE* de regulación negativa.

En el presente trabajo se realizó la amplificación y clonación del gen *stdA* de *Salmonella* Enteritidis 49214 en el plásmido comercial pCR2.1 TOPO para su posterior subclonación en el vector de expresión pBAD Myc-His A. Se aprovecharon las herramientas bioinformáticas para comprender y determinar mejor la estructura tridimensional de StdA y PegA y sus residuos funcionales para la selección de epítomos, así como determinar el porcentaje de homología entre estas dos proteínas.

La precisión que poseen estas herramientas predictivas es cuestionable, ya que predecir epítomos solo a partir de las secuencias de antígenos se le considera una tarea compleja, sin embargo la información obtenida puede ser utilizada para descartar regiones con alta probabilidad de que no sean epítomos (Jespersen *et al.*, 2017). Estas herramientas ya han sido utilizadas para el estudio de proteínas fimbriales en bacterias, obteniendo resultados favorables en la búsqueda de epítomos para linfocitos B (Zargaran *et al.*, 2021).

El péptido señal es uno de los elementos más importantes que interviene en las etapas del proceso de secreción y rendimiento de las proteínas (Khatami *et al.*, 2020). Se encarga de dirigir a las proteínas recién sintetizadas hacia la vía secretora, por lo que localizar su sitio de escisión permite mejorar la secreción de la proteína en el sobrenadante del cultivo. En este trabajo se utilizó el servidor SignalP 6.0 para predecir la presencia del péptido señal y los sitios de escisión en las proteínas PegA y StdA. La predicción generada reveló la presencia del péptido señal entre los aminoácidos 64 y 65 en la proteína StdA y entre los aminoácidos 22 y 23 en la proteína PegA. Con esta información se diseñaron los iniciadores eliminando la secuencia correspondiente al péptido señal.

Se indentificaron los epítomos de linfocitos B de las proteínas StdA y PegA de *Salmonella* Enteritidis. Este tipo de epítomos pueden ser lineales o conformacionales. Los epítomos lineales son secuencias de aminoácidos continuos en la secuencia de la proteína. Los epítomos conformacionales son residuos de aminoácidos que pueden estar separados en la secuencia primaria de la proteína, pero que se acercan físicamente mediante el plegamiento de la proteína (El-Manzalawy *et al.*, 2017).

La predicción de epítomos de células B de ambas proteínas dió como resultado 3 epítomos en PegA y 4 en StdA (Cuadro 12 y 14). En cuanto a los resultados de predicción de la estructura 3D de los epítomos de la proteína PegA reveló que el epítomo LSQVGVDRDLTDLNPGLDIYTGYSPEAILKVRCTNT se compone de una estructura principal de hoja β plegada, mientras que los epítomos NRSQFVDNMQITKNNATNN y GIQVKPDEAGNYTLNSSKFENGV se componen principalmente de hélices α (Fig. 22). Los epítomos de la proteína StdA QISYRKLNTADATTES, SGAANTSKKAYTTSGIA y NATIIDPNTMPDGDAAQQLQAGNN muestran una estructura compuesta por hélices α y AFDPNTPD TAGSAGKMS posee una estructura más sencilla carente de hoja β plegada y

hélices α . Las hélices α y hojas β plegadas son conformaciones que confieren a las epítomos estabilidad estructural.

La predicción de accesibilidad de epítomos de la proteína StdA y PegA fue obtenida mediante el servidor BcePred (Cuadro 13 y 15) que se basa en el método de Emini donde la probabilidad de superficie de un hexapéptido superior a un umbral de 1.0 predice que la secuencia tiene una mayor probabilidad de ser encontrado en la superficie (Emini *et al.*, 1985).

Los epítomos QISYRKLNTADATTES, SGAANTSKKAYTTSGIA NATIIDPNTMPDGDAAQQLQAGNN y AFDPNTPD TAGSAGKMS obtuvieron puntuaciones por encima del umbral para el método de predicción en la proteína StdA, en cuanto a la proteína PegA los datos mostrados indican que su epítomo LSQVGVDRLTDLNPGDIYTGYSPEAILKVRCTNT posee dos regiones que superan el umbral siendo estas DRLTDLNP y YTGYSPEA, sus otros epítomos NRSQFVDNMQITKNNATNN y GIQVKPDEAGNYTLNSSKFENGV se encuentran por encima del umbral y por lo tanto deberían poseer una mayor accesibilidad.

La estructura tridimensional de las proteínas nos permite obtener información valiosa sobre la función de estas, ya que la exposición y accesibilidad de los epítomos son factores importantes que facilitan que ocurra la unión del anticuerpo con su antígeno específico, al igual que la carga presente en cada aminoácido, que está conferida por el arreglo proteico de plegamiento hacia el interior de todos aquellos aminoácidos hidrofóbicos y hacia la superficie todos aquellos hidrofílicos (Kauzmann 1959).

La identificación de homología entre proteínas toma un papel cada vez más importante para llevar a cabo estudios funcionales, estructurales y evolutivos de las proteínas. Muchas proteínas homólogas se separaron hace mucho tiempo durante su historia evolutiva y comparten una baja identidad de secuencia (Wan y Xu 2005). El porcentaje de identidad que se obtuvo de la alineación de aminoácidos entre las proteínas StdA y PegA fue de 23% y justifica el planteamiento de que las proteínas no son homólogas ya que la regla general es que dos secuencias son homólogas si son más del 30% idénticas en toda su longitud (Pearson 2013). Esto sugiere que la adquisición de ambos genes fue posterior a la divergencia de las subespecies de *Salmonella enterica*. Dos proteínas pueden estar separadas por mucho tiempo de evolución, y su relación evolutiva puede ser complicada de detectar, sugiriendo una amplia distancia evolutiva entre ellas (Arteaga *et al.*, 2013).

La comprensión de la expresión fimbrial en respuesta a diferentes señales ambientales sigue siendo escasa. Es necesario estudiar los mecanismos reguladores transcripcionales y traduccionales para identificar la señales del huésped que controlan la expresión de las diferentes fimbrias.

Investigaciones futuras permitirían generar posibles candidatos vacunales dirigidos a los epítomos fimbriales como blancos y disminuir con ello la adherencia de las bacterias. Se propone realizar una búsqueda de homología entre otras proteínas de diferentes microorganismos para determinar las capacidades inmunogénicas hacia otras serovariedades de *Salmonella*. Así como la obtención de las proteínas StdA y PegA con la finalidad de buscar la implementación de pruebas diagnósticas y eventualmente el diseño de inmunógenos que permitan controlar las infecciones causadas por esta bacteria.

IX. CONCLUSIONES

- 1- Se obtuvo el modelo 3D de las proteínas PegA y StdA y de sus epítomos seleccionados, obteniendo información sobre la exposición y accesibilidad de los epítomos.
- 2- Se alinearon las secuencias de aminoácidos de las proteínas PegA y StdA , y se encontró que no existe una similitud significativa que indique homología en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos.
- 3- Se estandarizaron las condiciones de la PCR para la amplificación gen *stdA* y *pegA* de *Salmonella* Enteritidis.
- 4- Se obtuvo la predicción de la secuencia de aminoácidos de los epítomos lineales de linfocitos B de las proteínas StdA y PegA.

X. PROSPECTIVAS

- 1- Generar los antisueros específicos contra las proteínas StdA y PegA.
- 2- Encontrar los reguladores transcripcionales y traduccionales que permitan la expresión fimbrial óptima de los operones *std* y *peg* en condiciones *in vitro*.
- 3- Sintetizar péptidos recombinantes apartir de las secuencias de los epítomos predichos y evaluar sus propiedades inmunogénicas.
- 4- Determinar los epítomos críticos de las proteínas StdA y PegA mediante biopanning y comparar los resultados con los obtenidos *in silico*.
- 5- Seguir en la búsqueda de adhesinas fimbriales clave en la invasión y colonización de *Salmonella* spp.

VII. REFERENCIAS

1. Antonysamy M., S. Meenatchisundaram, G. Angala Parameswari, T. Subbraj, R. Selvakumaran & Sudha Ramalingam (2010). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian J. Sci. Technol*, 3 (4), 468–474.
2. Aprikian, P., Interlandi, G., Kidd, B. A., Le Trong, I., Tchesnokova, V., Yakovenko, O., Whitfield, M. J., Bullitt, E., Stenkamp, R. E., Thomas, W. E., & Sokurenko, E. V. (2011). The bacterial fimbrial tip acts as a mechanical force sensor. *PLoS biology*, 9(5), e1000617. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000617>.
3. Arteaga-Resendiz, NK, Velázquez-Guadarrama, N., Rivera-Gutiérrez, S., Olivares-Trejo, J. de J., Méndez-Tenorio, A., Valencia-Mayoral, P., López-Villegas, EO, Rodríguez-Leviz, A., Viguera, JC, Arellano-Galindo, J., Girón, J., & Torres-López, J. (2013). Análisis in silico de proteínas potencialmente involucradas en la biogénesis de fimbrias en *Helicobacter pylori*. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70 (2), 78–88.
4. Asadi A., Razavi S., Talebi M. & Gholami M. (2019). A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection*, 47 (1), 13-23.
5. Asma A., Baratpour, A., Khanzade, S., & Jamshidi, A. (2018). *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium identification in poultry carcasses. *Iranian journal of microbiology*, 10(1), 45–50.
6. Avilés, B., Klotz, C., Smith, T., Williams, R., & Ponder, M. (2013). Survival of *Salmonella* enterica serotype Tennessee during simulated gastric passage is improved by low water activity and high fat content. *Journal of food protection*, 76(2), 333–337. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-280>.
7. Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). *Salmonella* enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 547-557.
8. Bavishi, C., & Dupont, H. L. (2011). Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 34(11-12), 1269–1281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04874.x>.
9. Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C. & Landini, P. (2006). Gene Expression Regulation by the Curli Activator CsgD Protein: Modulation of Cellulose Biosynthesis and Control of Negative Determinants for Microbial Adhesion. *Journal of bacteriology*, 188 (6), 2027-2037.
10. Burrows L. L. (2005). Weapons of mass retraction. *Molecular microbiology*, 57(4), 878–888. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04703.x>.

11. Chessa, D., Winter, M. G., Jakomin, M., & Bäumlér, A. J. (2009). Salmonella enterica serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha (1,2) fucose residues in the cecal mucosa. *Molecular microbiology*, 71(4), 864–875. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06566.x>.
12. Chessa, D., Winter, M. G., Nuccio, S. P., Tükel, C., & Bäumlér, A. J. (2008). RosE represses Std fimbrial expression in *Salmonella* enterica serotype Typhimurium. *Molecular microbiology*, 68(3), 573–587. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06185.x>.
13. Clayton, D. J., Bowen, A. J., Hulme, S. D., Buckley, A. M., Deacon, V. L., Thomson, N. R., Barrow, P. A., Morgan, E., Jones, M. A., Watson, M., & Stevens, M. P. (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, 228.
14. Cozens, D., & Read, R. C. (2012). Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(12), 1457–1468. <https://doi.org/10.1586/eri.12.145>.
15. Cruz Bautista, R. (2019). Identificación de epítopes de la proteína PegA de *Salmonella* Enteritidis mediante despliegue en fago (Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México.
16. Desin, T. S., Köster, W., & Potter, A. A. (2013). *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert review of vaccines*, 12(1), 87–96. <https://doi.org/10.1586/erv.12.138>.
17. DGE (Dirección General de Epidemiología). (2022). Anuario de Morbilidad, 2022. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.
18. Diraviyam, T., Zhao, B., Wang, Y., Schade, R., Michael, A., & Zhang, X. (2014). Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 9(5), e97716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097716>.
19. Dufresne, K., & Daigle, F. (2017). *Salmonella* Fimbriae: What is the clue to their hairdo? In (Ed.), *Current Topics in Salmonella and Salmonellosis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/67189>.
20. Dufresne, K., Saulnier-Bellemare, J., & Daigle, F. (2018). Functional Analysis of the Chaperone-Usher Fimbrial Gene Clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00026>.
21. Echeita, M. A., Aladueña, A. M., Arroyo, M., Cerdán, F., Gutiérrez, R., De la fuente, M., González-Sanz, R., Herrera-León, S., Usera, M.Á., Díez Rodríguez R., (2005). Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados

- en España en 1997-2001. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 23(3) 127-134.
22. El-Manzalawy, Y., Dobbs, D., & Honavar, V. G. (2017). In Silico Prediction of Linear B-Cell Epitopes on Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1484, 255–264. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6406-2_17.
 23. Emini, E. A., Hughes, J. V., Perlow, D. S., & Boger, J. (1985). Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *Journal of virology*, 55(3), 836–839. <https://doi.org/10.1128/JVI.55.3.836-839.1985>.
 24. Fandiño, L. C., & Verjan, N. (2019). A common *Salmonella* Enteritidis sequence type from poultry and human gastroenteritis in Ibagué, Colombia. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 39(s1), 50–62. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.4155>.
 25. Fleri, W., Paul, S., Dhanda, S. K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B., & Sette, A. (2017). The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Frontiers in immunology*, 8, 278. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00278>.
 26. Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., & Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 718–738. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00161.x>.
 27. García Pastor, L., Sánchez-Romero, M. A., Jakomin, M., Puerta-Fernández, E., & Casadesús, J. (2019). Regulation of bistability in the std fimbrial operon of *Salmonella enterica* by DNA adenine methylation and transcription factors HdfR, StdE and StdF. *Nucleic acids research*, 47(15), 7929–7941. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz530>.
 28. Gast, R. K., Jones, D. R., Guraya, R., Anderson, K. E., & Karcher, D. M. (2021). Research Note: Contamination of eggs by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in experimentally infected laying hens in indoor cage-free housing. *Poultry science*, 100(11), 101438. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101438>.
 29. Gast, R. K., Stone, H. D., Holt, P. S., & Beard, C. W. (1992). Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella* enteritidis. *Avian diseases*, 36(4), 992–999.
 30. Gerlach, R. G., & Hensel, M. (2007). Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 297(6), 401–415. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.017>.
 31. Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature reviews. Microbiology*, 6(1), 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>.

32. Huberman, Y. D., Velilla, A. V., & Terzolo, H. R. (2019). Evaluation of different live *Salmonella* Enteritidis vaccine schedules administered during layer hen rearing to reduce excretion, organ colonization, and egg contamination. *Poultry science*, 98(6), 2422–2431. <https://doi.org/10.3382/ps/pez003>.
33. Hultgren, S. J., & Normark, S. (1991). Biogenesis of the bacterial pilus. *Current opinion in genetics & development*, 1(3), 313–318. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(05\)80293-x](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(05)80293-x).
34. Ilyas, B., Tsai, C. N., & Coombes, B. K. (2017). Evolution of *Salmonella*-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 428. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00428>.
35. Jakomin, M., Chessa, D., Bäumlner, A. J., & Casadesús, J. (2008). Regulation of the *Salmonella enterica* std fimbrial operon by DNA adenine methylation, SeqA, and HdfR. *Journal of bacteriology*, 190(22), 7406–7413. <https://doi.org/10.1128/JB.01136-08>.
36. Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic acids research*, 45(W1), W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>.
37. Kauzmann W. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Advances in protein chemistry*, 14, 1–63. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60608-7](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60608-7).
38. Khatami, S. H., Taheri-Anganeh, M., Arianfar, F., Savardashtaki, A., Sarkari, B., Ghasemi, Y., & Mostafavi-Pour, Z. (2020). Analyzing Signal Peptides for Secretory Production of Recombinant Diagnostic Antigen B8/1 from *Echinococcus granulosus*: An *In silico* Approach. *Molecular biology research communications*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.22099/mbrc.2019.35429.1457>
39. Krachler, A. M., & Orth, K. (2013). Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence*, 4(4), 284–294. <https://doi.org/10.4161/viru.24606>.
40. Kröger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Händler, K., Sivasankaran, S. K., Hammarlöf, D. L., Canals, R., Grissom, J. E., Conway, T., Hokamp, K., & Hinton, J. C. (2013). An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell host & microbe*, 14(6), 683–695. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.010>.
41. Kurtz, J. R., Goggins, J. A., & McLachlan, J. B. (2017). *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology letters*, 190, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>.

42. Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., & Tufféry, P. (2016). PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic acids research*, *44*(W1), W449–W454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>.
43. Laniewski P., Baek C. H., Roland K. L., Curtiss R.3. (2017). Analysis of spleen-induced fimbria production in recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains. *mBio* *8*, e01189–e01117. 10.1128/mBio.01189-17.
44. Lanzarini, N. M., Bentes, G. A., Volotão, E. M., & Pinto, M. A. (2018). Use of chicken immunoglobulin Y in general virology. *Journal of immunoassay & immunochemistry*, *39*(3), 235–248. <https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1500375>.
45. López-Garrido, J., & Casadesús, J. (2012). Crosstalk between virulence loci: regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by products of the *std* fimbrial operon. *PloS one*, *7*(1), e30499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030499>.
46. Mattick J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual review of microbiology*, *56*, 289–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>.
47. McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., ... Wilson, R. K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, *413*(6858), 852–856. <https://doi.org/10.1038/35101614>.
48. McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D., & Koronakis, V. (2009). *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current opinion in microbiology*, *12*(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.001>.
49. Mortezaei, N., Singh, B., Bullitt, E., Uhlin, B. E., & Andersson, M. (2013). P-fimbriae in the presence of anti-PapA antibodies: new insight of antibodies action against pathogens. *Scientific reports*, *3*, 3393. <https://doi.org/10.1038/srep03393>.
50. Müller S., Schubert A., Zajac J., Dyck T., & Oelkrug C. (2015). IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutr J*.*14*: 109. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0067-3>.
51. Nuccio, S. P., & Bäumler, A. J. (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *71*(4), 551–575. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-07>.
52. Padron M. (1990). *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian diseases*, *34*(2), 463–465.

53. Pearson W. R. (2013). An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Current protocols in bioinformatics, Chapter 3*, 3.1.1–3.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0301s42>.
54. Penha Filho, R. A., de Paiva, J. B., Arguello, Y. M., da Silva, M. D., Gardin, Y., Resende, F., Berchieri Junior, A. B., & Sesti, L. (2009). Efficacy of several vaccination programmes in commercial layer and broiler breeder hens against experimental challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A*, 38(5), 367–375. <https://doi.org/10.1080/03079450903183645>.
55. Pereira, E., van Tilburg, M. F., Florean, E., & Guedes, M., (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, Volume 73, 2019, Pages 293-303, ISSN 1567-5769. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>.
56. Pitcher, D.G., Saunders N.A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8:151–156. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262. x.
57. Remaut, H., & Ben-Tal, N. (2014). Lifting the lid on pilus assembly. *eLife*, 3, e04997. <https://doi.org/10.7554/eLife.04997>.
58. Remaut, H., Tang, C., Henderson, N. S., Pinkner, J. S., Wang, T., Hultgren, S. J., Thanassi, D. G., Waksman, G., & Li, H. (2008). Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell*, 133(4), 640–652. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.033>.
59. Robinson, D. E., Buttle, D. J., Short, R. D., McArthur, S. L., Steele, D. A., & Whittle, J. D. (2012). Glycosaminoglycan (GAG) binding surfaces for characterizing GAG-protein interactions. *Biomaterials*, 33(4), 1007–1016. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.042>.
60. Saha, S., & Raghava, G. P. (2004). BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. In G.Nicosia, V.Cutello, P.J. Bentley and J.Timis (Eds.) *ICARIS LNCS 3239*, 197-204.
61. Sambrook, J. & Russell, D.w. (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. 3rd edition, vol. 1, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York. - references - scientific research publishing. (s/f). Scirp.org.
62. Sana, T. G., Flaughnatti, N., Lugo, K. A., Lam, L. H., Jacobson, A., Baylot, V., Durand, E., Journet, L., Cascales, E., & Monack, D. M. (2016). *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), E5044–E5051.
63. Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., & Terzolo, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary

medicine. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 33(2), 129–154. <https://doi.org/10.1177/026119290503300208>.

64. Shah, D. H., Zhou, X., Kim, H. Y., Call, D. R., & Guard, J. (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), 4203–4215. <https://doi.org/10.1128/IAI.00790-12>.
65. Shippy, D. C., Eakley, N. M., Mikheil, D. M., & Fadl, A. A. (2013). Role of StdA in adhesion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 8 to host intestinal epithelial cells. *Gut pathogens*, 5(1), 43. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-43>.
66. Silva, C. A., Blondel, C. J., Quezada, C. P., Porwollik, S., Andrews-Polymenis, H. L., Toro, C. S., Zaldívar, M., Contreras, I., McClelland, M., & Santiviago, C. A. (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), 839–849. <https://doi.org/10.1128/IAI.05497-11>.
67. Singh, B., Mortezaei, N., Savarino, S. J., Uhlin, B. E., Bullitt, E., & Andersson, M. (2016). Antibodies damage the resilience of fimbriae, causing them to be stiff and tangled. *Journal of bacteriology*, 199(1), e00665-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00665-16>.
68. Suwandi, A., Galeev, A., Riedel, R., Sharma, S., Seeger, K., Sterzenbach, T., García Pastor, L., Boyle, E. C., Gal-Mor, O., Hensel, M., Casadesús, J., Baines, J. F., & Grassl, G. A. (2019). Std fimbriae-fucose interaction increases *Salmonella*-induced intestinal inflammation and prolongs colonization. *PLoS pathogens*, 15(7), e1007915. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007915>.
69. Thanassi, D. G., Nuccio, S. P., Shu Kin So, S., & Bäumler, A. J. (2007). Fimbriae: Classification and Biochemistry. *EcoSal Plus*, 2(2), 10.1128/ecosalplus.2.4.2.1.
70. Townsend, S. M., Kramer, N. E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Stevens, K., Maloy, S., Parkhill, J., Dougan, G., & Bäumler, A. J. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infection and immunity*, 69(5), 2894–2901. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2894-2901.2001>.
71. Wagner, C., & Hensel, M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Advances in experimental medicine and biology*, 715, 17–34. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_2.
72. Warr, G. W., Magor, K. E., & Higgins, D. A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology today*, 16(8), 392–398. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5).
73. Wiedemann, A., Virlogeux-Payant, I., Chaussé, A. M., Schikora, A., & Velge, P. (2015). Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in microbiology*, 5, 791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00791>.

74. World Health Organization. (2018). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). (Accessed: 18 July 2018).
75. Wan, X. F., & Xu, D. (2005). Computational methods for remote homolog identification. *Current protein & peptide science*, 6(6), 527–546. <https://doi.org/10.2174/138920305774933231>.
76. Yoshimura, Y. (2004). Significance of local immunity in hen reproductive organs. *Anim Sci J*. 75:183–191.
77. Yue, M., Rankin, S. C., Blanchet, R. T., Nulton, J. D., Edwards, R. A., & Schifferli, D. M. (2012). Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro- and microevolution. *PloS one*, 7(6), e38596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038596>.
78. Zargaran, F. N., Akya, A., Rezaeian, S., Ghadiri, K., Lorestani, R. C., Madanchi, H., Safaei, S., & Rostamian, M. (2021). B Cell Epitopes of Four Fimbriae Antigens of *Klebsiella pneumoniae*: A Comprehensive In Silico Study for Vaccine Development. *International journal of peptide research and therapeutics*, 27(2), 875–886. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10134-3>.
79. Zavialov V., Zavialov A., Zav'yalova G., & Korpela T. (2010). Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 317–378.
80. Zavialov, A., Zav'yalova, G., Korpela, T., & Zav'yalov, V. (2007). FGL chaperone-assembled fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 478–514.

Anexo 1:

Revisión del “Estado del arte” en fimbrias como herramientas de diagnóstico e inmunización

Introducción

La adhesión es el primer paso crucial en la colonización de bacterias comensales y patógenas (De Greve *et al.*, 2007). La mayoría de estas bacterias lo consiguen expresando moléculas adhesivas en sus superficies que promueven la interacción con receptores de la célula huésped (Kline *et al.*, 2009). Estas adhesinas conforman apéndices filamentosos ensamblados a partir de subunidades de proteínas, las cuáles fueron denominadas con el nombre de fimbrias por Duguid y cols. en 1955. Posteriormente Brinton en 1959 les asignó el nombre de pili, aunque ambos términos pueden ser utilizados como sinónimos (Duguid y Anderson 1967) en este trabajo se utilizará el término fimbria ya que en 1975 Ottow sugirió que el término pili se reservara para las estructuras involucradas en la transferencia de material genético durante la conjugación bacteriana y fimbrias para las estructuras involucradas en la adhesión, además el término fimbria se usa con frecuencia para describir a los pili cuya función se dedica a unir bacterias a una superficie celular o inerte (Pizarro-Cerdá y Cossart 2006).

Muchos géneros y especies diferentes de la familia de las enterobacterias poseen fimbrias (Duguid y Old 1980), que les facilita la unión al epitelio intestinal y urinario (O'Hanley *et al.*, 1985). Durante los últimos 30 años se han logrado avances en el conocimiento de las infecciones gastrointestinales y urinarias mediadas por bacterias fimbriadas, lo que ha permitido desarrollar y aplicar pruebas de diagnóstico basadas en la detección de fimbrias o anticuerpos específicos contra ellas. Las fimbrias poseen propiedades inmunogénicas que pueden ser utilizadas en la creación de vacunas con base en antígenos fimbriales (Gorringer y Vaughan 2014; Karan *et al.*, 2021). El uso de anticuerpos para alterar las propiedades físicas de las fimbrias puede ser aplicable a gran cantidad de bacterias que dependen de estas moléculas de adhesión como factor de virulencia. La intención del presente trabajo es resaltar la importancia del estudio de las fimbrias como herramientas de diagnóstico e inmunización.

Características generales de las fimbrias

Las fimbrias una vez adheridas, pueden aumentar varias veces su longitud original, experimentos que caracterizan el comportamiento de estrés y deformación de las fimbrias fueron informados por Chen *et al.*, en 2011 y Forero *et al.*, en 2006.

Esta interacción mediada por fimbrias con el huésped provoca respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas (Blomfield y van der Woude 2007). Esta respuesta inmune provocada contra los antígenos fimbriales puede ser la razón por la que la expresión de las fimbrias se regula comúnmente por variación de fase (Humphries *et al.*, 2001), en la que las células individuales son capaces de cambiar entre estados fimbriados y afimbriados para producir una población mixta. La variación de fase de las fimbrias se regula principalmente por mecanismos que afectan la transcripción que se origina en el promotor del operón, lo que da como resultado una expresión variable de la mayoría o de todos los genes del operón fimbrial (Low *et al.*, 1996), provocando la expresión fimbrial en solo una fracción de las células bacterianas presentes en un cultivo (Humphries *et al.*, 2001).

A diferencia de los pili, las fimbrias son bastante numerosas, con aproximadamente 1000 apéndices fimbriales por célula bacteriana (Jin y Marshall 2020). Lo que representa un gasto energético importante en la fisiología de la bacteria (Westerlund y Korhonen 2005).

Estudios experimentales han demostrado que las fimbrias juegan un papel crítico en la formación de biopelículas en algunas bacterias, esto depende tanto del tipo de bacteria como del tipo de fimbrias (Hancock *et al.*, 2011). Las fimbrias median interacciones interbacterianas, lo que facilita la formación de estas biopelículas (De Greve *et al.*, 2007) y contribuyen a infecciones persistentes al permitir que las bacterias evadan el sistema inmunológico y afectando el transporte de antibióticos (Tokuda *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2007).

Esquemas de clasificación de las fimbrias

Los esquemas de clasificación de las fimbrias han sufrido modificaciones a través de los años. Desde su primera descripción, se han identificado fimbrias en un gran número de géneros y especies bacterianas motivando esfuerzos para desarrollar mejores esquemas de clasificación. En un inicio se buscó agrupar a las fimbrias en función de sus características morfológicas y funcionales.

En un principio Houwink y Van Iterson en 1950 observaron y reconocieron por primera vez filamentos proteicos no flagelares en la superficie de células de *Escherichia coli* por microscopía electrónica. Más tarde en 1955 Duguid y cols. describieron la presencia de apéndices filamentosos que permitieron a *E.coli* unirse y aglutinar eritrocitos y acuñó el término fimbria.

Fue hasta 1959 que Duguid propuso un esquema de clasificación basado en la morfología y el potencial de hemaglutinación con siete tipos de fimbrias que van del 1 al 6 y F. Esta clasificación define a las fimbrias tipo 1 como adhesinas mediadoras de la hemaglutinación sensible a manosa. Se encuentran en la mayoría de las cepas de enterobacterias (Brinton 1965), permitiéndoles adherirse a células fúngicas, vegetales y animales, incluidos eritrocitos (Duguid *et al.*, 1955). A menudo son denominadas fimbrias comunes y se encuentran en la mayoría de las cepas de *E. coli*, se ha estimado que son producidas por el 70% de las cepas de tipo silvestre (Duguid *et al.*, 1979). Tienen una variación de fase mediada por un elemento de ADN invertible, un interruptor *fim* (Klemm y Schembri 2000a). Existe una variabilidad serológica significativa entre las subunidades fimbriales de tipo 1 entre los diferentes géneros de la familia Enterobacteriaceae, y también se ha demostrado una heterogeneidad significativa dentro de las secuencias de ADN que codifican las fimbrias tipo 1. Las fimbrias tipo 2 son expresadas por *Salmonella enterica* serovariedad Gallinarum y no median la hemaglutinación, pero son morfológicamente similares a las fimbrias tipo 1. Las fimbrias tipo 3 están presentes en la mayoría de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* y median la adhesión a varios tipos de células *in vitro* (Hornick *et al.*, 1992; Tarkkanen *et al.*, 1990), son capaces de hemaglutinar eritrocitos tratados con ácido tánico y son resistentes a manosa, aún no se ha identificado su tipo de receptor. Este tipo de fimbrias no se han asociado con *E. coli*, sin embargo dos estudios independientes informaron por primera vez, la expresión de fimbrias tipo 3 en cepas de *E. coli* codificadas por plásmidos conjugativos (Ong *et al.*, 2008; Burmolle *et al.*, 2008). Las fimbrias tipo 4 participan en la unión a tejidos epiteliales y translocación de superficie independiente de flagelos denominada motilidad de espasmos (Bradley 1980). Las fimbrias tipo 5 y 6 se refieren a estructuras superficiales detectadas en especies de *Pseudomonas* y *Klebsiella*. Las fimbrias tipo F participan en la conjugación, siendo descritos en 1964 en *E.coli* (Broda *et al.*, 1964).

Más tarde la clasificación de las fimbrias se llevó a cabo en función de su capacidad hemaglutinante en humanos de diferentes grupos sanguíneos en presencia o ausencia de manósidos. Los receptores fimbriales han sido estudiados en glóbulos rojos de diversas

especies animales (Bijlsma y Frik 1987; Burrows *et al.*, 1976). La especificidad de estos receptores a permitido la clasificación basada en la naturaleza química de las sustancias receptoras. Su presencia y densidad en células eucariotas es un determinante clave de la adhesión de patógenos bacterianos (De Greve *et al.*, 2007). Por ejemplo existen fimbrias que reconocen residuos de manosa y son conocidos como fimbrias M, si reconocen galactosa son nombradas fimbrias G o carbohidratos de ácido siálico como fimbrias S, sin embargo esta clasificación resulta confusa, ya que las fimbrias asociadas a cepas uropatógenas ya están designadas de acuerdo con los antígenos del grupo sanguíneo que reconocen, por ejemplo las fimbrias P que interactúan con antígenos del grupo sanguíneo P. Las fimbrias de la familia *Enterobacteriaceae* divididas en dos clases principales basadas en si son sensibles a manosa o resistentes a manosa (Salit y Gotschlich 1977).

En 1975 Ottow propuso un esquema de clasificación que abordaba seis grupos de fimbrias con base en su morfología, disposición y propiedades adhesivas. Solamente ciertas partes de las clasificaciones de Duguid y Ottow han perdurado a lo largo de los años. Como la fimbria tipo 1, clasificación designada por Duguid, de fimbrias que participan en la hemaglutinación sensible a manosa. La designación de Grupo 4 de Ottow ha cambiado a fimbrias tipo IV, para las fimbrias que median la motilidad de contracción y son capaces de extenderse y retraerse.

Existe una propuesta de clasificación de las fimbrias basada en sus diámetros por Paranchych en 1988 pero la extensa variedad de diámetros reportada para un mismo tipo fimbrial la hace un parámetro poco fiable para la clasificación. El uso de criterios arbitrarios como la morfología y características funcionales para clasificar las fimbrias, complica conocer la ubicación dentro del esquema de clasificación.

Han surgido sistemas de clasificación adicionales basados en serología (Orskov y Orskov 1990). Estos esquemas han sido útiles para clasificar la variedad de antígenos de fimbrias expresadas por *E. coli*. La relación serológica fimbrial entre serotipos del mismo género y entre géneros de la familia *Enterobacteriaceae* se determinó mediante procedimientos de aglutinación y absorción. Se encontró que las fimbrias de diferentes serotipos del mismo género y entre los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Klebsiella*, *Salmonella* y *Citrobacter* estaban relacionadas antigénicamente (Nowotarska *et al.*, 1977). La variación serológica de las fimbrias está dada por la estructura de la subunidad principal, una pequeña variación de secuencia en la subunidad adhesiva puede tener impacto sobre la unión, la identidad serológica y la función biológica pueden variar independientemente (Westerlund y Korhonen 2005).

Orskov y sus cols. en 1977 sugirieron clasificar las adhesinas de *E. coli* según sus propiedades antigénicas. Se ha introducido una clasificación serológica de las fimbrias con base en la inmunoelectroforesis cruzada. En este esquema, incluye las fimbrias de *E. coli* de forma independiente de la especificidad del receptor y se denominan de F1 a F13 (F1 se subdivide en antígenos F1 A, F1 B y F1 C3,5 y antígeno Fy) (Orskov y Orskov 1983). La inmunoelectroforesis cruzada consiste en la separación de la mezcla de proteínas a analizar por electroforesis en un gel de agarosa para su posterior electroforesis de las proteínas separadas en ángulo recto en una agarosa que contiene anticuerpos. Cada proteína separada durante la primera electroforesis forma un pico de precipitación separado durante la segunda electroforesis (Laine 1992).

Más tarde surgió una clasificación basada en la arquitectura de las fimbrias, la cual las clasifica en homopoliméricas y heteropoliméricas. Las fimbrias heteropoliméricas poseen una punta distal flexible y se componen de varias subunidades de diferente estequiometría como

las fimbrias de tipo 1 y fimbrias P. Este tipo de fimbrias son "monoadhesivas" ya que la subunidad de adhesina está presente en una sola copia en la parte más distal de la punta. Las fimbrias homopoliméricas están compuestas por una sola subunidad incorporada de forma múltiple y están menos estructuradas en comparación con las fimbrias heteropoliméricas. Son delgadas y se asemejan a la punta distal de las de tipo heteropolimérica. La subunidad homopolimérica también funciona como adhesina, siendo "poliadhesisivas" por ejemplo las fimbrias Dr y AFA-III (Zavialov *et al.*, 2010).

La clasificación de las fimbrias es el resultado de una combinación de genética, bioquímica y estructura que ha llevado a una clasificación basada en los sistemas de secreción y ensamblaje involucrados en su biogénesis (Fronzes *et al.* 2008). Aunque existan diversos esquemas de clasificación como los antes mencionados, el mejor criterio para la clasificación se conoce como raíces y propiedades filogenéticas (Nuccio y Bäumlner 2007).

Las fimbrias como herramientas de diagnóstico e inmunización

Las fimbrias son inmunogénicas generando respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células (Levine *et al.* , 1994). Su interacción continua con defensas del huésped las ha sometido a una fuerte presión selectiva, con equilibrio entre la necesidad funcional y la máxima diversidad inmunológica (Kleem 1985).

Existe una gran variedad de antígenos fimbriales diferentes, dentro de la familia de las enterobacterias y muchas reacciones cruzadas entre fimbrias de diferentes géneros, además pueden contener varios dominios de epítomos separados. En estudios que utilizaron aislados clínicos de *Neisseria* (Brinton *et al.*, 1982) así como de *E. coli* (Gillies y Duguid 1958) (Rene *et al.*, 1982), los anticuerpos generados contra las fimbrias de un serotipo, mostraron una débil reacción cruzada con las fimbrias de otros serotipos, lo que indica la presencia de epítomos compartidos.

Una misma cepa bacteriana puede poseer varios antígenos fimbriales simultáneamente siendo esta variación antigénica un atributo importante que les permiten evadir las defensas del huésped (Klemm 1985). Existen regiones hipervariables, de dónde aparece esta variación antigénica como las fimbrias F4 y fimbrias P, que muestran variaciones que implican inserciones y deleciones, así como cambios en una sola base en regiones específicas del gen estructural (Hagblom *et al.*, 1985) .

En un inicio se pensaba que las fimbrias eran antígenos capsulares y eran denominados con la letra K más tarde para evitar que se confundieran ambos antígenos, los antígenos K88, K99 y 987P se denominaron antígenos F4, F5 y F6 respectivamente en la nomenclatura de antígenos fimbriales de *E. coli* (Orskov y Orskov 1983). Estos antígenos fimbriales son diferentes antigénicamente e importantes en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica porcina. Los antígenos F5 y F41 también actúan como antígenos adhesivos en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica bovinas y ovinas (Gaastra y Graaf 1982).

El primer antígeno adhesivo descrito en cepas aisladas de *Escherichia coli* fue el antígeno F4 (Orskov *et al.*, 1961) y se demostró una asociación entre las cepas que lo expresan con una mejor capacidad de proliferar en intestino delgado (Moon *et al.*, 1980) también se ha visto que en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica son antígenos fuertemente inmunogénicos que pueden usarse para producir inmunidad (Bakker *et al.*, 1990).

Años más tarde Vazquez y cols. en 1996 describieron el desarrollo y evaluación de un método ELISA para la detección y cuantificación de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno fimbrial F4 de *E. coli* enterotoxigénica porcina, para determinar la eficacia de los programas de vacunación. Demostraron que era un método específico y reproducible para la detección de anticuerpos IgG anti F4. Los resultados con sueros porcinos mostraron que el método es útil para estudios epidemiológicos sobre la potencia de las vacunas contra la colibacilosis porcina, debido a que mientras más elevados los niveles de este anticuerpo se relacionó con una menor incidencia de diarrea causada por este agente.

Por otro lado, las cepas de *E. coli* uropatógenas expresan fimbrias P (Vaisanen *et al.*, 1981) que reconocen como receptor al disacárido α -D-Gal- (1-4) - β -D-Gal (Gal-Gal) en células uroepiteliales (Leffler y Svanborg-Edén 1980). Estas fimbrias P difieren en los pesos moleculares de sus proteínas subunitarias (Jann *et al.*, 1981) y en sus propiedades serológicas (Orskov y Orskov 1983), sus varios serotipos diferentes y sus diferencias serológicas son resultado de la variación estructural dentro del dominio central de la subunidad principal (Lund *et al.*, 1988).

Las fimbrias P y las fimbrias tipo 1 actúan en conjunto para facilitar la colonización, y enfrentar obstáculos como el flujo urinario. De esta manera, también juegan un rol en la infección del riñón (Melican *et al.*, 2011). Se ha demostrado que las fimbrias P utilizan la vía dependiente de receptores Toll tipo 4 para desencadenar inflamación de mucosa (Frendéus *et al.*, 2001), induciendo la secreción de citocinas por las células uroteliales y reclutamiento de neutrófilos a superficies mucosas para la eliminación de bacterias (Svanborg *et al.*, 2006).

Parry y cols. en 1982 informaron siete determinantes antigénicos diferentes en fimbrias de *E. coli* uropatógena mediante el uso de una prueba de aglutinación en portaobjetos y los designaron de la “a” a la “g”. Un año después Orskov y Orskov en 1983 distinguieron ocho fimbrias serológicamente diferentes en aislados clínicos de *E. coli* uropatógena utilizando técnicas de inmunolectroforesis cruzada y propusieron que estas fimbrias se denominaran antígenos F (F7 a F12).

Para la clasificación de las fimbrias P, Orskov y Orskov en 1983 utilizaron antisueros policlonales con la desventaja de no ser específicos para cada tipo de fimbria P, como demostró de Ree *et al.* 1986 en estudios ELISA. Sin embargo pudieron utilizar estos antisueros policlonales en inmunolectroforesis cruzada e inmunolectroforesis de línea cruzada para discriminar entre fimbrias serológicamente diferentes. Este esquema de tipificación de las fimbrias P se amplió mediante la clasificación de las fimbrias asociadas a pielonefritis como fimbrias F13 (Lund *et al.*, 1988).

En 1986 de Ree y cols. analizaron anticuerpos monoclonales contra siete fimbrias P de *E. coli* uropatógena serológicamente diferentes (F7 (1), F7 (2), F8, F9, F11, F12 y F13) con la intención de determinar su capacidad de detección de estas fimbrias en animales silvestres. Compararon tres métodos diferentes: una prueba de aglutinación en placa, una prueba de coaglutinación con *Staphylococcus aureus* como portador de anticuerpos monoclonales y una prueba ELISA con bacterias completas como antígeno. Una comparación de estos tres métodos demostró que mediante ELISA de bacterias completas era el mejor método para la detección de fimbrias P y se extendió la posibilidad de realizar estudios epidemiológicos sobre la distribución de fimbrias P entre cepas de *E. coli* de tipo silvestre.

Existe un estudio similar de Moser y cols. en 1986 donde describen un anticuerpo monoclonal contra el antígeno fimbrial F8 de *E. coli*, perteneciente a las fimbrias P. Este anticuerpo fue analizado mediante ELISA y transferencia de colonias para detectar reacciones cruzadas contra fimbrias de cepas de *E. coli* que expresan antígenos F8. La reactividad del anticuerpo monoclonal en ELISA así como en la transferencia de colonias y la inmunotransferencia indicó que el anticuerpo específico de F8 reconoce un epítipo expresado en la superficie.

Otras dos fimbrias de importancia no caracterizadas, son Yad e Ygi, que contribuyen a la colonización. Estas fimbrias son objetivos potenciales para ser utilizadas en la terapéutica, ya que las fimbrias Yad e Ygi están presentes en la mayoría de *E. coli* uropatógenas y no se expresan en cepas comensales (Spurbeck *et al.*, 2011).

Vacunas

La secuenciación completa de múltiples genomas bacterianos ha proporcionado información sobre un gran número de diferentes tipos de genes condificantes para adhesinas, esto sugiere que no existe una sola ruta para la adhesión bacteriana (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006). La alteración de la adhesión y colonización bacteriana con la ayuda del desarrollo de vacunas y anticuerpos específicos anti adhesina pueden desarrollarse como una forma de incapacitar a las bacterias.

A través de los años diversos estudios han demostrado que las adhesinas brindan protección en modelos animales utilizándolas en vacunas a base de proteínas. Por ejemplo se han empleado proteínas purificadas de fimbrias donde evaluaron la eficacia de vacunas de fimbrias resistentes a manosa y fimbrias Gal-Gal en un modelo de pielonefritis murina. Sus resultados indicaron que las fimbrias Gal-Gal son candidatos atractivos para la inmunopprofilaxis de pielonefritis en pacientes sin anomalías anatómicas del tracto urinario (O'Hanley *et al.*, 1985). En 1987 un estudio analizó el suero de cuatro pacientes con síntomas de pielonefritis y encontraron la presencia de anticuerpos contra fimbrias P, a diferencia de las muestras de suero control, en las que no pudieron detectar anticuerpos antifimbrias, lo que sugirió que las fimbrias P se expresaron durante la infección, además proporcionaron una fuerte evidencia de que las fimbrias P de *E. coli* se expresan *in vivo* (de Ree y van den Bosch 1987). Posteriormente un experimento en el que se administró *E. coli* con fimbrias P y suspensiones ricas en residuos Gal-Gal a través de la uretra, disminuyó la uretritis, respecto al grupo que recibió sólo la bacteria. Estos resultados sentaron las bases para estudios en los que utilizando estos receptores junto a seroalbúminas bovinas, pudieran incrementar su poder antigénico y sintetizar anticuerpos monoclonales contra éstos. Más adelante fueron inoculados en Macacos cangrejeros (*M. fascicularis*) para obtener anticuerpos antiidiotípicos que mimetizaran a los receptores Gal-Gal. Este estudio demostró que competían con los verdaderos receptores Gal-Gal al inocular *E. coli* con fimbrias P en los monos del grupo experimental, que no sufrieron daños renales (Kaack *et al.*, 1993).

Se ha visto que la inmunización con fimbrias P purificadas de *E. coli* es capaz de prevenir o modificar los efectos de una exposición renal posterior con las mismas cepas (Roberts *et al.*, 1984) o heterólogas (Roberts *et al.*, 1989). Sin embargo, la preparación de fimbrias purificadas en estos estudios contenía endotoxina bacteriana y aunque la presencia de la endotoxina en la preparación de la vacuna fimbrial no inhibió la protección contra el desafío infeccioso, se produjeron anticuerpos contra endotoxina y fimbrias P.

En otro estudio dónde se utilizaron fimbrias P purificadas para vacunar monos, obtuvieron protección contra infecciones del tracto urinario inducidas experimentalmente por cepas heterólogas de *E. coli* con fimbrias P (Svenson *et al.*, 1984). A pesar de la heterogeneidad antigénica entre las fimbrias P, demostraron que existe homología y que era posible que una vacuna basada en pocos tipos representativos de fimbrias P pueda ser eficaz contra la mayoría de las cepas uropatógenas de *E. coli* (Klemm 1985).

Estudios más recientes (Mortezaei *et al.*, 2013) han utilizado anticuerpos policlonales producidos contra fimbrias P de *E. coli* uropatógena, demostrando que los anticuerpos interfieren con su polimerización. Los datos mostraron una extensión y retracción comprometidas en presencia de los anticuerpos y una elasticidad fimbrial reducida. Los anticuerpos usados en estos experimentos al ser policlonales, no limitan su unión a un solo epítipo dando la capacidad de unirse de manera que bloqueen distintas regiones de la fimbria.

Las fimbrias F4 son inmunogénos potentes, una inmunización oral de lechones destetados con fimbrias F4 purificadas induce una respuesta inmune específica que protege a los animales a una infección posterior a la exposición de *E. coli* enterotoxigénica con este tipo de fimbrias (Van den Broeck *et al.*, 1999a; Van den Broeck *et al.*, 1999b; Verdonck *et al.*, 2004b; Takeyama *et al.*, 2015). En cambio la vacunación oral de otro tipo de fimbrias como la F18 en cerdos destetados, no es capaz de producir una respuesta significativa de anticuerpos séricos, ni reducir la colonización de *E. coli*. Sin embargo en Canadá, la vacuna viva de *E. coli* F4 se ha comercializado y se ha demostrado que protege a los cerdos de la infección por *E. coli* enterotoxigénica (Melkebeek *et al.*, 2013; Kolotilin *et al.*, 2012). Se han identificado las variantes antigénicas F18, F18ab y F18ac, esta última se ha relacionado con frecuencia con la diarrea post destete, mientras que la variante F18ab se ha asociado más con la enfermedad del edema porcino (Rippinger *et al.*, 1995).

Foged y cols. en 1986 utilizaron fimbrias F4ab, F4ac y F4ad derivadas de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica implicadas en colibacilosis porcina para inmunizar ratones BALB / c. En este estudio lograron producir hibridomas que secretaban anticuerpos monoclonales contra los tres subtipos intactos de fimbrias F4 mediante la fusión de células del bazo de estos ratones con células de mieloma. También observaron un efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales anti F4 administrados por vía oral en lechones recién nacidos infectados experimentalmente con *E. coli* F4. Algo que ya se había demostrado previamente por Sherman y cols. en 1983 quienes observaron que la administración oral de anticuerpos monoclonales reduce la tasa de mortalidad en terneros causada por *E. coli* enterotoxigénica F5 y la mencionan como una forma eficaz de reducir la pérdida económica para los propietarios de ganado en caso de brotes de colibacilosis entérica en rebaños no vacunados.

En 1987 Krogfelt y cols. llevaron a cabo un estudio para la identificación de determinantes antigénicos con péptidos sintéticos de la secuencia de las principales subunidades fimbriales F4, para esto inocularon conejos y los sueros anti péptidos se analizaron mediante ELISA y ELISA sándwich, sus resultados indicaron que no se indujo la formación de anticuerpos contra la fimbria nativa, indicaron que los epítipos F4 son epítipos conformacionales. Por tanto, asumieron que estas regiones no representan determinantes antigénicos en las proteínas F4 nativas. Más tarde también se desarrolló una vacuna de secuencia consenso de péptidos sintéticos que se dirige al dominio de unión al receptor del huésped de la fimbria tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa*, mostró una mayor protección contra la exposición en ratones a cuatro cepas fimbriadas (Kao *et al.*, 2007). Se observó que los anticuerpos producidos contra un péptido sintético derivado del dominio de unión al receptor del huésped de la fimbria tipo

IV, pueden proporcionar protección contra el desafío por parte de la cepa de la que se derivó la secuencia, pero una protección más débil contra el desafío con cepas heterólogas.

Se ha visto que una vacuna a base de fimbrias F4 y F5 proporciona inmunidad calostroal contra la enterotoxigenia neonatal por *E. coli* (Hur y Lee 2012). Los anticuerpos del calostro, especialmente IgA, se pueden inducir eficazmente mediante la administración oral de antígenos fimbriales que activan los tejidos linfoides asociados al intestino de las cerdas (Doggett y Brown 1996).

La cepa de *Escherichia coli* de adhesión difusa expresa fimbrias de la familia Afa / Dr, incluidas las fimbrias AfaE-I, AfaE-III, Dr, Dr-II y F-1845 (Nowick *et al.*, 2001). Las bacterias Dr positivas pueden interactuar y unirse a enterocitos. Reconocen como receptor el factor de aceleración de la descomposición de las proteínas ancladas a GPI, antígeno carcinoembrionario (CEA, CD66e) y la molécula de adhesión celular relacionada con CEA 6 (CEACAM6), y también la molécula de adhesión celular relacionada con CEA molécula de adhesión celular 1 (CEACAM1) en células epiteliales humanas (Servin *at al.*, 2005; Nowicki *et al.*, 1993). Es por esta importancia que existen estudios centrados en el antígeno fimbrial Dr de *E. coli* el cual ha sido utilizado para generar protección contra infecciones del tracto urinario en ratones después del desafío con una cepa que expresa la adhesina Dr (Goluszko *et al.*, 2005). El resultado fue una disminución en la mortalidad asociada con la infección experimental de los ratones. Los sueros inmunes con títulos elevados de anticuerpos anti Dr inhibieron la unión bacteriana a los riñones y vejiga, pero no modificaron la tasa de colonización renal (Goluszko *et al.*, 2005).

Las fimbrias tipo 1 contienen la proteína adhesina FimH, en el estudio de Langermann y cols. de 1997, los sueros de animales vacunados con vacunas FimH pudieron impedir la unión de *E. coli* uropatógena a las células de vejiga *in vitro*. La inmunización con FimH redujo la colonización *in vivo* de la mucosa de la vejiga en más del 99% en un modelo de cistitis murina, además de proteger contra la colonización y la enfermedad por cepas uropatógenas de *E. coli* capaces de expresar múltiples adhesinas. Se reportó la detección de IgG específica para FimH en la orina de los ratones protegidos y tres años después publicaron otro estudio donde inmunizaron 4 monos con 100 mg de complejo de adhesina-chaperona FimCH mezclado con adyuvante MF59, demostraron ser una alternativa eficaz previniendo infecciones del tracto urinario por *E. coli* uropatógena. Estos hallazgos sugieren que una vacuna basada en la adhesina FimH de la fimbria de *E. coli* tipo 1 puede tener utilidad para prevenir la cistitis en humanos. También se encontró que anticuerpos IgG contra FimH estaban presentes en las secreciones vaginales, y el nivel de anticuerpos en las secreciones aumentó junto con los niveles plasmáticos de IgG contra FimH después de las inmunizaciones de refuerzo.

Wellens y cols. en 2008 igualmente se centraron en la proteína FimH y trabajaron con inhibidores basados en α -D-manosa, demostrando su capacidad de bloquear la adhesión bacteriana a células uroepiteliales, y de antagonizar la invasión y formación de biopelículas.

Es importante señalar que se pueden diseñar dos tipos de vacunas en función de la arquitectura de las fimbrias tipo I para prevenir la colonización de patógenos. El primer tipo consta de vacunas dirigidas a los antígenos de adhesión de la fimbria para bloquear la interacción adhesina receptor, y la segunda opción consiste en dirigirse a los antígenos encargados de las propiedades elásticas y de resiliencia durante el arrastre por fluidos (Ramezanalizadeh *et al.*, 2020).

- **Vacunas contra *Salmonella***

Salmonella Enteritidis es una de las principales causas de intoxicación alimentaria, por lo que se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar vacunas eficaces para la prevención de la colonización e infección en aves de corral (Ishida *et al.*, 2018).

El principal objetivo de vacunar a gallinas ponedoras es reducir o prevenir la contaminación de los huevos, ya que la infección bacteriana en los órganos reproductivos de las gallinas puede causar la contaminación de estos a través de la yema o la albúmina, la respuesta inmune juega un papel esencial en la prevención de la infección por *Salmonella* en los órganos reproductivos (Yoshimura 2004).

Se utilizan 3 tipos principales de vacunas: vacunas vivas atenuadas, mediante bacterias muertas (bacterinas) y vacunas de subunidades (Babu *et al.*, 2004; Gast *et al.*, 1993; Woodward *et al.*, 2002). Estudios han sugerido que las vacunas vivas atenuadas son más efectivas que las bacterinas para proteger a las aves de la infección por *Salmonella* Enteritidis, sin embargo debido a los riesgos potenciales asociados con el uso de vacunas vivas atenuadas, como la reversión a la virulencia, esta opción no es considerada en muchos países, de ahí la necesidad de seguir estudiando la eficacia de las bacterinas (Tran *et al.*, 2010). También se han evaluado vacunas contra *Salmonella* a base de fantasmas bacterianos (Hajam *et al.* 2017) que consisten en la envoltura bacteriana vacía generada mediante métodos químicos o de ingeniería genética para inducir la liberación del contenido celular (Chen *et al.*, 2021) y logrando inducir IgG e IgA específicas, inmunidad celular con aumentos en las células T CD4⁺ y CD8⁺ y reducción de la contaminación del huevo (Ishida *et al.*, 2018).

La mayoría de las investigaciones sobre estas vacunas han estudiado la tasa de recuperación de la bacteria en recuentos de hisopos cloacales posterior a la vacunación y solo unos pocos han estudiado la respuesta inmune obtenida, estos estudios se limitaron a pollos jóvenes menores de 4 semanas de edad (Atterbury *et al.*, 2009; Gantois *et al.*, 2006; Deguchi *et al.*, 2009; Penha Filho *et al.*, 2009) y no está claro si se pueden mantener niveles suficientes de protección hasta el final de un período de puesta prolongado.

Vacunas atenuadas

Se han propuesto vacunas vivas atenuadas para generar una mejor protección y son adecuadas para la vacunación masiva que las vacunas inactivadas (Tang *et al.*, 2019). Este tipo de vacunas están disponibles en todo el mundo para su uso en aves de corral y su uso se ha favorecido ya que provocan respuestas inmunitarias tanto mediadas por células como humorales proporcionando inmunidad protectora (Desin *et al.*, 2013).

Los microorganismos vivos suelen ser atenuados por pases seriados en cultivo celular o por la desactivación selectiva de genes involucrados con la patogénesis y/o supervivencia del patógeno (Galen *et al.*, 2016). La eliminación específica de genes asociados con la virulencia puede ayudar a generar vacunas vivas atenuadas (Ran *et al.*, 2018) y esto a menudo se logra mediante la ingeniería genética de un mínimo de dos deleciones cromosómicas independientes de genes involucrados en vías bioquímicas esenciales para el metabolismo y la proliferación bacteriana. Generalmente, se considera que los mutantes de deleción de genes completos son

menos capaces de reversión a un fenotipo virulento en comparación con las cepas que albergan mutaciones puntuales o alteraciones genéticas indefinidas (Kilroy *et al.*, 2016). Sin embargo, la inactivación de demasiados genes críticos, o la selección inapropiada de objetivos, puede originar candidatos a vacunas que no consigan colonizar un huésped lo suficiente como para obtener una protección prolongada (Galen *et al.*, 2011). La atenuación excesiva de una vacuna, puede resultar en un organismo no reactogénico que requerirá la administración de múltiples dosis orales para lograr inmunidad protectora (Galen *et al.*, 2016). A pesar de esto los mutantes de delección genética dirigida son prometedores para futuras vacunas, porque se pueden eliminar funciones bacterianas específicas que pueden mejorar la seguridad y permitir la diferenciación de las cepas de campo (Kilroy *et al.*, 2016).

Se han propuesto varias cepas atenuadas vivas de *Salmonella*, incluidos los mutantes atenuados auxotróficos, metabólicos y estructurales como vacunas eficaces para animales. Estas vacunas a menudo no son lo suficientemente seguras ya que pueden liberar microorganismos genéticamente modificados al medio ambiente y a la cadena alimentaria humana, y pueden interferir en las pruebas de diagnóstico serológicas (Román *et al.*, 2012).

A principios de la década de 1980 se supo que los mutantes de *Salmonella* auxotróficos para aminoácidos aromáticos han reducido su virulencia. Desde entonces, las mutaciones en los genes que codifican la biosíntesis de aminoácidos aromáticos se han utilizado con frecuencia para reducir la virulencia de diferentes serovariedades de *Salmonella* (Sebkova *et al.*, 2008). La eliminación de genes *aroA*, *aroC* y *aroD* produce bacterias que son auxótrofas para el ácido para-aminobenzoico (PABA) y 2,3-dihidrobencato. Cuando se administran a ratones, mutantes *aro* de *Salmonella* son incapaces de capturar suficiente PABA y dihidrobencato para replicarse (Hoiseith *et al.*, 1981). También se ha demostrado que la atenuación de los mutantes *aro* puede ser causada por defectos en la integridad de la pared celular y la membrana externa y generar más susceptibilidad a los diferentes componentes de la respuesta inmune innata (Sebkova *et al.*, 2008). Estas bacterias independientemente de la serovariedad de *Salmonella enterica*, son sensibles a la destrucción por complemento, la albúmina, ovotransferrina y el EDTA, lo que indica un defecto de biosíntesis de la envoltura celular (Sebkova 2008), y se utilizan con frecuencia como vacunas vivas para la vacunación oral de animales domésticos (Malcova *et al.*, 2009). Estos mutantes dependen de la presencia de aminoácidos aromáticos cuando se cultivan *in vitro*, estos aminoácidos no están disponibles gratuitamente en un huésped.

También existen mutantes estructurales, dado que el lipopolisacárido es un factor de virulencia importante, los mutantes de *Salmonella* que carecen de este (mutantes rugosos) representan un enfoque interesante para desarrollar vacunas vivas atenuadas (Mastroeni *et al.*, 2001). De igual forma conseguir que el lípido A no sea tóxico puede proporcionar un medio para aumentar de forma segura la dosis y reducir el nivel de atenuación para facilitar la inducción de una respuesta robusta al antígeno (Kong *et al.*, 2011).

Kong y sus compañeros en 2011 redujeron la reactogenicidad de las vacunas orales atenuadas de *Salmonella* modificando genéticamente el lipopolisacárido para disminuir la actividad endotóxica. Las cepas vacunales candidatas resultantes tuvieron una virulencia disminuida, y pudieron conferir protección en un modelo de ratón contra el desafío con *Salmonella* virulenta. Estas cepas también podrían modificarse más para presentar antígenos extraños de patógenos humanos no relacionados y conferir protección contra el desafío heterólogo.

Existen estudios de la eficacia de las vacunas vivas atenuadas de *Salmonella* Enteritidis (Arnon *et al.*, 1983; Barrow *et al.*, 1990; Atterbury *et al.*, 2010; Methner *et al.*, 2011) demostrando su eficacia, sin embargo se menciona el peligro de estas debido a la virulencia residual causada por una atenuación insuficiente, reversión a virulencia y seguridad incierta (Barbezange *et al.*, 2000). En 2018 McWhorter y Chousalkar sugirieron que la persistencia a largo plazo de una vacuna viva de *Salmonella* en el hospedador es importante para la transferencia horizontal de la cepa de la vacuna dentro de una parvada. Methner y cols. en 2011 informaron que una mutante de *Salmonella* Enteritidis con una doble delección en *phoP* y *fliC*, induce una elevada respuesta inmune adaptativa y protección contra la exposición a *Salmonella* en pollos viejos, lo que sugiere que podría ser un candidato prometedor para vacunas de *Salmonella* viva.

Varias condiciones estresantes pueden causar daño y plegamiento incorrecto de las proteínas, y se ha observado que esto representa una amenaza para la bacteria. La degradación de proteínas anormales depende de proteasas como Lon y el complejo proteolítico Clp (Wickner *et al.*, 1999). La proteasa codificada por *clpP* participa en la proteólisis de proteínas anormales que se acumulan bajo estrés y regula varias proteínas reguladoras, incluido el factor sigma de fase estacionaria RpoS (Gur *et al.*, 2011). Ran y cols. en 2018 confirmaron que *Salmonella* Enteritidis con una mutación en *clpP* es altamente sensible a altas concentraciones de sal y acidez, lo que resulta en un crecimiento deficiente, estos mutantes tienen una transcripción regulada negativamente de la isla de patogenicidad 1 y 4. Las gallinas ponedoras vacunadas con tales vacunas vivas atenuadas de *Salmonella* Enteritidis pueden eliminar las bacterias al medio ambiente, que pueden ser inactivadas por los desinfectantes convencionales para proteger el medio ambiente.

Knudsen y sus colegas en 2014 evaluaron la importancia de la proteína CsrA y la proteasa ClpP en la capacidad de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium a baja temperatura, demostrando que CsrA es esencial para la adaptación al crecimiento a baja temperatura, mientras que el crecimiento deficiente del mutante *clpP* está asociado con el efecto de niveles elevados de RpoS.

Es importante mencionar que existen vacunas diseñadas genéticamente con mutaciones en *rpoS* ya que participa en la adaptación al estrés ambiental, incluido su papel en la respuesta de tolerancia al ácido y regulando la síntesis del polisacárido capsular Vi (Galen *et al.*, 2016). El regulón PhoP / PhoQ es un sistema regulador de dos componentes que controla la transcripción de múltiples genes. PhoP es un regulador transcripcional citoplasmático y PhoQ es una cinasa sensor asociada a la membrana (Groisman 2001). Este operón contribuye a la supervivencia dentro de los macrófagos y la resistencia a péptidos antimicrobianos. Los mutantes de *phoP* en *Salmonella* son avirulentos y pueden inducir una respuesta inmunitaria protectora en ratones (Galán y Curtiss 1989).

Las vacunas vivas comerciales actuales contienen cepas que albergan mutaciones indefinidas en uno o más genes en el cromosoma o mutaciones puntuales definidas. Sin embargo, las cepas que albergan mutaciones puntuales podrían volver a un fenotipo virulento y por lo tanto, se consideran inseguras (Kilroy *et al.*, 2016).

La vacuna Salmovac cepa 440 se ha derivado a través de mutagénesis química de *Salmonella* Enteritidis PT 4 que no contiene genes de resistencia antimicrobiana pero contiene mutaciones puntuales que resultan en auxotrofismo para histidina y adenina. Los aislados de campo de *Salmonella* Enteritidis se diferencian de la cepa de la vacuna al crecer en medios mínimos con y sin histidina y adenina. En cuanto a la vacuna AviPro de *Salmonella*

consiste en una cepa mutante metabólica derivada por mutagénesis química de *Salmonella* Enteritidis PT4. Seleccionada de acuerdo a criterios de atenuación, como son tiempo de generación prolongado, sensibilidad a quinolonas e incremento de la permeabilidad de la membrana bacteriana. Es capaz de sobrevivir el tiempo suficiente dentro del ave para generar una respuesta inmune, pero es incapaz de sobrevivir en el medio ambiente. Vacunas de *Salmonella* vivas derivadas por mutagénesis química o rayos ultravioleta son inmunogénicas y protectoras, todavía están en uso a pesar de su necesidad de administración parenteral repetida (Mastroeni *et al.*, 2001).

Las vacunas de *Salmonella* atenuadas recombinantes pueden administrar antígenos de una variedad de patógenos diferentes, generando un rango de respuestas inmunes que incluyen anticuerpos séricos, IgA mucosa y respuestas inmunes mediadas por células en sitios locales y distales (Atkins *et al.*, 2006).

Otra ventaja de algunas vacunas vivas atenuadas es vacunar oralmente a los pollitos desde el primer día de vida después de la eclosión, permitiendo un doble mecanismo de protección al aumentar la inmunidad de la mucosa y generar una competencia bacteriana específica contra cualquier cepa de *Salmonella* silvestre (Kilroy *et al.*, 2015).

Las vacunas vivas atenuadas, si se administran por vía oral, demuestran una protección rápida frente a infecciones (Barrow *et al.*, 2007). Además permiten administrar antígenos recombinantes a las superficies mucosas induciendo una respuesta inmune protectora contra una variedad de patógenos (Roland y Breneman 2013). La cepa atenuada coloniza la mucosa intestinal y otros tejidos linfoides para provocar inmunidad de mucosas y sistémica (Maddux *et al.*, 2017).

La inmunización oral con mutantes de *Salmonella* Enteritidis sensibles a la temperatura confirió protección contra diferentes serotipos de *Salmonella* y la protección cruzada duró 2 meses, fue significativa para dosis de desafío altas. El análisis de sueros de animales inmunizados mostró anticuerpos contra LPS homólogos y contra antígenos protéicos homólogos y heterólogos (Gherardi *et al.*, 2000).

Vacunas inactivadas

Las vacunas comerciales disponibles contra *Salmonella* Enteritidis son en su mayoría inactivadas, aunque son menos efectivas que las vacunas vivas atenuadas para producir una amplia inmunidad por serogrupos, se ha demostrado que las bacterinas reducen la colonización de *Salmonella* Enteritidis en huevos y en el ciego de las aves (Woodward *et al.*, 2002; Gast 1993). Estas bacterinas de *Salmonella* Enteritidis contienen organismos bacterianos inactivados y suspendidos en adyuvante de hidróxido de aluminio o agua en aceite. Estimulando altos niveles de anticuerpos circulantes en ponedoras comerciales, que persisten durante el período de puesta (Barbour *et al.*, 1993).

Las bacterinas proporcionan protección cruzada contra *Salmonella* Gallinarum y otros serotipos. Algunas desventajas de las bacterinas son el costo laboral de administración y el estrés posvacunación debido a la reacción tisular en el sitio de inyección, causado por la liberación de endotoxinas posterior a la metabolización del antígeno de la vacuna en las aves (Nakamura *et al.*, 1994).

Por otro lado ofrecen protección específica para distintas serovariedades y pueden producir protección prolongada (Woodward *et al.*, 2002) o de corta duración (Singh 2009). Su aplicación es capaz de reducir la eliminación de la bacteria en heces y disminuir la colonización de órganos y contaminación de huevos.

La eficacia de la vacuna se juzga por el nivel de colonización intestinal y sistémica, las tasas de morbilidad y mortalidad después de la vacunación y la infección experimental utilizando las vías de administración oral o parenteral. El nivel de protección depende de la cepa de desafío, la vía de administración, la edad del ave y la especie, la dosis de infección, línea o raza. Siendo difícil comparar con precisión la eficacia de las preparaciones de vacuna disponibles (Van *et al.*, 2005). La eficacia también se ve afectada por la composición de las bacterinas por lo que se han elaborado y estudiado vacunas a base de proteínas de membrana externa, fimbrias o proteínas inducidas por limitación de hierro (Woodward *et al.*, 2002 ; Clifton-Hadley *et al.*, 2002).

Los microorganismos son inactivados mediante procedimientos severos, como el tratamiento con etilenimina binaria. Desafortunadamente, durante la inactivación, la mayoría de los componentes inmunogénicos y estructurales de los microorganismos se desnaturalizan, lo que resulta en una función deteriorada y respuestas inmunes deficientes (Bergemann y Leitner 2014).

Se encuentra disponible en el mercado una vacuna inactivada contra *Salmonella* para la inmunización activa de gallinas y pollos. Esta vacuna se encuentra elaborada con 1×10^9 células de *Salmonella* Enteritidis PT4 inactivadas con formalina y 1×10^9 células de *Salmonella* Typhimurium DT104 . Este tipo de vacunas inactivadas contra *Salmonella* no pueden ofrecer una protección del 100%, debido a la destrucción de las células bacterianas como resultado del tratamiento con formalina. Una alternativa a esta vacuna podría ser una vacuna derivada de células fantasma resultantes del tratamiento con nanomaterial híbrido basado en nanopartículas de plata (Pencheva *et al.*, 2015).

La inmunización oral o intramuscular única con *Salmonella* Enteritidis inactivada con formalina, encapsuladas en microesferas biodegradables, a las 2 semanas de edad disminuyó la excreción fecal y la colonización de órganos, después de la infección oral con 10^9 UFC a las 6 semanas de edad (Liu *et al.*, 2001). En cambio Gast y cols. en 1993 informaron que la vacunación con bacterina en emulsión de aceite no tuvo efecto en el porcentaje de gallinas que eliminaron *Salmonella* Enteritidis en heces después del desafío oral con aproximadamente 10^9 células de *Salmonella* Enteritidis.

Más tarde Mona y cols. en 2013 realizaron pruebas de ELISA para estudiar la eficacia protectora de la vacuna adyuvante de aceite inactivada con formalina polivalente preparada contra *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis y *Salmonella* Meleagridis, en gallinas ponedoras afirmó que el título de anticuerpos contra *Salmonella* Enteritidis fue de 599.2 con un aumento gradual tercera semana posterior al refuerzo en todos los grupos vacunados con vacuna adyuvante oleosa inactivada con formalina.

Un estudio realizado por Barbour y cols. en 1993 donde comparan seis vacunas inactivadas de *Salmonella* Enteritidis, observaron disminución de la presencia bacteriana en las muestra fecales. Las seis formulaciones de bacterina de *Salmonella* Enteritidis diferían en contenido de adyuvante y procedimientos de inactivación. Los pollos que recibieron bacterinas de *Salmonella* Enteritidis que contenían adyuvante incompleto de Freund modificado tuvieron

mayores respuestas inmunes humorales a *Salmonella* Enteritidis que las aves que recibieron otras formulaciones de bacterinas ($P < 0.05$).

Estos autores sugirieron que varios factores relacionados con el tipo y composición del adyuvante, cepa de *Salmonella* Enteritidis y método de inactivación, podrían ser responsables de esta variación y podrían explicar los resultados. También indicaron que no se obtuvo una protección del 100% inmediatamente después del desafío.

Las bacterinas comerciales disponibles de *Salmonella* deben aplicarse por vía parenteral en cada ave, aumentando la mano de obra y el estrés de los animales (Renu *et al.*, 2020). Una respuesta humoral fuerte a este tipo de vacunas, depende de la vía de aplicación y la presencia de adyuvantes (Papezova *et al.*, 2008).

Vacunas de subunidades

Estas vacunas tienen la ventaja sobre otros tipos de vacunas, ya que pueden administrarse directamente a una superficie mucosa a través de administración nasal, oral u ocular y mejorar la respuesta inmune de la mucosa (Yang 2017), lo que evita el uso de agujas y jeringas, siendo una opción accesible para la vacunación masiva (Curtiss *et al.*, 2010).

Otra ventaja es su capacidad de generar protección cruzada, seguridad y bajo costo de producción. Sin embargo, numerosas vacunas de subunidades contra patógenos bacterianos no han tenido éxito ya que los cambios conformacionales en los epítomos conservados durante la preparación dan como resultado una inmunidad humoral deficiente y de corta duración (Salazar-González *et al.*, 2004). Actualmente, las vacunas vivas atenuadas y de subunidades disponibles para *Salmonella* Enteritidis se dirigen principalmente a antígenos O, proteínas de flagelina y otras proteínas de membrana externa (Tennant *et al.* 2011).

Se menciona que la vacunación de *Salmonella* basada en antígenos de subunidad para el control de la enfermedad en aves de corral proporciona una protección inmune deficiente (Han *et al.*, 2020). Sin embargo una vacuna oral subunitaria que induzca IgA mucosa y respuestas inmunes mediadas por células sería un enfoque de control eficaz para la salmonelosis en aves de corral (Renu *et al.*, 2020).

Nanovacunas

Las nanovacunas son vacunas que utilizan nanopartículas como vehículos y/o adyuvantes (Gheibi y Darroudi 2019). Se ha observado que las vacunas de nanopartículas con subunidades de proteínas inmunogénicas de membrana externa y flagelina de *Salmonella* Enteritidis inducen una respuesta inmune en pollos de engorda (Han *et al.*, 2020). La activación específica de linfocitos secretores de IFN γ indica la inducción de inmunidad tanto sistémica como de mucosa inducida por este tipo de vacunas .

La aplicación oral de vacunas de nanopartículas de polianhídrido en aves de corral, libera antígenos a los tejidos linfoides asociados al intestino (Renu *et al.*, 2018), así como las nanovacunas de *Salmonella* a base de quitosano se dirigen a las células inmunes de los pollos e induce respuestas de células B y T específicas de antígeno (Renu *et al.*, 2020). Sin embargo una de las principales limitaciones de la vacunación oral es la degradación de antígenos en el ambiente gástrico. También existen adyuvantes como los liposomas y los complejos inmunoestimulantes que potencian la respuesta inmune a las proteínas de

membrana. Las proteínas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis adyuvadas con liposomas fueron evaluadas por su eficacia protectora contra la infección en pavos (Charles *et al.*, 1994). Los resultados mostraron que arriba del 90% de los tejidos obtenidos de pavos vacunados, obtuvieron cultivos negativos de *Salmonella* Enteritidis.

- **Tecnología antígeno de fusión multiepítopo**

Las fimbrias juegan un papel importante como factor de virulencia de *E. coli* en la presentación de diarrea en cerdos lactantes (Canal *et al.*, 1999). Encontrándose en *E. coli* enterotoxigénica los antígenos fimbriales F4, F5, F6 y F41 en cuadros de diarrea neonatal en porcinos. Por lo que se ha buscado construir antígenos de fusión multiepítopo utilizando subunidades adhesivas contra la diarrea por *E. coli* enterotoxigénica (Nandre *et al.*, 2016).

Recientemente Lu y cols. en 2020 identificaron epítomos neutralizantes de las fimbrias F4 y F18, toxina termolábil, toxinas termoestables tipo I y tipo II y toxina Shiga 2e. En este estudio exploraron la plataforma de vacunación basada en epítomos y estructuras, llamada antígeno de fusión multiepítopo (MEFA), para crear vacunas contra la diarrea postdestete porcina. Esta tecnología esta basada en la estructura que utiliza un inmunógeno para presentar epítomos neutralizantes de factores de virulencia representativos (Lu *et al.*, 2019). Los anticuerpos generados en este estudio con MEFA inhibieron la adherencia de las bacterias con fimbrias F18 y F4 a las células intestinales de cerdo y también neutralizaron la toxicidad de la toxina termolábil, toxinas termoestables tipo I y tipo II y toxina Shiga 2e.

Duan y cols. en 2020 construyeron dos antígenos de fusión de múltiples epítomos que portaban, expresaban y mostraban epítomos representativos de las fimbrias de *E. coli* enterotoxigénica F4, F5, F6, F18 y F41. Para evaluar el potencial de estos antígenos como candidatos a vacunas antifimbrias generaron modelos computacionales y probaron su inmunogenicidad inmunizando ratones. El modelado computacional mostró que todos los epítomos relevantes estaban expuestos en la superficie, además la administración de los antígenos en ratones indujo con éxito cinco anticuerpos específicos de fimbria de acuerdo con los epítomos incluidos en las construcciones de MEFA.

También se desarrolló una vacuna que protege contra *E. coli* enterotoxigénica causante de la diarrea del viajero, esta vacuna es a base de bacterias muertas portadoras de antígenos fimbriales dominantes, como el antígeno CF I y CS1-CS6, así como el toxoide LT lábil al calor. Desafortunadamente, no se ha podido demostrar que alguna vacuna candidata sea eficaz en los grupos objetivo más importantes, que son los lactantes y los niños pequeños en las zonas endémicas (Svennerholm y Tobias 2008).

El inconveniente del desarrollo de vacunas para prevenir la adherencia y colonización de *E. coli* enterotoxigénica ha sido la heterogeneidad de sus adhesinas bacterianas ya que diferentes cepas producen adhesinas inmunológicamente heterogéneas (Gaastra y Svennerholm 1996).

Diagnóstico

A través de la historia se ha visto que las propiedades antigénicas de las fimbrias pueden ser importantes y útiles en el diagnóstico serológico (Duguid *et al.*, 1966). En 1958 Duguid y Campbell en colaboración con la Dra. Helen A. Wright, estudiaron las reacciones de aglutinación de sueros de 100 pacientes con fiebre o diarrea, en pruebas con bacterias fimbriadas de *Salmonella* Typhimurium. Los sueros se examinaron con fines de diagnóstico

mediante pruebas Widal que permiten demostrar la presencia de anticuerpos aglutinantes contra los antígenos flagelar y somático. Esta prueba es muy utilizada por su sencillez, sensibilidad y costo, aunque es poco específica; tiene limitaciones por reacciones antigénicas cruzadas con otras bacterias, parásitos, virus y hongos (Labañino y Rodríguez 2013). Personas inmunizadas con una vacuna que contiene antígenos fimbriales puede dar lugar a reacciones falsas positivas (Duguid y Campbell 1969).

Los ensayos de aglutinación se llevan a cabo como ensayos en portaobjetos simples o en placas de microvaloración mezclando alícuotas de bacterias y células eucariotas (Sokurenko y Hasty 1995). Aunque estos ensayos son generalmente de carácter cualitativo, con ciertas modificaciones, se puede obtener información semicuantitativa, por ejemplo, cuando se trata de estimar los niveles de fimbriación (Klemm *et al.*, 1994).

El diagnóstico basado en fimbrias se ha utilizado en *Salmonella*, análisis serológicos de las fimbrias tipo 1 han demostrado que portan antígenos aglutinantes distintos de los antígenos O, H y Vi y que se presenta una amplia distribución de los antígenos fimbriales entre las cepas de diferentes serotipos (Campbell 1961). De igual manera en 1971 Old y Payne determinaron la relación entre los antígenos de las fimbrias tipo 1 y tipo 2, mediante pruebas en las que las bacterias con un tipo de fimbrias se aglutinaron con antisuero de otro tipo. Sus resultados revelaron que las fimbrias tipo 2 y tipo 1, portan antígenos que son distintos del O y H y otros antígenos no fimbriales, y que reaccionan con anticuerpos fimbriales en pruebas serológicas de aglutinación.

En 1990 Aslanzadeh y Paulissen dieron a conocer que los anticuerpos específicos contra las fimbrias tipo 1 y tipo 3, conferían protección pasiva parcial a ratones infectados por vía oral con *Salmonella* Enteritidis. En su estudio, el uso de estos anticuerpos anti fimbrias aumentó un 60% la supervivencia de los ratones. Sus resultados indican la importancia del sinergismo entre las dos fimbrias, en el proceso de enfermedad. También se han empleado anticuerpos monoclonales para caracterizar e identificar epítomos de fimbrias tipo 1 (SEF21) de *Salmonella* Enteritidis. Investigaron la distribución de los epítomos entre salmonellas y otras enterobacterias, así como la influencia de la temperatura y medios de crecimiento sobre su expresión. Identificaron al menos cuatro grupos de epítomos diferentes en las fimbrias SEF21 de *Salmonella* Enteritidis, dos de estos grupos se asociaron con hemaglutininas fimbriales que eran comunes a todas las salmonellas analizadas o restringidas solo a *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Dublin. Estos cuatro grupos de epítomos se identificaron en las fimbrias tipo 1 de la mayoría de los serotipos de *Salmonella*, así como en las fimbrias tipo 2 no hemaglutinantes de *Salmonella* Pullorum y *Salmonella* Gallinarum y en muchas otras especies de enterobacterias. La expresión de los epítomos se vio afectada por las condiciones de crecimiento (Sojka *et al.*, 1998).

En los mismos años 90 se trabajó para desarrollar una prueba de aglutinación de látex para la identificación específica de *Salmonella* Enteritidis basada en la detección del antígeno fimbrial SEF14 y para asegurar la diferenciación de *Salmonella* Enteritidis de otras *Salmonellas* del serogrupo D estrechamente relacionadas, un segundo reactivo de látex fue utilizado para detectar un epítomo específico en el flagelo de *Salmonella* Dublin (McLaren *et al.*, 1992) (Thorns *et al.*, 1992 y 1994).

En 1958 Gillies y Duguid demostraron que las fimbrias de *E. coli* y *Shigella flexneri* contienen antígenos comunes que producen reacciones cruzadas en pruebas de aglutinación, se encontró que el género *Salmonella* posee antígenos fimbriales diferentes a *Shigela flexneri* y *E. coli* pero

que los antígenos fimbriales comunes son compartidos por salmonellas de diferentes serotipos. Por lo que si las pruebas diagnósticas de aglutinación se realizan de cultivos con presencia de fimbrias pueden obtenerse reacciones engañosas.

Años más tarde se desarrolló una prueba de aglutinación en portaobjetos para detectar *E. coli* con fimbrias P utilizando la unión de glucósidos con la estructura del receptor α -D-Galp- (1-4) - β -D-Galp a partículas. La prueba se denomina prueba de aglutinación de partículas específicas de P y su especificidad permite la detección de fimbrias P en cepas con otro tipo de fimbrias por ejemplo las fimbrias X (Möllby *et al.*, 1983). En ese mismo año Eisenstein y cols. en 1983 aislaron un anticuerpo monoclonal IgM dirigido contra fimbrias tipo 1 de la cepa CSH50 derivada de *Escherichia coli* K12. Mencionan las enormes aplicaciones que tienen estos anticuerpos en el campo diagnóstico, terapéutico y en sistemas de administración de fármacos dirigidos y no solo para las enfermedades infecciosas causadas por bacterias (Siddiqui 2010). Los anticuerpos adquiridos de manera natural, como los anticuerpos monoclonales se han utilizado para el diagnóstico y pueden tener usos terapéuticos contra la colibacilosis (Foged *et al.*, 1986).

En el estudio de Suzuki y cols. en 1988 utilizaron tres métodos inmunológicos que eran aglutinación bacteriana, inmunodifusión de Ouchterlony y análisis de inmunotransferencia, utilizando sueros antifimbrias y antifimbrilina de conejo, para la detección de fimbrias en *Bacteroides gingivalis*. Reportaron que el análisis de inmunotransferencia fue el más confiable y sensible. Se explica que las bandas inmunorreactivas se pudieron comparar con las de las fimbrias purificadas con respecto a la velocidad de migración en la electroforesis en gel. Los métodos tradicionales como la aglutinación bacteriana y la inmunodifusión de Ouchterlony son más simples de llevar a cabo, sin embargo los dos métodos tienden a dar resultados falsos negativos para las fimbrias de *B. gingivalis*, se sugiere que probablemente es debido a la presencia de un disminuido número de fimbrias.

La mayoría de las cepas de *E. coli* enterotoxigénica de rumiantes expresan antígenos fimbriales F5 y/o F41, pueden ser evidenciados por aglutinación con sueros, producidos frente a bacterias vivas o con anticuerpos monoclonales (Orskov *et al.*, 1975). La fimbria F5 fue descrita por primera vez por Smith y Linggood en 1972 como un antígeno capsular K común en cepas enterotoxigénicas de terneros y corderos. Inicialmente se denominó Kco (Smith y Linggood 1972) y posteriormente K99 (Orskov *et al.*, 1975). Existe una estrecha correlación entre la expresión del antígeno F5 y la producción de enterotoxinas (Guinee y Jansen 1979) por lo que la detección de este antígeno se ha empleado como un método indirecto para la detección de estas cepas en ganado bovino.

También fue desarrollada una tecnología de producción de sueros policlonales para el diagnóstico serológico de *E. coli*, a partir de cepas que expresaban fimbrias F4, F5, F41 y 987P (Talavera 1983; Talavera y Montes de Oca 1987). La expresión de las fimbrias F4 se ha determinado en muestras de cultivo de cepas que portaban plásmidos F4 recombinantes utilizando el método ELISA con antisueros policlonales y monoclonales producidos contra fimbrias F4ab nativas (Bakker *et al.*, 1990).

Entre los métodos más utilizados para realizar el diagnóstico de colibacilosis en cerdos lactantes, se encuentra el aislamiento bacteriológico de *E. coli* y su identificación de fimbrias y toxinas presentes, esta metodología requiere de un período de tiempo y está sujeto además a las condiciones de cultivo (Canal *et al.*, 1999). La identificación de fimbrias de *E. coli* en

cuadros de diarrea permite realizar diagnósticos de cepas enteropatógenas para su tratamiento (Fairbrother 1994; Nystrom 1994).

Se han utilizado pruebas de ELISA para diagnosticar enfermedades infecciosas por *E. coli* enterotoxigénica (Mills *et al.*, 1982; Hernández *et al.*, 1989) el método ELISA ha sido útil demostrando la variación en los niveles de IgG anti F4 en cerdas vacunadas y sin vacunar, y se observó que el número de dosis administradas no mejora los niveles de IgG contra el antígeno F4, se piensa que podría ser necesaria una reinoculación para mantener los niveles de IgG protectores contra el antígeno F4 (Vazquez *et al.*, 1996).

Van Zijderveld y cols. en 1990 caracterizaron el complejo de antígenos F4 mediante el uso de un panel de 40 anticuerpos monoclonales específicos de F4. La especificidad de todos los anticuerpos monoclonales se demostró mediante ensayos de inmunoabsorción, pruebas de aglutinación, radioinmunoprecipitación y microscopía inmunoelectrónica. Los anticuerpos reaccionaron con todos los subtipos de F4 (F4ab, F4ac y F4ad). Para la producción de anticuerpos específicos del subtipo F4, los antisueros deben absorberse con mezclas crudas de antígenos para eliminar los anticuerpos de reacción cruzada (Parry y Porter 1978). El análisis de epítomos con ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de competición reveló 11 grupos de epítomos en el complejo de antígeno F4. Todos los anticuerpos monoclonales se dirigieron contra epítomos conformacionales ubicados en las subunidades fimbriales principales. Este tipo de epítomos son dependientes de la configuración de la subunidad o de la estructura cuaternaria de todo el filamento fimbrial (van Zijderveld *et al.*, 1990).

Las pruebas de ELISA también se han utilizado para detectar anticuerpos circulantes contra fimbrias F5, donde se han probado dos métodos de purificación de fimbrias. Los mejores resultados en cuanto a pureza del antígeno F5 se obtuvieron siguiendo el método descrito por Karkhanis y Bhogal 1986. Este procedimiento incluyó un choque térmico a 65 ° C durante 25 minutos para lograr la liberación de las fimbrias y pasos de ultracentrifugación para purificar el antígeno. Una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico mostró una banda principal de 18 KDa, identificada como el antígeno F5 después de la inmunotransferencia contra antisueros de referencia. Posteriormente el antígeno purificado se adsorbió en las microplacas de ELISA (Smith *et al.*, 1994). La participación biológica de este antígeno fimbrial es mediar la adherencia específica al epitelio intestinal porcino, que junto con la capacidad de producir enterotoxinas, constituyen las propiedades patogénicas principales de las cepas enterotoxigénicas no invasivas involucradas en la colibacilosis (Gaastra y de Graaf 1982).

Conclusión

Las bacterias patógenas han desarrollado estrategias para evitar el reconocimiento del sistema inmunitario del huésped. El fracaso de las vacunas para eliminar por completo a *Salmonella* de las aves de corral puede deberse a la prevalencia y distribución de los serogrupos de *Salmonella* no cubiertos por las vacunas y a la disminución de la inmunidad de las aves con la edad. Sin embargo la vacunación contra *Salmonella* debe utilizarse junto con otras medidas de control y no como el único manejo en las aves de corral (Dórea *et al.*, 2010).

La vacunación de animales con antígeno fimbrial, protege eficazmente de infecciones de vejiga o riñón debido a cepas de *E. coli*. Las fimbrias son inmunógenos que pueden usarse en preparaciones total o parcialmente purificadas con fines de inmunización consiguiendo resultados significativos. La interacción existente entre el antígeno fimbrial y el anticuerpo

correspondiente puede ser capaz de neutralizar enfermedades y emplear anticuerpos monoclonales puede mejorar la especificidad y eficiencia para ser utilizada en el área médica para acelerar procedimientos de diagnóstico.

Es un campo de interés para la medicina veterinaria las posibles aplicaciones de los anticuerpos monoclonales para el desarrollo de ensayos de diagnóstico específicos y para la inmunización pasiva contra enfermedades infecciosas. El poder dirigirse contra epítomos individuales, ser homogéneos, altamente específicos y tener la capacidad de producirse en cantidades ilimitadas, los convierte en herramientas útiles para el diagnóstico de enfermedades animales y caracterización antigénica.

Los avances en el estudio de las fimbrias son la suma de múltiples esfuerzos, que han permitido entender mejor aspectos relacionados como son sus mecanismos de ensamblaje. Sin embargo el trabajo futuro aún debe dilucidar detalles moleculares presentes en sus mecanismos de ensamblaje y vías de señalización entre bacterias y huésped, con el fin de que se sigan impulsando esfuerzos para desarrollar cada vez más y mejores terapias centradas en las fimbrias, que puedan interrumpir su ensamblaje o función, y representar una alternativa al uso de antibióticos.

REFERENCIAS

1. Albers, S. V., & Pohlschröder, M. (2009). Diversity of archaeal type IV pilin-like structures. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 13(3), 403–410. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0241-7>.
2. Aprikian, P., Interlandi, G., Kidd, B. A., Le Trong, I., Tchesnokova, V., Yakovenko, O., Whitfield, M. J., Bullitt, E., Stenkamp, R. E., Thomas, W. E., & Sokurenko, E. V. (2011). The bacterial fimbrial tip acts as a mechanical force sensor. *PLoS biology*, 9(5), e1000617. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000617>.
3. Arnon, R., Shapira, M., & Jacob, C. O. (1983). Synthetic vaccines. *Journal of immunological methods*, 61(3), 261–273. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90220-x](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90220-x).
4. Aslanzadeh, J., & Paulissen, L. J. (1990). Adherence and pathogenesis of *Salmonella* enteritidis in mice. *Microbiology and immunology*, 34(11), 885–893. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1990.tb01067.x>.
5. Atkins, H. S., Morton, M., Griffin, K. F., Stokes, M. G., Nataro, J. P., & Titball, R. W. (2006). Recombinant *Salmonella* vaccines for biodefence. *Vaccine*, 24(15), 2710–2717. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.046>.
6. Atterbury, R. J., Carrique-Mas, J. J., Davies, R. H., & Allen, V. M. (2009). *Salmonella* colonisation of laying hens following vaccination with killed and live attenuated commercial *Salmonella* vaccines. *The Veterinary record*, 165(17), 493–496. <https://doi.org/10.1136/vr.165.17.493>.
7. Atterbury, R. J., Davies, R. H., Carrique-Mas, J. J., Morris, V., Harrison, D., Tucker, V. & Allen, V. M. (2010). Effect of delivery method on the efficacy of *Salmonella* vaccination in chickens. *Vet. Rec.*, 167 (5), 161–164.
8. Bakker, D., van Zijderveld, F. G., van der Veen, S., Oudega, B., & de Graaf, F. K. (1990). K88 fimbriae as carriers of heterologous antigenic determinants. *Microbial pathogenesis*, 8(5), 343–352. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(90\)90093-6](https://doi.org/10.1016/0882-4010(90)90093-6).
9. Barbour, E. K., Frerichs, W. M., Nabbut, N. H., Poss, P. E., & Brinton, M. K. (1993). Evaluation of bacterins containing three predominant phage types of *Salmonella* enteritidis for prevention of infection in egg-laying chickens. *American journal of veterinary research*, 54(8), 1306–1309.
10. Barrow, P. A. (2007). *Salmonella* infections: Immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol.*, 36 (1), 1–13.

11. Barrow, P. A., Lovell, M. A., & Berchieri, A. (1990). Immunisation of laying hens against *Salmonella enteritidis* with live attenuated vaccines. *The Veterinary record*, *126*(10), 241–242.
12. Bergmann-Leitner, E. S., & Leitner, W. W. (2014). Adjuvants in the Driver's Seat: How Magnitude, Type, Fine Specificity and Longevity of Immune Responses Are Driven by Distinct Classes of Immune Potentiators. *Vaccines*, *2*(2), 252–296. <https://doi.org/10.3390/vaccines2020252>.
13. Bijlsma, I. G., & Frik, J. F. (1987). Haemagglutination patterns of the different variants of *Escherichia coli* K88 antigen with porcine, bovine, guinea pig, chicken, ovine and equine erythrocytes. *Research in veterinary science*, *43*(1), 122–123.
14. Blomfield, I., & van der Woude, M. (2007). Regulation of fimbrial expression. *EcoSal Plus*, *2*(2), 10.1128/ecosal.2.4.2.2. <https://doi.org/10.1128/ecosal.2.4.2.2>.
15. Bradley D. E. (1980). A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Canadian journal of microbiology*, *26*(2), 146–154. <https://doi.org/10.1139/m80-022>.
16. Brinton, C. C. (1959). Non-Flagellar Appendages of Bacteria. *Nature* (183), 782–786. <https://doi.org/10.1038/183782a0>.
17. Brinton, C. C., Jr (1965). The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, *27*(8), 1003–1054. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1965.tb02342.x>.
18. Brinton, C. C., Jr., S. W. Wood, A. Brown, A. M. Labik, J. R. Bryan, S. W. Lee, S. E. Polen, E. C. Tramont, J. Sadoff, and W. Zollinger. (1982). The development of a neisserial pilus vaccine for gonorrhoea and meningococcal meningitis. *Seminars in infectious diseases*, (4), 40-159.
19. Broda, P., Beckwith, J.R., Scaife, J. G. (1964). The characterization of a new type of F-prime factor in *Escherichia coli* K12. *Genet.Res.* 5:489-494.
20. Brzuszkiewicz, E., Brüggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschläger, T., Nagy, G., Albermann, K., Wagner, C., Buchrieser, C., Emody, L., Gottschalk, G., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2006). How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(34), 12879–12884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603038103>.
21. Burmolle, M., Bahl, M. I., Jensen, L. B., Sørensen, S. J., & Hansen, L. H. (2008). Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiolog*, *154*(Pt 1), 187–195. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010454-0>.
22. Burrows, M. R., Sellwood, R., & Gibbons, R. A. (1976). Haemagglutinating and adhesive properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia*

coli. *Journal of general microbiology*, 96(2), 269–275.
<https://doi.org/10.1099/00221287-96-2-269>.

23. Campbell, I. (1961). The fimbriae of *Salmonella*. Ph.D. Thesis, Univ. Edinburgh.
24. Canal, A.M., Cubillo S G., V., Zamora, J., Reinhardt, G., Paredes, E., Ildelfonso, R., Alberdi, A., & Macías, P. (1999). Técnicas inmunohistoquímicas para la identificación de antígenos fimbriales de *E. coli* enteropatógeno. *Archivos de medicina veterinaria*, 31(1), 45-53. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X1999000100005>.
25. Charles, S. D., Hussain, I., Choi, C. U., Nagaraja, K. V., & Sivanandan, V. (1994). Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmonella* Enteritidis infection in turkeys. *American journal of veterinary research*, 55(5), 636–642.
26. Chen, F. J., Chan, C. H., Huang, Y. J., Liu, K. L., Peng, H. L., Chang, H. Y., Liou, G. G., Yew, T. R., Liu, C. H., Hsu, K. Y., & Hsu, L. (2011). Structural and mechanical properties of *Klebsiella pneumoniae* type 3 Fimbriae. *Journal of bacteriology*, 193(7), 1718–1725. <https://doi.org/10.1128/JB.01395-10>.
27. Chen, H., Ji, H., Kong, X., Lei, P., Yang, Q., Wu, W., Jin, L., & Sun, D. (2021). Bacterial Ghosts-Based Vaccine and Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 13(11), 1892. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111892>
28. Clifton-Hadley F.A., Breslin M., Venables L.M., Sprigings K.A., Cooles S.W., Houghton S., Woodward M.J. (2002). A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. *Veterinary Microbiology*, 89, 167–179.
29. Collins F. M. (1974). Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriological reviews*, 38(4), 371–402. <https://doi.org/10.1128/br.38.4.371-402.1974>
30. Collinson, S. K., Emödy, L., Müller, K. H., Trust, T. J., & Kay, W. W. (1991). Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* enteritidis. *Journal of bacteriology*, 173(15), 4773–4781. <https://doi.org/10.1128/jb.173.15.4773-4781.1991>.
31. Curtiss, R., 3rd, Xin, W., Li, Y., Kong, W., Wanda, S. Y., Gunn, B., & Wang, S. (2010). New technologies in using recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Critical reviews in immunology*, 30(3), 255–270.
32. De Greve, H., Wyns, L., & Bouckaert, J. (2007). Combining sites of bacterial fimbriae. *Current opinion in structural biology*, 17(5), 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.06.011>.
33. De Ree, J. M., & van den Bosch, J. F. (1987). Serological response to the P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis. *Infection and immunity*, 55(9), 2204–2207. <https://doi.org/10.1128/IAI.55.9.2204-2207.1987>.

34. De Ree, J. M., Schwillens, P., & van den Bosch, J. F. (1986). Monoclonal antibodies for serotyping the P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 24(1), 121–125. <https://doi.org/10.1128/JCM.24.1.121-125.1986>.
35. Deguchi, K., Yokoyama, E., Honda, T., & Mizuno, K. (2009). Efficacy of a novel trivalent inactivated vaccine against the shedding of *Salmonella* in a chicken challenge model. *Avian diseases*, 53(2), 281–286. <https://doi.org/10.1637/8516-110908-Reg.1>.
36. Desin, T. S., Köster, W., & Potter, A. A. (2013). *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert review of vaccines*, 12(1), 87–96. <https://doi.org/10.1586/erv.12.138>.
37. Doggett T. A., & Brown P.K. (1996). Attenuated *Salmonella* as vectors for oral immunization. *Mucosal vaccines*. 105, 18.
38. Dórea, F. C., Cole, D. J., Hofacre, C., Zamperini, K., Mathis, D., Doyle, M. P., Lee, M. D., & Maurer, J. J. (2010). Effect of *Salmonella* vaccination of breeder chickens on contamination of broiler chicken carcasses in integrated poultry operations. *Applied and environmental microbiology*, 76(23), 7820–7825.
39. Duan, Q., Wu, W., Pang, S., Pan, Z., Zhang, W., & Zhu, G. (2020). Coimmunization with Two Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Fimbrial Multiepitope Fusion Antigens Induces the Production of Neutralizing Antibodies against Five ETEC Fimbriae (F4, F5, F6, F18, and F41). *Applied and environmental microbiology*, 86(24), e00217-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00217-20>.
40. Dufresne, K., & Daigle, F. (2017). *Salmonella* Fimbriae: What is the clue to their hairdo? In (Ed.), Current Topics in *Salmonella* and Salmonellosis. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/67189>.
41. Duguid J. P. (1959). Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *Journal of general microbiology*, 21, 271–286. <https://doi.org/10.1099/00221287-21-1-271>.
42. Duguid, J. P. & Campbell, I. (1969). Antigens of the type-I fimbriae of salmonellae and other enterobacteria. *Journal of Medical Microbiology* 2,535-553.
43. Duguid, J. P., & Anderson, E. S. (1967). Terminology of bacterial fimbriae, or pili, and their types. *Nature*, 215(5096), 89–90. <https://doi.org/10.1038/215089a0>.
44. Duguid, J. P., Anderson, E. S., & Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in salmonellae. *J. Pathol*, 92, 107.
45. Duguid, J. P., Clegg, S., & Wilson, M. I. (1979). The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology*, 12(2), 213–227. <https://doi.org/10.1099/00222615-12-2-213>.
46. Duguid, J. P., Smith, I. W., Dempster, G., & Edmunds, P. N. (1955). Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *The Journal of pathology and bacteriology*, 70(2), 335–348. <https://doi.org/10.1002/path.1700700210>.

47. Duguid, J.P., & Old, D.C. (1980). Adhesive Properties of Enterobacteriaceae. In: Beachey, E.H. (eds) Bacterial Adherence. *Receptors and Recognition*, (6). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5863-0_7.
48. Eisenstein, B. I., Clements, J. R., & Dodd, D. C. (1983). Isolation and characterization of a monoclonal antibody directed against type 1 fimbriae organelles from *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 42(1), 333–340. <https://doi.org/10.1128/IAI.42.1.333-340.1983>.
49. Fairbrother, J. M. (1994). Prewaning *Escherichia coli* diarrhea. *Proceedings American Association Swine Practice*, 254-256.
50. Foged, N. T., Klemm, P., Elling, F., Jorsal, S. E., & Zeuthen, J. (1986). Monoclonal antibodies to K88ab, K88ac and K88ad fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbial pathogenesis*, 1(1), 57–69. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(86\)90032-x](https://doi.org/10.1016/0882-4010(86)90032-x).
51. Forero, M., Yakovenko, O., Sokurenko, E. V., Thomas, W. E., & Vogel, V. (2006). Uncoiling mechanics of *Escherichia coli* type I fimbriae are optimized for catch bonds. *PLoS biology*, 4(9), e298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040298>
52. Frendéus, B., Wachtler, C., Hedlund, M., Fischer, H., Samuelsson, P., Svensson, M., & Svanborg, C. (2001). *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Molecular microbiology*, 40(1), 37–51. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02361.x>.
53. Fronzes, R., Remaut, H., & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *The EMBO journal*, 27(17), 2271–2280. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.155>.
54. Gaastra, W., & de Graaf, F. K. (1982). Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiological reviews*, 46(2), 129–161. <https://doi.org/10.1128/mr.46.2.129-161.1982>.
55. Gaastra, W., & Svennerholm, A. M. (1996). Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in microbiology*, 4(11), 444–452. [https://doi.org/10.1016/0966-842x\(96\)10068-8](https://doi.org/10.1016/0966-842x(96)10068-8).
56. Galán, J. E., & Curtiss, R., 3rd (1989). Virulence and vaccine potential of phoP mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microbial pathogenesis*, 6(6), 433–443. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(89\)90085-5](https://doi.org/10.1016/0882-4010(89)90085-5).
57. Galen, J. E., Buskirk, A. D., Tennant, S. M., & Pasetti, M. F. (2016). Live Attenuated Human *Salmonella* Vaccine Candidates: Tracking the Pathogen in Natural Infection and Stimulation of Host Immunity. *EcoSal Plus*, 7(1), 10.1128.
58. Galen, J. E., Simon, R., & Ernst, R. K. (2011). *Salmonella* expressing detoxified lipopolysaccharide is immunogenic and protective both as an attenuated vaccine and for delivery of foreign antigens. *Expert review of vaccines*, 10(12), 1679–1682.

59. Gantois, I., Ducatelle, R., Timbermont, L., Boyen, F., Bohez, L., Haesebrouck, F., Pasmans, F., & van Immerseel, F. (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*, *24*(37-39), 6250–6255. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.070>.
60. Gast, R. K., Stone, H. D., & Holt, P. S. (1993). Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by laying hens. *Avian diseases*, *37*(4), 1085–1091.
61. Gheibi, S.M., Darroudi, M. (2019). Nanovaccine: A novel approach in immunization. *J Cell Physiol*, *234*(8):12530-12536. doi:10.1002/jcp.28120.
62. Gherardi, M. M., Gómez, M. I., García, V. E., Sordelli, D. O., & Cerquetti, M. C. (2000). *Salmonella* Enteritidis temperature-sensitive mutants protect mice against challenge with virulent *Salmonella* strains of different serotypes. *FEMS immunology and medical microbiology*, *29*(2), 81–88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01508.x>.
63. Gillies, R. R., & Duguid, J. P. (1958). The fimbrial antigens of *Shigella flexneri*. The *Journal of hygiene*, *56*(3), 303–318. <https://doi.org/10.1017/s0022172400037803>.
64. Girardeau, J. P.; Dubourguier, H. C.; Gouet, P.(1982). Effect of the glucose and amino acids on expression of K99 antigen in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, *128*: 2243-2249.
65. Goluszko, P., Goluszko, E., Nowicki, B., Nowicki, S., Popov, V., & Wang, H. Q. (2005). Vaccination with purified Dr fimbriae reduces mortality associated with chronic urinary tract infection due to *Escherichia coli* bearing Dr adhesin. *Infection and immunity*, *73*(1), 627–631. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.627-631.2005>.
66. Gorringe, A. R., & Vaughan, T. E. (2014). *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert review of vaccines*, *13*(10), 1205–1214.
67. Groisman, E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of bacteriology*, *183*(6), 1835–1842.
68. Guinee, P. A., & Jansen, W. H. (1979). Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin; a comparative study. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, *243*(2-3), 245–257.
69. Gur, E., Biran, D., & Ron, E. Z. (2011). Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria--how and when? *Nature reviews. Microbiology*, *9*(12), 839–848. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2669>.
70. Hagblom, P., Segal, E., Billyard, E., & So, M. (1985). Intragenic recombination leads to pilus antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature*, *315*(6015), 156–158. <https://doi.org/10.1038/315156a0>.

71. Hajam, I. A., Dar, P. A., Won, G., & Lee, J. H. (2017). Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential. *Veterinary research*, 48(1), 37.
72. Han, Y., Renu, S., Patil, V., Schrock, J., Feliciano-Ruiz, N., Selvaraj, R., & Renukaradhya, G. J. (2020). Immune Response to *Salmonella* Enteritidis Infection in Broilers Immunized Orally with Chitosan-Based *Salmonella* Subunit Nanoparticle Vaccine. *Frontiers in immunology*, 11, 935.
73. Hancock V., Witsø IL., & Klemm P. (2011). Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *International Journal of Medical Microbiology*, 301: 570–576. [10.1016/j.ijmm.2011.04.018](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.018).
74. Hernández, F., Caballero, M., Rivera, P., & Hird, D. (1989). Mannose-resistant hemagglutination, enzyme-linked immunosorbent assay, and immune electron microscopy for detection of K99 fimbrial antigen in *Escherichia coli* from calves. *Journal of clinical microbiology*, 27(9), 2123–2124. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.9.2123-2124.1989>.
75. Hoiseth, S. K., & Stocker, B. A. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, 291(5812), 238–239. <https://doi.org/10.1038/291238a0>.
76. Hornick, D. B., Allen, B. L., Horn, M. A., & Clegg, S. (1992). Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infection and immunity*, 60(4), 1577–1588. <https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1577-1588.1992>.
77. Houwink, A. L., & Van Iterson, W. (1950). Electron microscopical observations on bacterial cytology; a study on flagellation. *Biochimica et biophysica acta*, 5(1), 10–44. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(50\)90144-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(50)90144-2).
78. Hultgren, S. J., & Normark, S. (1991). Biogenesis of the bacterial pilus. *Current opinion in genetics & development*, 1(3), 313–318. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(05\)80293-x](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(05)80293-x).
79. Humphries, A. D., Townsend, S. M., Kingsley, R. A., Nicholson, T. L., Tsolis, R. M., & Bäumler, A. J. (2001). Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS microbiology letters*, 201(2), 121–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10744.x>.
80. Hur, J., & Lee, J. H. (2012). Comparative evaluation of a vaccine candidate expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesins for colibacillosis with a commercial vaccine using a pig model. *Vaccine*, 30(26), 3829–3833. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.087>.
81. Ishida, Y., Sakai, E., Sato, K., Sugiyama, E., Mima, K., Taneno, A., Shimomura, H., Cui, L., & Hirai, Y. (2018). Induction of Mucosal Humoral Immunity by Subcutaneous Injection of an Oil-emulsion Vaccine against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis in Chickens. *Food safety*, 6(4), 151–155.

82. Jann, K., Jann B., & Schmidt, G. (1981). SDS polyacrylamide gel electrophoresis and serological analysis of pili from *Escherichia coli* of different pathogenic origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 11:21-25.
83. Jarrell, K. F. (2009). Pili and flagella: current research and future trends. *Caister Academic Press*, Norfolk, United Kingdom.
84. Jin, X., & Marshall, J. S. (2020). Mechanics of biofilms formed of bacteria with fimbriae appendages. *PloS one*, 15(12), e0243280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243280>.
85. Kaack, M. B., Martin, L. N., Svenson, S. B., Baskin, G., Steele, R. H., & Roberts, J. A. (1993). Protective anti-idiotypic antibodies in the primate model of pyelonephritis. *Infection and immunity*, 61(6), 2289–2295. <https://doi.org/10.1128/IAI.61.6.2289-2295.1993>.
86. Kao, D. J., Churchill, M. E., Irvin, R. T., & Hodges, R. S. (2007). Animal protection and structural studies of a consensus sequence vaccine targeting the receptor binding domain of the type IV pilus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology*, 374(2), 426–442. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.032>.
87. Karan, S., Garg, L. C., Choudhury, D., & Dixit, A. (2021). Recombinant FimH, a fimbrial tip adhesin of *Vibrio parahaemolyticus*, elicits mixed T helper cell response and confers protection against *Vibrio parahaemolyticus* challenge in murine model. *Molecular Immunology*, 135, 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.05.005>.
88. Karkhanis, Y. D., & Bhogal, B. S. (1986). A single-step isolation of K99 pili from B-44 strain of *Escherichia coli*. *Analytical biochemistry*, 155(1), 51–55. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90223](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90223).
89. Kilroy, S., Raspoet, R., Devloo, R., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2015). Oral administration of the *Salmonella* Typhimurium vaccine strain Nal2/Rif9/Rtt to laying hens at day of hatch reduces shedding and caecal colonization of *Salmonella* 4,12: i:-, the monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium. *Poultry Science*, 94(6), 1122–1127. <https://doi.org/10.3382/ps/pev078>.
90. Kilroy, S., Raspoet, R., Haesebrouck, F. (2016). Prevention of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis after oral vaccination of laying hens with *Salmonella* Enteritidis Δ tolC and Δ acrABacrEFmdtABC mutants. *Vet Res*, 47, 82.
91. Klemm, P., (1985). Fimbrial Adhesins of *Escherichia coli*. *Reviews of Infectious Diseases*, 7(3), 321-340.
92. Klemm, P., & Schembri, M. A. (2000a). Bacterial adhesins: function and structure. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 290(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80102-2](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80102-2).

93. Klemm, P., Christiansen, G., Kreft, B., Marre, R., & Bergmans, H. (1994). Reciprocal exchange of minor components of type 1 and F1C fimbriae results in hybrid organelles with changed receptor specificities. *Journal of bacteriology*, 176(8), 2227–2234. <https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2227-2234.1994>.
94. Kline, K. A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell host & microbe*, 5(6), 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>.
95. Knudsen, G. M., Nielsen, M. B., Thomsen, L. E., Aabo, S., Rychlik, I., & Olsen, J. E. (2014). The role of ClpP, RpoS and CsrA in growth and filament formation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at low temperature. *BMC microbiology*, 14, 208.
96. Knudsen, G. M., Olsen, J. E., Aabo, S., Barrow, P., Rychlik, I., & Thomsen, L. E. (2013). ClpP deletion causes attenuation of *Salmonella* Typhimurium virulence through mis-regulation of RpoS and indirect control of CsrA and the SPI genes. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 7), 1497–1509. <https://doi.org/10.1099/mic.0.065797-0>.
97. Kolotilin, I., Kaldis, A., Devriendt, B., Joensuu, J., Cox, E., & Menassa, R. (2012). Production of a subunit vaccine candidate against porcine post-weaning diarrhea in high-biomass transplastomic tobacco. *PloS one*, 7(8), e42405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042405>.
98. Kong, Q., Six, D. A., Roland, K. L., Liu, Q., Gu, L., Reynolds, C. M., Wang, X., Raetz, C. R., & Curtiss, R., 3rd (2011). *Salmonella* synthesizing 1-dephosphorylated [corrected] lipopolysaccharide exhibits low endotoxic activity while retaining its immunogenicity. *Journal of immunology*, 187(1), 412–423.
99. Krogfelt, K. A., Meldal, M., & Klemm, P. (1987). K88 fimbrial antigens: identification of antigenic determinants by the use of synthetic peptides. *Microbial pathogenesis*, 2(6), 465–472. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(87\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0882-4010(87)90053-2).
100. Labañino N., & Rodríguez V. (2013). Test de Widal ¿es útil para el diagnóstico de la fiebre tifoidea?. *Correo Científico Médico*, 17(2), 199-201.
101. Laine A. (1992). Crossed immunoelectrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 80, 207–213. <https://doi.org/10.1385/0-89603-204-3:207>.
102. Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J. S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C. H., & Hultgren, S. J. (1997). Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science*, 276(5312), 607–611. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.607>.
103. Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J. S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C. H., & Hultgren, S. J. (1997). Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5312), 607–611. <https://doi.org/10.1126/science.276.5312.607>.

104. Leffler, H., & C. Svanborg-Eden. (1980). Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 8:127-134.
105. Levine, M., & Tacket C. (1994). Recombinant live cholera vaccines. *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspective*. ASM Press:395–413.
106. Li, Z. M., Brennan, M. J., David, J. L., Carter, P. H., Cowell, J. L., & Manclark, C. R. (1988). Comparison of type 2 and type 6 fimbriae of *Bordetella pertussis* by using agglutinating monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, 56(12), 3184–3188. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.12.3184-3188.1988>.
107. Liu, W., Yang, Y., Chung, N. & Kwang, J. (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*, 45, 797–806.
108. Low, D., Braaten, B.A., & van der Woude, M. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2 (1), 146-157.
109. Lu, T., Moxley, R. A., & Zhang, W. (2020). Application of a Novel Epitope- and Structure-Based Vaccinology-Assisted Fimbria-Toxin Multiepitope Fusion Antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* for Development of Multivalent Vaccines against Porcine Postweaning Diarrhea. *Applied and environmental microbiology*, 86(24), e00274-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00274-20>.
110. Lu, T., Seo, H., Moxley, R. A., & Zhang, W. (2019). Mapping the neutralizing epitopes of F18 fimbrial adhesin subunit FedF of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Veterinary microbiology*, 230, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.015>.
111. Lund, B., Lindberg, F., & Normark, S. (1988). Structure and antigenic properties of the tip-located P pilus proteins of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 170(4), 1887–1894. <https://doi.org/10.1128/jb.170.4.1887-1894.1988>.
112. Maddux, J. T., Stromberg Z. R., Curtiss III R., Mellata M. (2017). Evaluation of Recombinant Attenuated *Salmonella* Vaccine Strains for Broad Protection against Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Immunology*, 8: 1280.
113. Malcova, M., Karasova, D., & Rychlik, I. (2009). *aroA* and *aroD* mutations influence biofilm formation in *Salmonella* Enteritidis. *FEMS microbiology letters*, 291(1), 44–49. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01433.x>.
114. Mastroeni, P., Chabalgoity, J. A., Dunstan, S. J., Maskell, D. J., & Dougan, G. (2001). *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 161(2), 132–164. <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0502>.

115. Mastroeni, P., Villarreal-Ramos, B., & Hormaeche, C. E. (1993). Effect of late administration of anti-TNF alpha antibodies on a *Salmonella* infection in the mouse model. *Microbial pathogenesis*, *14*(6), 473–480. <https://doi.org/10.1006/mpat.1993.1046>
116. McLaren, I. M., Sojka, M. G., Thorns, C. J., & Wray, C. (1992). An interlaboratory trial of a latex agglutination kit for rapid identification of *Salmonella enteritidis*. *The Veterinary record*, *131*(11), 235–236. <https://doi.org/10.1136/vr.131.11.235>.
117. McWhorter, A.R., Chousalkar, K.K. (2018). A Long-Term Efficacy Trial of a Live, Attenuated *Salmonella* Typhimurium Vaccine in Layer Hens. *Front. Microbiol.* *9*:1380.
118. Melican, K., Sandoval, R. M., Kader, A., Josefsson, L., Tanner, G. A., Molitoris, B. A., & Richter-Dahlfors, A. (2011). Uropathogenic *Escherichia coli* P and Type 1 fimbriae act in synergy in a living host to facilitate renal colonization leading to nephron obstruction. *PLoS pathogens*, *7*(2), e1001298. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001298>.
119. Melkebeek, V., Goddeeris, B. M., & Cox, E. (2013). ETEC vaccination in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, *152*(1-2), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.024>
120. Methner U., Barrow P.A., Berndt A., & Rychlik I. (2011). *Salmonella* Enteritidis with double deletion in *phoP* *fliC*--a potential live *Salmonella* vaccine candidate with novel characteristics for use in chickens. *Vaccine*; *29*: 3248-3253.
121. Mills, K. W., Phillips, R. M., Kelly, B. L., & Baughman, G. L. (1982). Using enzyme-linked immunosorbent assay to detect *Escherichia coli* K88 pili antigens from clinical isolates. *American journal of veterinary research*, *43*(2), 365–367.
122. Möllby, R., Källenius, G., Korhonen, T. K., Winberg, J., & Svenson, S. B. (1983). P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: detection in clinical material by a rapid receptor-specific agglutination test. *Infection*, *11*(1), 68–72. <https://doi.org/10.1007/BF01651363>.
123. Mona I., El-Enbaawy, Zakia A.M., Ahmed, M.A., & Ibrahim H.M. (2013). Protective efficacy of *Salmonella* local strains representing groups B, in a prepared polyvalent formalin inactivated oil adjuvant vaccine in layers. *International Journal of Microbiological Research* *4* (3): 288-295.
124. Moon, H. W., Kohler, E. M., Schneider, R. A., & Whipp S. C. (1980). Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.* *27*, 222-230.

125. Mortezaei, N., Singh, B., Bullitt, E., Uhlin, B. E., & Andersson, M. (2013). P-fimbriae in the presence of anti-PapA antibodies: new insight of antibodies action against pathogens. *Scientific reports*, *3*, 3393. <https://doi.org/10.1038/srep03393>.
126. Moser I., Ørskov I., Hacker J., & Jann K. (1986). Characterisation of a monoclonal antibody against the fimbrial F8 antigen of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, *34*, 329–334, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01431.x>.
127. Nakamura, M., Nagamine, N., Takahashi, T., Suzuki, S., & Sato, S. (1994). Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* Enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian diseases*, *38*(4), 717–724.
128. Nandre, R. M., Ruan, X., Duan, Q., Sack, D. A., & Zhang, W. (2016). Antibodies derived from an enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesin tip MEFA (multiepitope fusion antigen) against adherence of nine ETEC adhesins: CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS21 and EtpA. *Vaccine*, *34*(31), 3620–3625. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.003>.
129. Nowicki, B., Hart, A., Coyne, K. E., Lublin, D. M., & Nowicki, S. (1993). Short consensus repeat-3 domain of recombinant decay-accelerating factor is recognized by *Escherichia coli* recombinant Dr adhesin in a model of a cell-cell interaction. *The Journal of experimental medicine*, *178*(6), 2115–2121. <https://doi.org/10.1084/jem.178.6.2115>.
130. Nowotarska, M., & Mulczyk, M. (1977). Serologic relationship of fimbriae among Enterobacteriaceae. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *25*(1), 7–16.
131. Nuccio, S. P., & Bäumler, A. J. (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *71*(4), 551–575. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-07>.
132. Nystrom, E. A. (1994). Colibacillosis in weaned pigs. *Proceedings Am. Ass. Swine Pract.* 257-258.
133. O'Hanley, P., Lark, D., Falkow, S., & Schoolnik, G. (1985). Molecular basis of *Escherichia coli* colonization of the upper urinary tract in BALB/c mice. Gal-Gal pili immunization prevents *Escherichia coli* pyelonephritis in the BALB/c mouse model of human pyelonephritis. *The Journal of clinical investigation*, *75*(2), 347–360. <https://doi.org/10.1172/JCI111707>.
134. Old, D., & Payne, S. (1971). Antigens of the type-2 fimbriae of Salmonellae: "cross-reacting material" (CRM) of type-1 fimbriae. *Journal of medical microbiology*, *4* (2), 215-25.
135. Ong, C. L., Ulett, G. C., Mabbett, A. N., Beatson, S. A., Webb, R. I., Monaghan, W., Nimmo, G. R., Looke, D. F., McEwan, A. G., & Schembri, M. A. (2008). Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in

- biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 190(3), 1054–1063. <https://doi.org/10.1128/JB.01523-07>.
136. Orskov, F., & Orskov I. (1984). “Serotyping of *Escherichia coli*,” in *Methods in Microbiology*. London: Academic Press, 14, 43–112.
 137. Orskov, I., & Orskov F. (1983). Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog. Allergy* 33:80-105.
 138. Orskov, I., & Orskov, F. (1990). Serologic classification of fimbriae. *Current topics in microbiology and immunology*, 151, 71–90.
 139. Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. & Jann, K. (1977) Serology, chemistry and genetics of *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 41, 667-710.
 140. Orskov, I., Orskov, F., Sojka, W. J., & Leach, J. M. (1961). Simultaneous occurrence of *E. coli* B and Lantigens in strains from diseased swine. Influence of cultivation temperature. Two new *E. coli* Kantigens: K 87 and K 88. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 53, 404–422.
 141. Ottow, J. C. (1975). Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annual review of microbiology*, 29, 79–108. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.29.100175.000455>.
 142. Papezova, K., Havlícková, H., Sisak, F., Kummer, V., Faldyna, M., & Rychlik, I. (2008). Comparison of live and inactivated *Salmonella* Typhimurium vaccines containing different combinations of SPI-1 and SPI-2 antigens in poultry. *Veterinarni Medicina*, 53, 315-323.
 143. Paranchych, W., & Frost, L. S. (1988). The physiology and biochemistry of pili. *Advances in microbial physiology*, 29, 53–114. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60346-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60346-x).
 144. Parry, S. H., & Porter, P. (1978). Immunological aspects of cell membrane adhesion demonstrated by porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Immunology*, 34(1), 41–49.
 145. Parry, S. H., Abraham S. N., & Sussman M. (1982). The biological and serological properties of adhesion determinants of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. *Clinical, bacteriological and immunological aspects of urinary tract infections in children*, 113-126.
 146. Pecha, B., Low, D., & O'Hanley, P. (1989). Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by piliated *Escherichia coli* in a murine model. Single-component Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by homologous and heterologous piliated *E. coli* strains. *The Journal of clinical investigation*, 83(6), 2102–2108. <https://doi.org/10.1172/JCI114123>.
 147. Pencheva, D. V., Velichkova, E. I., Sandarov, D. Z., Draganov, M. A., Hristova Mileva, G.-K. P.D., & Bryaskova R. (2015). Experimental Study on the Components

in polyvalent (Ghost) *Salmonella* vaccine for veterinary use. *Hindawi publishing corporation journal of nanomaterials*, 101464, 4.

148. Pere, A., Väisänen-Rhen, V., Rhen, M., Tenhunen, J., & Korhonen, T. K. (1986). Analysis of P fimbriae on *Escherichia coli* O2, O4, and O6 strains by immunoprecipitation. *Infection and immunity*, 51(2), 618–625. <https://doi.org/10.1128/IAI.51.2.618-625.1986>.
149. Pereira, A. L., Ferraz, L. R., Silva, R. S., & Giugliano, L. G. (2007). Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. *The Journal of infectious diseases*, 195(3), 366–374. <https://doi.org/10.1086/510538>.
150. Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715–727. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>.
151. Ramezanalizadeh, F., Owlia, P., & Rasooli, I. (2020). Type I pili, CsuA/B and FimA induce a protective immune response against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine*, 38(34), 5436–5446. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.06.052>
152. Ran, X., Yang, Z., Shao, G., Wen, X., Liu, S., & Ni, H. (2018). Avian *Salmonella* Enteritidis serovar Enteritidis with ClpP deletion is attenuated and highly immunogenic in chickens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 42 (4), 269-276.
153. Remaut, H., & Ben-Tal, N. (2014). Lifting the lid on pilus assembly. *eLife*, 3, e04997. <https://doi.org/10.7554/eLife.04997>
154. Rene, P., Dinolfo, M., & Silverblatt, F. J. (1982). Serum and urogenital antibody responses to *Escherichia coli* pili in cystitis. *Infection and immunity*, 38(2), 542–547. <https://doi.org/10.1128/IAI.38.2.542-547.1982>.
155. Renu, S., Markazi, A. D., Dhakal, S., Lakshmanappa, Y. S., Gourapura, S. R., Shanmugasundaram, R., Senapati, S., Narasimhan, B., Selvaraj, R. K., & Renukaradhya, G. J. (2018). Surface engineered polyanhydride-based oral *Salmonella* subunit nanovaccine for poultry. *International journal of nanomedicine*, 13, 8195–8215.
156. Renu, S., Markazi, A. D., Dhakal, S., Lakshmanappa, Y. S., Shanmugasundaram, R., Selvaraj, R. K., & Renukaradhya, G. J. (2020). Oral Deliverable Mucoadhesive Chitosan-Salmonella Subunit Nanovaccine for Layer Chickens. *International journal of nanomedicine*, 15, 761–777.
157. Rippinger, P., Bertschinger, H. U., Imberechts, H., Nagy, B., Sorg, I., Stamm, M., Wild, P., & Wittig, W. (1995). Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. *Veterinary microbiology*, 45(4), 281–295. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00141-i](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00141-i).

158. Roberts, J. A., Hardaway, K., Kaack, B., Fussell, E. N., & Baskin, G. (1984). Prevention of pyelonephritis by immunization with P-fimbriae. *The Journal of urology*, *131*(3), 602–607. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)50513-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)50513-3).
159. Roberts, J. A., Kaack, M. B., Baskin, G., Korhonen, T. K., Svenson, S. B., & Winberg, J. (1989). P-fimbriae vaccines. II. Cross reactive protection against pyelonephritis. *Pediatric nephrology*, *3*(4), 391–396. <https://doi.org/10.1007/BF00850213>.
160. Robinson, D. E., Buttle, D. J., Short, R. D., McArthur, S. L., Steele, D. A., & Whittle, J. D. (2012). Glycosaminoglycan (GAG) binding surfaces for characterizing GAG-protein interactions. *Biomaterials*, *33*(4), 1007–1016. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.042>.
161. Roland, K. L., & Brennenan, K. E. (2013). *Salmonella* as a vaccine delivery vehicle. *Expert review of vaccines*, *12*(9), 1033–1045.
162. Román, B. S., Garrido, V., Muñoz, P. M., Arribillaga, L., García, B., De Andrés, X., Zabaleta, V., Mansilla, C., Farrán, I., Lasa, I., De Andrés, D., Amorena, B., Lasarte, J. J., & Grilló, M. J. (2012). The extradomain a of fibronectin enhances the efficacy of lipopolysaccharide defective *Salmonella* bacterins as vaccines in mice. *Veterinary research*, *43*(1), 31.
163. Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., & Normark, S. (1998). Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of bacteriology*, *180*(3), 722–731. <https://doi.org/10.1128/JB.180.3.722-731.1998>.
164. Salazar-González, R. M., Maldonado-Bernal, C., Ramírez-Cruz, N. E., Rios-Sarabia, N., Beltrán-Nava, J., Castañón-González, J., Castillo-Torres, N., Palma-Aguirre, J. A., Carrera-Camargo, M., López-Macías, C., & Isibasi, A. (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*, *93*(2-3), 115–122.
165. Salit, I. E., & Gotschlich, E. C. (1977). Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili. *The Journal of experimental medicine*, *146*(5), 1169–1181.
166. Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L., Schlapp, G., Härtel, S., & Zunino, P. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Pathogens and disease*, *74*(5), ftw033.
167. Schwan, W. R., Lee, J. L., Lenard, F. A., Matthews, B. T., & Beck, M. T. (2002). Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, *70*(3), 1391–1402. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1391-1402.2002>
168. Sebkova, A., Karasova, D., Crhanova, M., Budinska, E., & Rychlik, I. (2008). *aro* mutations in *Salmonella enterica* cause defects in cell wall and outer membrane

integrity. *Journal of bacteriology*, 190(9), 3155–3160.
<https://doi.org/10.1128/JB.00053-08>.

169. Servin, A. L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 264–292.
<https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.264-292.2005>.
170. Shashkov, A. S., Senchenkova, S. N., Sun, Q., Lan, R., Wang, J., Perepelov, A. V., Knirel, Y. A., & Xu, J. (2013). Structure of the O-antigen of a novel *Shigella flexneri* serotype, 1d (I: 7,8). *Carbohydrate research*, 373, 93–96.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.03.015>.
171. Sherman, D. M., Acres, S. D., Sadowski, P. L., Springer, J. A., Bray, B., Raybould, T. J., & Muscoplat, C. C. (1983). Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infection and immunity*, 42(2), 653–658.
<https://doi.org/10.1128/IAI.42.2.653-658.1983>.
172. Siddiqui, M. Z. (2010). Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(1), 12–17. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.62229>.
173. Singh, B.R. (2009). Salmonella Vaccines for Animals and Birds and Their Future Perspective. *The Open Vaccine Journal*, 2, 100-112.
174. Smith, H. W., & Linggood, M. A. (1972). Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains: the transmissible nature of these enterotoxins and of a K antigen possessed by calf and lamb strains. *Journal of medical microbiology*, 5(2), 243–250. <https://doi.org/10.1099/00222615-5-2-243>.
175. Smith, P., Zurita, L., Canale, F., Ferreira, A., & Toro, H. (1994). ELISA to determine anti-K99 pilus antibody in the sera of normal and diarrhoeic calves. *Veterinary microbiology*, 40(3-4), 387–392. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90126-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90126-0).
176. Sojka, M. G., Carter, M. A., & Thorns, C. J. (1998). Characterisation of epitopes of type 1 fimbriae of *Salmonella* using monoclonal antibodies specific for SEF21 fimbriae of *Salmonella* Enteritidis. *Veterinary microbiology*, 59(2-3), 157–174.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(97)00189-2).
177. Sokurenko, E. V. & Hasty, D. H. (1995). Assay for adhesion of host cells to immobilized bacteria. *Methods Enzymol.* 253,519-528.
178. Spurbeck, R. R., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Walk, S. T., Hooton, T. M., & Mobley, H. L. (2011). Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of ygi and yad fimbriae. *Infection and immunity*, 79(12), 4753–4763. <https://doi.org/10.1128/IAI.05621-11>.

179. Suzuki, Y., Yoshimura, F., Takahashi, K., Tani, H., & Suzuki, T. (1988). Detection of fimbriae and fimbrial antigens on the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis* by negative staining and serological methods. *Journal of general microbiology*, 134(10), 2713–2720. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-10-2713>.
180. Svanborg, C., Bergsten, G., Fischer, H., Godaly, G., Gustafsson, M., Karpman, D., Lundstedt, A. C., Ragnarsdottir, B., Svensson, M., & Wullt, B. (2006). Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction. *Current opinion in microbiology*, 9(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.12.012>.
181. Svennerholm, A. M., & Tobias, J. (2008). Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Expert review of vaccines*, 7(6), 795–804. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.6.795>.
182. Svenson, S. B., Källenius, G., Korhonen, T. K., Möllby, R., Roberts, J. A., Tullus, K., & Winberg, J. (1984). Initiation of clinical pyelonephritis--the role of P-fimbriae-mediated bacterial adhesion. *Contributions to nephrology*, 39, 252–272. <https://doi.org/10.1159/000409254>.
183. Takeyama, N., Yuki, Y., Tokuhara, D., Oroku, K., Mejima, M., Kurokawa, S., Kuroda, M., Kodama, T., Nagai, S., Ueda, S., & Kiyono, H. (2015). Oral rice-based vaccine induces passive and active immunity against enterotoxigenic *E. coli*-mediated diarrhea in pigs. *Vaccine*, 33(39), 5204–5211. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.074>.
184. Talavera, C.A. (1983). Diagnóstico de la diarrea enterotóxica por *E. coli*. Método de aglutinación rápida (K: 88) y (K: 99) en laboratorios de Diagnóstico. *Informe Técnico*. CENSA.
185. Talavera, C.A., Montes de Oca, N. (1987). Obtención de sueros diagnóstico a partir de fimbria de *E. coli*. *Informe de la Academia de Ciencias de Cuba*. La Habana. Cuba.
186. Tang, Y., Davies, R., & Petrovska, L. (2019). Identification of genetic features for attenuation of two *Salmonella* Enteritidis vaccine strains and differentiation of these from wildtype isolates using whole genome sequencing. *Frontiers in veterinary science*, 6, 447. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00447>.
187. Tarkkanen A. M., Allen B. L., Westerlund B., Holthofer H., Kuusela P., Risteli L., Clegg S., & Korhonen T.K. (1990): Type V collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. *Mol Microbiol*, 4: 1353-1361. 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00714. x.
188. Tarkkanen, A. M., Virkola, R., Clegg, S., & Korhonen, T. K. (1997). Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infection and immunity*, 65(4), 1546–1549. <https://doi.org/10.1128/iai.65.4.1546-1549.1997>.
189. Tennant, S. M., Wang, J. Y., Galen, J. E., Simon, R., Pasetti, M. F., Gat, O., & Levine, M. M. (2011). Engineering and preclinical evaluation of attenuated nontyphoidal *Salmonella* strains serving as live oral vaccines and as reagent

strains. *Infection and immunity*, 79(10), 4175–4185.
<https://doi.org/10.1128/IAI.05278-11>

190. Thorns, C. J., McLaren, I. M., & Sojka, M. G. (1994). The use of latex particle agglutination to specifically detect *Salmonella enteritidis*. *International journal of food microbiology*, 21(1-2), 47–53. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90199-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90199-6).
191. Thorns, C. J., Sojka, M. G., McLaren, I. M., & Dibb-Fuller, M. (1992). Characterisation of monoclonal antibodies against a fimbrial structure of *Salmonella* Enteritidis and certain other serogroup D salmonellae and their application as serotyping reagents. *Research in veterinary science*, 53(3), 300–308. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90130-t](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90130-t).
192. Tokuda, K., Nishi, J., Imuta, N., Fujiyama, R., Kamenosono, A., Manago, K., & Kawano, Y. (2010). Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. *Microbiology and immunology*, 54(6), 320–329. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00210.x>.
193. Tran, T. Q., Quessy, S., Letellier, A., Desrosiers, A., & Boulianne, M. (2010). Immune response following vaccination against *Salmonella* Enteritidis using 2 commercial bacterins in laying hens. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 74(3), 185–192.
194. Vaisanen, V., Elo, J., Tallgren, L. G., Siitonen, A., Mäkelä, P. H., Svanborg-Edén, C., Källenius, G., Svenson, S. B., Hultberg, H., & Korhonen, T. (1981). Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis. *Lancet (London, England)*, 2(8260-61), 1366–1369. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92796-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92796-3).
195. Van den Broeck, W., Cox, E., & Goddeeris, B. M. (1999a). Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. *Infection and immunity*, 67(2), 520–526. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.2.520-526.1999>.
196. Van den Broeck, W., Cox, E., & Goddeeris, B. M. (1999b). Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. *vaccine*, 17(15-16), 2020–2029. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)00406-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00406-x).
197. Van der Woude, M. W., Arts, P. A., Bakker, D., Van Verseveld, H. W., De Graaf, F. K. (1990a). Growth rate dependent synthesis of K99 fimbrial subunits is regulated at the level of transcription. *J. Gen. Microbiol.* 136: 897-903.
198. Van der Woude, M. W.; Braster, M.; Van Verseveld, H. W.; De Graaf, F. K. (1990b). Control of temperature dependent synthesis of K99 fimbriae. *FEMS Microbiol.* 56: 183-188.
199. Van I., F., Methner, U., Rychlik, I., Nagy, B., Velge, P., Martin, G., Foster, N., Ducatelle, R., & Barrow, P. A. (2005). Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiology and infection*, 133(6), 959–978.

200. Van Zijderveld, F. G., Anakotta, J., Brouwers, R. A., van Zijderveld, A. M., Bakker, D., & de Graaf, F. K. (1990). Epitope analysis of the F4 (K88) fimbrial antigen complex of enterotoxigenic *Escherichia coli* by using monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, 58(6), 1870–1878. <https://doi.org/10.1128/iai.58.6.1870-1878.1990>.
201. Vazquez, F., González, E. A., Garabal, J. I., Valderrama, S., Blanco, J., & Baloda, S. B. (1996). Development and evaluation of an ELISA to detect *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial antibody levels. *Journal of medical microbiology*, 44(6), 453–463. <https://doi.org/10.1099/00222615-44-6-453>.
202. Verdonck, F., Cox, E., Schepers, E., Imberechts, H., Joensuu, J., Goddeeris, B. M. (2004a). Conserved regions in the sequence of the F4 (K88) fimbrial adhesion FaeG suggest a donor strand mechanism in F4 assembly. *Vet. Microbiol.*, 102: 215-225.
203. Verdonck, F., Cox, E., Van der Stede, Y., & Goddeeris, B. M. (2004b). Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response. *Vaccine*, 22(31-32), 4291–4299. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.04.016>.
204. Wellens, A., Garofalo, C., Nguyen, H., Van Gerven, N., Slättegård, R., Hernalsteens, J. P., Wyns, L., Oscarson, S., De Greve, H., Hultgren, S., & Bouckaert, J. (2008). Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH-oligomannose-3 complex. *PloS one*, 3(4), e2040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002040>.
205. Westerlund-Wikström, B., & Korhonen, T. K. (2005). Molecular structure of adhesin domains in *Escherichia coli* fimbriae. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 295(6-7), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.06.010>.
206. Wickner, S., Maurizi, M.R., & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*. 286:1888–1893.
207. Wizemann, T. M., Adamou, J. E., & Langermann, S. (1999). Adhesins as targets for vaccine development. *Emerging infectious diseases*, 5(3), 395–403. <https://doi.org/10.3201/eid0503.990310>.
208. Woodward, M. J., Gettinby, G., Breslin, M. F., Corkish, J. D., & Houghton, S. (2002). The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A.*, 31(4), 383–392. <https://doi.org/10.1080/03079450220141660>.
209. Yang, Y. (2017). Experimental Approaches to Understand and Control *Salmonella* Infection in Poultry. *Theses and Dissertations*. 2602.
210. Yoshimura, Y. (2004). Significance of local immunity in hen reproductive organs. *Anim Sci J*. 75:183–191.
211. Zavialov, A., Zav'yalova, G., Korpela, T., & Zav'yalov, V. (2007). FGL chaperone-assembled fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), pp. 478–514.

212. Zavialov, V., Zavialov, A., Zav'yalova, G., & Korpela, T. (2010). Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. *FEMS microbiology reviews*, 34(3), 317–378. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00201.x>.