

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION DEL GEN DE LA ENTEROTOXINA DE *Escherichia coli*-SE.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA EL ALUMNO

MARCOS FERNANDEZ MORA

Cuernavaca, Mor., febrero 1990.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

-INTRODUCCION.....	1
-OBJETIVOS.....	15
-ANTECEDENTES.....	16
-MATERIALES Y METODOS.....	17
-APENDICE I.....	24
-APENDICE II.....	30
-RESULTADOS.....	40
-DISCUSION Y CONCLUSION.....	50
-EXPERIMENTOS FUTUROS.....	59
-BIBLIOGRAFIA.....	60

INTRODUCCION

El agente causal de la fiebre tifoidea (FT)

La FT en el hombre es la manifestación clínica de una infección generalizada (sistémica) por Salmonella typhi, enterobacteria gram negativa, que se introduce al cuerpo vía tracto gastrointestinal, regularmente por la ingestión de agua o comida contaminada por heces de humano.

S.typhi pertenece al serotipo 9,12,d,Vi; definido por las unidades repetidas de azúcares (9,12) del antígeno O, localizado en el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa; por el antígeno H (d) constituido por la proteína flagelar (flagelina); y por el antígeno Vi o polisacárido capsular K. (Calva, et al., 1988).

Descripción de la fiebre tifoidea (FT)

El período de incubación de la FT, aunque varía de acuerdo a la dosis de infección, es usualmente alrededor de 10 a 14 días.

Durante ciertas etapas de la enfermedad S.typhi circula en la sangre (bacteremia), de donde puede ser aislada para propósitos de diagnóstico.

La fiebre es la principal manifestación clínica de la FT, y puede producir temperaturas de 39-40 C durante los primeros 3-8 días después del inicio del padecimiento.

Comúnmente, acompañando a la fiebre, existe un intenso dolor de cabeza, debilidad generalizada y diarrea; también se puede presentar náusea, vómito, pérdida del apetito, dolor abdominal,

escalofríos, tos y dolor muscular.

Las complicaciones más frecuentes son hemorragias intestinales, desordenes sanguíneos severos y cambios inflamatorios en el hígado. Aunque con menos frecuencia, puede llegar a ocurrir perforación intestinal, contribuyendo al 25% de las muertes asociadas con la enfermedad. Al examen físico, los síntomas más comunes son la debilidad generalizada, dolor abdominal, así como la hepatomegalia y la esplenomegalia. (Calva, et al., 1988).

Enterotoxina de *E. typhi*.

Las enterotoxinas de origen bacteriano son proteínas que tienen un efecto tóxico en el tracto gastrointestinal de humanos y de animales. Las manifestaciones clínicas más importantes de la enterotoxigenicidad son vómito y diarrea. Las enterotoxinas varían en el modo de acción, pero, se pueden agrupar de manera general en dos grupos: enterotoxinas citotóxicas y enterotoxinas citotónicas. Las enterotoxinas citotóxicas causan muerte de células eucariotas (v.g. por inhibición de síntesis de proteínas), mientras que las enterotoxinas citotónicas causan alteraciones del metabolismo celular en formas específicas (v.g. elevando niveles de nucleótidos cíclicos) (Betley et al., 1986).

Sin embargo, la contribución de las enterotoxinas a la patogénesis de la infección permanece pobremente definida (Finlay et al., 1989).

Las enterotoxinas citotónicas mejor caracterizadas son la toxina del cólera (CT) y las enterotoxinas de Escherichia coli lábil y estable al calor, (LT y ST respectivamente).

El cólera es una enfermedad diarreica, causada por Vibrio

cholerae, bacteria gram negativa. Los dos biotipos de V. cholerae, la clásica y El Tor, son capaces de causar cólera endémica y pandémica. Esta bacteria sintetiza y excreta la CT, una enterotoxina lábil al calor principalmente responsable para la diarrea observada en cólera.

La proteína CT esta compuesta de dos tipos de subunidades, la subunidad A (peso molecular <P.M.> de 27,215 Da) y la subunidad B (P.M. de 11,677), codificadas por los genes ctxA y ctxB. La toxina completa esta compuesta de cinco subunidades B y una subunidad A, y la subunidad B es expresada en cantidades mayores que la subunidad A (Pearson et al., 1982).

La subunidad B contribuye a la unión de la toxina, al receptor de superficie de células eucariotas GM1, y posiblemente facilita la entrada de la subunidad A hacia la célula. La subunidad A debe ser cortada proteolíticamente para ser enzimáticamente activa y tóxica; el péptido del amino terminal, A1, cataliza la transferencia del ADP-ribosa porción del NAD, al componente Gs del sistema regulatorio de la adenilato ciclasa de los mamíferos. La acción de CT en Gs causa un en la actividad de la adenilato ciclasa. Los niveles incrementados de AMP cíclico (AMPC) resultantes causan cambios en los flujo de iones en el intestino, que produce la característica diarrea acuosa del cólera (Betley et al., 1986).

Estudios genéticos y de hibridación con DNA de V. cholerae, muestran que los genes para CT no estan codificados en bacteriofagos y plásmidos, como para LT de E. coli que se encuentra codificada, en plásmido (Gerdes et al., 1975; Kaper et al., 1981).

LT y CT cruzan antigénicamente y tienen una estructura y

propiedades bioquímicas similares (Dallas et al., 1979).

El análisis de los genes clonados de la toxina del cólera muestran que ctxA y ctxB forman un solo operón, habiendo un solo promotor para los dos genes. El orden de los genes fué confirmado por secuenciación de CT.

La secuenciación de los genes CT también permitió saber que las subunidades A y B son sintetizadas inicialmente con secuencias señal de 18 y 21 aminoácidos hidrofóbicos, respectivamente. (Mekalanos et al., 1983). Las cadenas de CT sintetizada en E. coli, de clonas recombinantes, no son cortadas y tienen una baja toxicidad específica, a menos que sean tratadas con tripsina. CT y LT son proteínas periplasmáticas cuando son sintetizadas en E. coli y extracelulares cuando son producidas en V. cholerae (Pearson et al., 1982). Esto sugiere que E. coli carece de la maquinaria celular requerida para la excreción de estas toxinas. La secreción extracelular de la subunidad B de CT por V. cholerae no es dependiente de la subunidad A. En contraste, la subunidad A de LT aparentemente requiere de la subunidad B de LT para su transporte extracelular por V. cholerae (Betley et al., 1985).

La regulación responsable para el mantenimiento de la expresión (radio: 5 de B:1 de A) puede ser traduccional. Una fusión del gene ctxB, puesto, bajo el control de las señales de transcripción de ctxA, dió como resultado una disminución de aproximadamente nueve veces la síntesis de la subunidad B en comparación con el gene de la cepa silvestre. Esto sugiere que el sitio de unión a los ribosomas para la subunidad B promueve la traducción más eficientemente que el sitio de unión al ribosoma de la subunidad A (Mekalanos et al., 1983).

Las regiones del promotor para varios operones ctxAB han sido secuenciados (Genaro et al., 1983; Lockman et al., 1984). Estas secuencias son idénticas excepto para un determinado número de repeticiones en tándem (en fila). Análisis por delección, del promotor ctx, ha confirmado la importancia de estas repeticiones para la activación por el gene de regulación positiva toxR. (Betley et al., 1986).

Algunas cepas de E. coli sintetizan una enterotoxina lábil al calor (LT) la cual está estrechamente relacionado a la tóxina del cólera. LT y CT tienen determinantes antigénicos, actividad y subunidades similares. Los genes para CT y LT muestran considerable homología (Moseley et al., 1980).

Los genes para LT están contenidos en una familia de plásmidos llamados plásmidos Ent (Elwell et al., 1980). LT es producida por cepas de E. coli humana y porcina (LTh y LTp). Los genes para LTh han sido designados elth (Dallas, 1983) o tox (Yamamoto et al., 1982). Los genes para LTp han sido designados eltp. LTh y LTp están estrechamente relacionados inmunológicamente pero no son idénticos (Geary et al., 1982). A nivel de nucleótidos, LTh y LTp están más estrechamente relacionados que a la tóxina del cólera.

Las secuencias nucleotídicas de los genes LTh y LTp han sido determinados y se han deducido los productos de los genes. La comparación de la secuencia nucleotídica de ctxAB y eltAB mostraron que los cistrones A y B son 75% y 77% homólogos, respectivamente; en contraste a los genes estructurales de CT y LT, Los dos promotores de estas toxinas no mostraron similitud significativa (Mekalanos et al., 1983). Los genes elta y eltB forman un operón, con el

promotor proximal a eltA. El codon de terminación para toxA se traslapa con el codon de iniciación de toxE por un par de bases. Este traslape junto con un sitio separado de unión a ribosoma muy eficiente para toxE, debe estar involucrado en el control traduccional propuesto para el radio de expresión de las subunidades LT (Yamamoto et al., 1985).

Algunas especies de Salmonella tienen actividad enterotóxigenica (Koupal et al., 1975). Dos factores de permeabilidad en piel han sido aislados de S. typhimurium y que son diferentes en pruebas de: estabilidad al calor, tiempo de reacción al estímulo, e inducción del endurecimiento en piel de conejo (Sandefur et al., 1976). El factor de permeabilidad lábil al calor, el cual causa retraso a la reacción y endurecimiento, es una enterotoxina que causa acumulación de fluido en asas ligadas de intestino de conejo, elonga células de ovario de hamster Chino (CHO) e incrementa los niveles de AMPc.

Estas actividades fueron neutralizadas por anticuerpos antitóxina de cólera o gangliósidos (Sandefur et al., 1977). Esta enterotoxina de Salmonella ha sido purificada y esta relacionada inmunológicamente y bioquímicamente a CT (Finkelstein et al., 1983). La localización de los genes para la enterotoxina de Salmonella no han sido determinados pero parece que no están asociados a bacteriofagos (Houston et al., 1982). Se ha reportado que algunas cepas de Salmonella sintetizan mas toxina bajo condiciones de bajo hierro (Jiwa et al., 1981). Recientemente Chopra et al. (1987) reportó la clonación molecular de una enterotoxina de S. typhimurium similar a la toxina del cólera.

Introducciones generales a las características de las

enterotoxinas han sido realizadas por nosotros (Fernández et al., 1988) y por otros (Betley et al., 1986., Finkelstein et al., 1987., Eidels et al., 1983., Gemmell., 1984., Middlebrook et al., 1984).

Tratamiento de la FT

Sin un tratamiento antimicrobiano específico, la FT sigue un curso prolongado, de 3-4 semanas después de su inicio, y los síntomas disminuyen lentamente de no existir complicaciones. Es común la fiebre continua durante la segunda y la tercera semana de la enfermedad, para después disminuir lentamente.

Afortunadamente, hoy en día hay varios y efectivos agentes antimicrobianos. El tratamiento de primera elección es el cloranfenicol, administrado a 50 mg/kg/día en cuatro dosis, por un mínimo de dos semanas. También se puede tratar con ampicilina, 100 mg/kg/día en cuatro dosis; cotrimoxazole (320 mg de trimetoprim/ 600 mg de sulfametoxazole)/día en dos dosis. Más recientemente, otros antibióticos tales como las cefalosporinas de tercera generación o las quinolonas de nueva generación han probado ser de utilidad. Aún con los antibióticos, la convalecencia sin complicaciones produce daño en pacientes por lo menos durante tres semanas, con una sustancial pérdida de la productividad.

Otras Salmonella causan gastroenteritis ("envenenamiento por alimentos") y paratifoidea en el hombre, con dolor de cabeza, escalofríos, dolor abdominal, náuseas, vómito y diarrea; los síntomas aparecen de 8-48 horas después de la infección y duran de 1-4 días. En contraste a la FT, los cultivos de sangre son raramente positivos y el diagnóstico es realizada por el aislamiento del

microorganismo a partir de las heces.

S. typhimurium es una de las principales causas de dichas gastroenteritis, y produce en el ratón una fiebre entérica invasiva que se parece a la FT en el hombre. (Calva et. al., 1988).

Epidemiología

Se estima que hay 12.5 millones casos de FT anualmente en el mundo (excluyendo China). Esto representa una incidencia de 365 por cada 100,000 habitantes de la población total y 540 por cada 100,000 habitantes de los países en desarrollo (0.5%).

La tasa mundial de caso-fatalidad es alrededor de 1%, siendo este dato similar en México.

Las personas que eliminan S. typhi son la principal fuente de contaminación. Los portadores crónicos pueden excretar hasta 10×10^{10} organismos por gramo de heces. Se ha estimado, por ejemplo, que existen 694 portadores por cada 100,000 habitantes en Santiago, Chile. Los datos epidemiológicos de México (1980-7) muestran una incidencia anual de 0.01 a 0.02%. Los datos fueron obtenidos de la población abierta que recibe atención médica en clínicas y hospitales dependientes del gobierno, y de la población afiliada al Instituto Mexicano del Seguro Social, la cual abarca más de la tercera parte de la población total. Sin embargo, este esquema probablemente representa una estimación baja, debido a que no se reportan todos los casos. Algunos casos probablemente no son diagnosticados adecuadamente y otros son tratados en casa sin vigilancia médica o por médicos particulares quienes comúnmente no los reportan a las instancias nacionales de salud. Así mismo, la mayoría de los casos se presentan durante los meses lluviosos de

abril a octubre.

Se pensaba que en condiciones sanitarias muy pobres eran primariamente los niños pequeños los mas afectados (Hornick et al. 1985), aunque parece ser que los niños menores de dos años de edad cursan con infecciones benignas (Ferrecio et al ., 1984). En México, los niños menores de cinco años de edad reportados como afectados representan alrededor del 5% de los casos; 50% corresponde a individuos en la edad comprendida de 15 a 44 años. En 1979, los mexicanos en estos limites de edad representaron 18 y 41% de la población, respectivamente. Otros reportes indican que los pacientes con FT de los países en desarrollo tienen una edad promedio de 16 años, y están principalmente en el rango de 5-19 años (Levine et al., 1987). Para los casos que involucran perforación intestinal, la edad promedio es de 22 años (Butler et al., 1985). En estudios realizados con voluntarios en EU, se demostró que la tasa de morbilidad y el periodo de incubación son dependientes de la dosis de infección. Con una dosis infectiva de 10 exp 5 microorganismos, la tasa de morbilidad fué de 38% y el periodo promedio de incubación fué de 13 dias, mientras que con 10 exp 9 microorganismos el cuadro se presentó en un 90% de los casos en 6 dias (Hornick et al . . , 1985).

Patogenesis

En la actualidad, no existe un modelo animal para el estudio de S. typhi. Este hecho posee un reto y algunas extrapolaciones han sido a partir de las investigaciones en ratones infectados con S. typhimurium.

Se ha demostrado que S. typhimurium atraviesa el epitelio intestinal a través de las células M (membranosa) e invadiendo las placas de Peyer, llegando al sistema reticuloendotelial, multiplicándose dentro de los macrófagos e invadiendo los nodulos linfáticos mesentéricos, bazo e hígado.

Los mecanismos involucrados en adherencia de Salmonella a células epiteliales, penetración, resistencia a fagocitosis por macrófagos y multiplicación dentro de los macrófagos, son desconocidos (Calva et al., 1988).

Vacunas

En la actualidad existe la necesidad de vacunas, celular (viva o muerta) o acelular (basado en antígenos aislados de la bacteria), que no causen efectos adversos y que protejan totalmente a individuos de diferentes áreas geográficas, edades y niveles socioeconómicos. Las vacunas parenterales utilizadas actualmente pertenecen a una primera generación, y consisten en células completas muertas, e incluyen tanto una preparación inactivada por deshidratación con acetona (K) o con fenol-calor (L). Su eficiencia fluctúa entre 66.6% y 88.4% de protección, cuando se administran dos dosis (correspondiendo c/u a 10 exp 8-9 organismos), habiéndose determinado ésta sobre un estudio a lo largo de siete años de vigilancia. La vacuna L ha demostrado ser ligeramente menos efectiva. Sin embargo, en México y en otros países en desarrollo, la vacuna L es la más utilizada, debido a su menor costo. La tasa anual de inmunización sistemática con una dosis única de la vacuna L ha demostrado una disminución significativa en la incidencia de la FT. Una desventaja importante en la utilización de estas vacunas es que

ambas presentan efectos colaterales indeseables, especialmente con la primera dosis, tales como dolor e inflamación en el sitio de la aplicación y fiebre de más de 38 C. Por ejemplo, en un estudio hecho en Tailandia, más del 60% de los vacunados padeció de dolor de cabeza e inflamación local y más del 38% tuvo fiebre, como efectos colaterales de la vacunación. (Levine et al., 1987; Bodhidatta et al., 1987).

Más recientemente, el antígeno Vi ha sido utilizado como una vacuna parenteral. Una dosis única fue aplicada en una prueba de campo. No fué reportado efecto adverso alguno, y la protección fue similar a la encontrada con las vacunas K y L. Por lo tanto, la vacunación con Vi bien podría introducirse ampliamente. (Klugman et al., 1987).

El desarrollo de cepas atenuadas para utilizarse como vacunas vivas administradas oralmente, capaces de inducir una inmunidad más efectiva y prolongada, sin ocasionar síntomas indeseables, ha sido materia de gran interés y esfuerzo. Además, tales cepas podrían portar antígenos heterólogos, para inmunizar contra otras enfermedades infecciosas prevalentes en una región geográfica en particular (Calva et al., 1988).

Por ejemplo, una cepa vacunal viva no-virulenta que ya ha sido desarrollada, la cepa Ty21A, consiste en una mutante en UDP-galactosa-4-epimerasa, derivada de la cepa de referencia Ty2. Esta mutante es sensible a lisis in vitro inducida por galactosa. Su utilidad empleando tres dosis de 1-3 exp 9 organismos viables, ha sido reportada como altamente variable. Por ejemplo, en Santiago, Chile fue de 67% y en Alejandria, Egypto, fue de 95%. Esta

variabilidad en eficiencia parece depender, al menos en parte, del número de aplicaciones, las condiciones de almacenamiento, la formulación correcta y la dosificación; si es proporcionada a gente de áreas endémica o no endémica. Es interesante que en el estudio hecho en Santiago, Chile, una formulación con cubierta entérica fue más efectiva; en contraposición a la presentación en cápsula de gelatina, la cual es tomada después de la ingestión de bicarbonato para neutralizar la acidez gástrica. A la fecha, no está claro que la mutación epimerasa sea la única que contribuye a la abolición de la virulencia en la Ty21a (Silva et al., 1987).

Aunado a lo anterior, cepas auxótrofas de S. typhimurium y S. typhi para metabolitos aromáticos (aroA) y purina (purA) han sido desarrolladas como candidatos para vacunas orales vivas.

Tales cepas son no-virulentas, presumiblemente porque los metabolitos requeridos no están disponibles en los tejidos del hospedero. Las cepas atenuadas de S. typhimurium han demostrado que protegen completamente a ratones y becerros. Las dobles mutantes de S. typhi, aroA-purA, causan una estimulación significativa de la inmunidad celular humana en voluntarios, aunque la protección contra el reto con bacterias virulentas no ha sido probado. En la actualidad es de sumo interés valorar su eficacia protectora en humanos, mediante pruebas de campo en comunidades (Levine et al., 1987).

Así mismo, tomando como modelo animal el ratón, se reporta que inauunizando con proteínas de membrana externa (PME), y posteriormente retando con 500 DL/50 de dos cepas de S. typhi, se observó una protección del 100%. De manera parecida, se observó que inauunizando ratones con PME de S. typhimurium, éstos eran capaces de

resistir al reto con una cepa patógena (Isibasi et al., 1988).

Diagnostico de la FT.

Está claro que, particularmente en países en desarrollo, existe una gran necesidad de pruebas de diagnóstico nuevas, rápidas, altamente sensibles y específicas, así como fáciles de llevar a cabo, para detectar la FT de tal forma que permita distinguirla fácilmente de otras enfermedades febriles. Debido a que gran parte de la población de áreas en donde la FT es endémica tiene niveles altos de anticuerpos séricos a S. typhi, inducidos por su continua exposición al microorganismo, las pruebas serológicas llevadas a cabo en estas áreas son de baja especificidad para el diagnóstico de la FT. Más aún, un aumento significativo en los títulos de anticuerpos contra el antígeno O usualmente no es detectado hasta la segunda o tercera semana después del inicio de la fiebre. Por lo tanto parece que son necesarias nuevas pruebas de diagnósticas para detectar antígenos circulantes o secuencias de DNA de las bacterias, presentes en la sangre de los pacientes con FT. (Calva et al., 1988).

Diagnóstico por cultivo

Actualmente, el mejor diagnóstico preciso para detectar FT es aislar la bacteria S. typhi a partir de un aspirado de médula ósea, el cual, sin embargo, es un procedimiento impráctico y muy agresivo. Los cultivos de sangre son más comúnmente utilizados y fáciles de llevar a cabo, aunque su sensibilidad no es mayor del 90% cuando se toma un lote de tres cultivos sanguíneos consecutivos, con intervalos de 1-2 días (Edelman y Levine 1986).

Desventajas importantes relacionadas con este método son: que el aislamiento y la identificación de S. typhi toma por lo menos 72 horas; y también que los cultivos sanguíneos pueden no ser altamente sensibles en vista de la baja concentración de S. typhi circulante en sangre, 20 células/ml o menos, especialmente cuando los pacientes han tomado antibióticos antes del cultivo; siendo este último punto muy común en México (Calva et al., 1988).

OBJETIVOS

Uno de los objetivos generales de nuestro laboratorio es el iniciar la caracterización de la enterotoxina (S.E.) de S. typhi.

Los objetivos particulares de este proyecto fueron la clonación del gene para la enterotoxina S.E., la caracterización inicial de este gene y su producto, y el inicio de la determinación y análisis de la secuencia nucleotídica.

ANTECEDENTES

Hasta ahora, los antecedentes producidos por nuestro grupo de investigación en el estudio de la biología molecular de S. typhi son:

- La clonación de los genes para las proteínas de membrana externa (PMEs) OmpF y PhoE (Puentes, 1987; Puentes et al., 1987).
- La caracterización preliminar de las PMEs como inmunógenos durante la infección (Verdugo, 1989).
- La clonación, caracterización, determinación y análisis de secuencia del gene para la PME OmpC (Puentes, 1988).
- La clonación y caracterización del gene para enterotoxina S.E. (Fernández et al., 1988). Parte de este trabajo es presentado en esta tesis.

MATERIALES Y METODOS.

(a) Bacterias y Plásmidos

S. typhi IMSS-1 serotipo 9,12,d,Vi. Aislado clínico de un paciente con fiebre tifoidea, donada por el grupo del Dr. J. Kumate. del Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.

E. coli HB101 (F-, hsdS20<r-B, m-B>, recA13, ara-14, proA2, lacY1, gal K2, rpsL20<Sm-r>, xyl-5, mtl-1, supE44, -.)

E. coli JM101 (SupE. thi, <lac-proAB>, F'<traD36, proAB, lacIqZ M15>).

E. coli M159 (rec A, <uvrA>)

E. coli P678-54 (F- , thr, leu, supE, lacY, tonA, gal, mal, xyl, ara, mtl, min.) productora de minicélulas.

Plásmido pBR322 (Bolívar et al., 1977).

Bacteriófago M13 vectores mp18 y mp19. ()

Plásmido pFM24. (descrito en esta tesis)

Plásmido pEWD299. (Dallas et al ., 1979).

(b) Construcción de banco de genes de S. typhi y aislamiento del Lambda FDC1

Descritos en los apéndices I y II.

(c) Hibridación de DNA

Descrito en el apéndice I.

(d) Subclonación

El proceso de subclonación involucra la clonación de diferentes porciones de un fragmento de DNA, previamente clonado y aislado para después poder identificar la pieza más pequeña del DNA que contenga

el gene de interés. Los genes clonados pueden ser identificados por complementaridad (funcional) o físicamente por técnicas de hibridación con un DNA radiactivo como detector (Rodríguez et al., 1983).

(e) Análisis de minicélulas.

El sistema de minicélulas involucra el uso de una cepa de E coli productora de minicélulas. Estas se producen como un resultado de una mutación que causa un mal funcionamiento en la división celular, originando células más pequeñas ó minicélulas. Normalmente no contienen DNA cromosomal, pero si pueden portar DNA de plásmido.

La diferencia de tamaño entre las minicélulas y las células normales hace posible la separación de estas por métodos como el de sedimentación por velocidad (ejemplo: en un gradiente de sacarosa).

Una preparación de minicélulas que contenga plásmido es capaz de sintetizar RNA y proteína por un corto periodo después de la purificación . Cuando se incuban en presencia de precursores radioactivos, por ejemplo como ^{35}S -metionina, la síntesis de proteínas en las minicélulas será dirigida por el plásmido. Los polipeptidos radioactivos pueden ser analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y autoradigrafía. (Rodríguez et al . , 1983).

El análisis en minicélulas se hizo de acuerdo a Dougan y Kehoe, 1984, brevemente:

- 1) La cepa P678-54 con y sin diferentes plásmidos se inocula en medio M9 suplementado con casaminoácidos al 0.2% final y ampicilina a una concentración final de 0.4 mg/ml.

- 2) Se incuba a 37 C con agitación por más de 18 horas.
- 3) Se centrifugan los cultivos en botellas de 250 mls, en el rotor JA14, a 2000 rpm por 20 minutos.
- 4) Se pasa el sobrenadante a botellas limpias y se vuelve a centrifugar a 5000 rpm por 20 minutos.
- 5) Se resuspende la pastilla obtenida en 1.5 mls de BSG frío.
- 6) Se coloca la muestra en un tubo corex de 30 mls el cual contiene un gradiente de sacarosa (de 5-20%).
- 7) Se centrifuga en el rotor JS13, a 5000 rpm, 4 C por 15 minutos. Las minicélulas quedan a la mitad del gradiente.
- 8) Se extraen con una pipeta pasteur y se ponen en un tubo limpio y se les agrega 15 mls de BSG para quitar la sacarosa, se mezclan suavemente.
- 9) Se centrifugan a 5000 rpm, 4 C, por 5 minutos.
- 10) Se tira el sobrenadante y las minicélulas se resuspenden en 1.5 mls de BSG. Se vuelve a repetir el gradiente de sacarosa (se hace de 3 a 4 veces).
- 11) Se resuspenden, finalmente, en 1 ml de medio MAM a una D.O. 620nm =0.2.
- 12) Se agrega metionina (35-S) de 5-10 uCi totales y se incuba a 37 C con agitación por 30 minutos.
- 13) Se analizan las muestras en gel de poliacrilamida al 15%-SDS 0.1% y autoradiografía.

(f) Analisis de maxicélulas

El sistema de maxicélulas involucra el uso especial de una cepa de E. coli que es sensible a luz ultravioleta. La radiación a esta da como resultado un daño severo al cromosoma provocando la inhibición del crecimiento celular y la síntesis de proteínas

dirigidas por el cromosoma. Las maxicélulas radiadas aún son capaces de sintetizar proteínas a partir de un DNA exógeno, como por ejemplo de un plásmido ó de un bacteriofago. Así como en las minicélulas los polipéptidos radioactivos pueden ser examinados por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y autoradiografía. (Rodriguez et al., 1983).

El análisis en maxicélulas se hizo de acuerdo a Calhoun y Gray, 1981. Brevemente:

1) Se inocula la cepa M159 en medio CM y se incuba a 37 C con agitación, hasta que llegue a una D.O. de 600nm =0.25 (aproximadamente equivalente a 4×10^8 ufc/ml).

2) Se toma lo equivalente a 4×10^9 ufc/totales y se centrifuga en el rotor JA20, a 6000 rpm, 5 C por 10 minutos.

3) Se tira el sobrenadante y las células se resuspenden en CM frío a una concentración de 8×10^8 ufc/ml.

4) Se irradia con una lámpara de luz ultravioleta en onda corta.

5) Se mezclan las células con el bacteriofago lambda recombinante FDC1 y un control de lambda no recombinante, en una proporción de 5:1.

6) Se agrega metionina (35 -S), 10 uCi totales.

7) Se analizan las muestras en gel de poliacrilamida-SDS y por autorradiografía.

g) Medios de cultivo

M9, LB, SM, NZCYM, (descritos por Maniatis et al., 1982).

YT, BSG, (descritos por Rodriguez et al., 1983).

CM, (descrito por Clarke et al., 1967).

MAM, (medio para ensayo de metionina) Laboratorios DIFCO, Detroit,

Michigan. USA.

h) Endonucleasas de restricción

HindIII, EcoRI, HincII, SalI, BglIII, SacI, TaqI, MspI, EcoRV, PstI,
PvuII, ScaI. (Promega Biotec, Madison, WI. EUA.)

i) Otras enzimas

RNasa (Sigma, Saint Louis, MO. EUA.)

Ligasa de DNA de fago T4 (Promega Biotec. Madison, WI. EUA.)

j) Antibióticos

Cloranfenicol, Tetraciclina y Ampicilina (SIGMA, Saint Louis,
MO. EUA.)

k) Isotopos radioactivos

Metionina/Azufre 35 ca. 800 Ci/mmol

Alfa-fósforo³²-desoxiCTP/ ca. 3000 Ci/mmol

Alfa-fósforo³²-desoxiATP/ ca. 3000 Ci/mmol.

Alfa-fósforo³²-desoxiATP/ ca. 400 Ci/mmol.

Fueron obtenidos de la compañía Amersham International plc.
Inglaterra.

Alfa-azufre³⁵-desoxiATP/ ca. 500 Ci./mmol. grado secuencia. (Du
Pont Company NEN. Boston, MA. EUA.)

l) Filtros para transferencia tipo "Southern"

Papel de nitrocelulosa 0.45 microm. (Schleicher & Schuell , Inc.
Keene, N.H. USA.)

m) Otros materiales

Agarosa de bajo punto de fusión SeaPlaque (FMC Bioproducts,
Rockland, M.E. EUA).

Agarosa (BIO-RAD Laboratories, Richmond, California, EUA.)

GENECLEAN: estuche para purificación de DNA , a partir de geles de

agarosa en tris acetatos. (BIO 101, La Jolla, California, USA).

n) Preparación de DNA bacteriano

Ver apendice I

ñ) Preparación de DNA de plásmido

Los plásmidos utilizados en este trabajo se prepararon mediante amplificación del número de copias en cultivo, creciendo en fase logarítmica en presencia de cloranfenicol, seguido de lisis alcalina (Maniatis et al., 1982).

o) Minipurificación de DNA de plásmido

El método utilizado es descrito por Rodriguez et al., 1983.

p) Electroforesis en gel

-1) Geles de agarosa para DNA, descritos por Maniatis et al., 1982.

-2) Geles de poliacrilamida para DNA, descritos Maniatis et al., 1982.

-3) Geles de poliacrilamida-SDS para proteínas (Laemmli, 1970).

-4) Geles de poliacrilamida para secuencia (Tabor et al., 1987).

-5) Los amortiguadores para las electroforesis 1 y 2 son: Tris-Acetatos-EDTA (1x) y Tris-Boratos-EDTA (1x), respectivamente; descritos por Maniatis et al., 1982. El amortiguador para la electroforesis 3 está descrito por Laemmli, 1970. El amortiguador para la electroforesis 4 está descrito por Tabor et al., 1987.

q) Digestiones de DNA bacteriano y clones recombinantes con endonucleasas de restricción.

Las condiciones utilizadas para digerir con endonucleasas de restricción fueron las que recomienda la compañía que produce las enzimas, Promega Biotec, Madison, WI. USA.

r) Marcaje de DNA "in vitro" con 32P.

El marcaje interno radioactivo con 32P, en las moléculas del

DNA que se usaron como detector de hibridación, se hizo de acuerdo a la técnica de "traslado de corte" ("nick translation"). Utilizando un estuche de marcaje de la compañía Amersham International plc, Inglaterra.

s) Crecimiento de los fagos recombinantes y purificación de DNA.

Se describe en el apéndice I

t) Minipurificación de fagos recombinantes sin CsCl.

Se describe en el apéndice I

u) Detección de la enterotoxina de *E. coli*

Se describe en el apéndice I

v) Secuenciación

La secuenciación se realizó utilizando un estuche de "sequenase" (United States Biochemical Corporation, USB, Cleveland, Ohio).

w) Análisis de secuencia nucleotídica.

El análisis de la secuencia se realizó utilizando el programa SEQUENASE ANALYSIS PROGRAMS MANUAL. (Manual de programas para análisis de secuencias) (Martinez et al., 1987).

A P E N D I C E I

Notes

Molecular cloning of a *Salmonella typhi* LT-like enterotoxin gene

M. Fernández,¹ J. Sierra-Madero,² H. de la Vega,^{1*} M. Vázquez,¹ Y. López-Vidal,² G. M. Ruiz-Palacios² and E. Calva^{1†}

¹Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México.

²Departamento de Infectología, Instituto Nacional de la Nutrición, Vasco de Quiroga 15, México, DF 14000, México.

Summary

Diarrhoea is a common event during typhoid fever; nevertheless, the possible participation of a diarrhoea-inducing enterotoxin has not been described (Roy *et al.*, 1985). Recombinant bacteriophage λ FDC1 was isolated from a genomic library of *Salmonella typhi*, the causal agent of typhoid fever, by screening with a probe for the B subunit gene of the heat-labile, cholera-like, *Escherichia coli* enterotoxin (LT). λ FDC1 codes for an enterotoxin that causes secretion in rat ileal loops, that elongates Chinese hamster ovary (CHO) cells, that is recognized by antibodies against LT, and does not bind *in vitro* to ganglioside G_{M1}. These results should allow further studies towards elucidating a possible role for the *S. typhi* enterotoxin in the pathogenesis of typhoid fever.

Introduction

Typhoid fever in humans results from a systemic infection by the Gram-negative enterobacterium *Salmonella typhi*. Typhoid fever is propagated by the faecal-oral route, and it mainly affects inhabitants of the developing world, especially in regions with inadequate water sewage disposal or an unsafe water supply (Homick, 1985).

The reported frequency of diarrhoea in patients with typhoid fever has varied from less than 33% to more than

50% (Roy *et al.*, 1985). The existence of a cholera-like diarrhoea-producing enterotoxin in the genus *Salmonella* was proposed as a result of clinical observations (Axon and Poole, 1973). Nevertheless, Roy *et al.* (1985) concluded that there was neither a heat-labile nor a heat-stable enterotoxin in *S. typhi*; they proposed that typhoid diarrhoeal mechanisms were different from those of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Shigella* species. In contrast, several groups have detected an enterotoxin in members of the *Salmonella* genus (particularly in *S. typhimurium*) which is similar to the *Vibrio cholerae* enterotoxin (CT) and the LT enterotoxin (Sakazaki *et al.*, 1975; Koupal and Deibel, 1975; Sandefur and Peterson, 1976; Sandefur and Peterson, 1977; Kühn *et al.*, 1978; Houston *et al.*, 1981; Jiwa, 1981; Finkelstein *et al.*, 1983; Kaura and Sharma, 1983; Baloda *et al.*, 1984; Wallis *et al.*, 1986; Hariharan *et al.*, 1986).

The CT and LT holotoxins contain an immunodominant B region and an A region. The B region is composed of five identical non-covalently-bonded polypeptide subunits. The CT/B and the LT/B subunits each consist of 103 amino acids, and comprise the binding site of the holotoxin to host cell membrane receptors that contain the oligosaccharide moiety of ganglioside G_{M1}. At the amino acid level, the B subunits of LT of porcine (P-LT) and human (H-LT) origin differ from the original CT/B in 21 and 19 residues, respectively. P-LT/B and H-LT/B differ from each other in four amino acids. The A region is formed by one polypeptide that is synthesized as a single chain. In P-LT, the A polypeptide has 236 amino acids; in CT it has 240. In *V. cholerae* this A polypeptide is found as an A1 peptide of c. 21.8 kilodaltons (kD) and an A2 peptide of c. 5.5 kD, which are joined by a disulphide bond. The cleavage that generates A1 and A2 activates the A1 peptide, which contains the ADP-ribosyltransferase associated with the biological (enterotoxic) activity. The LT/A polypeptide is found largely intact; it is also activated by protease cleavage (Finkelstein *et al.*, 1987). Between CT and LT, there is an 80% amino acid sequence similarity at the amino terminus of the A1 subunit, and a 31 to 55% similarity at the A2 polypeptide (Eidels *et al.*, 1983).

Recently, Chopra *et al.* (1987) reported the molecular cloning of an *S. typhimurium* cholera-like enterotoxin gene. In this paper we describe the isolation of an LT-like enterotoxin gene from *S. typhi*.

Received 20 May, 1988. *Present address: CIMESTAV-Irapuato, Apartado Postal 629, Irapuato, Guanajuato 36650, México. †For correspondence.

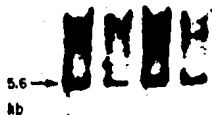


Fig. 1. Autoradiogram showing the hybridization of the [32 P]-labelled LT/B subunit gene contained in the 0.56 kb EcoRI-HindIII fragment of plasmid pEWD299 to a Southern blot of HindIII-digested *S. typhi* total genomic DNA from strains MK30 (a), IMSS-1 (b), Ty2 (c), and Rawlings (d).

Results

Hybridization of *S. typhi* total DNA with the EcoRI-HindIII fragment of plasmid pEWD299

To look for the presence of an LT-like enterotoxin gene in *S. typhi*, we used the EcoRI-HindIII 0.56 kilobase (kb) pair DNA fragment from plasmid pEWD299 (Dallas et al., 1979) as a hybridization probe, labelled with 32 P to a high specific activity. This fragment contains the entire LT-B subunit gene. DNA from several *S. typhi* (serotype 9, 12, d, V) strains was cut with HindIII, and the resulting fragments were separated by agarose gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose paper. The blots were hybridized and washed under non-stringent conditions and subjected to autoradiography. The autoradiograms revealed the presence of a 5.6 kb hybridizing band in all

strains tested (four are shown in Fig. 1). These include reference strains Ty2 and Rawlings (see *Experimental procedures*), and 18 clinical isolates from Mexican patients. No radioactive band was obtained when the probe was plasmid vector pBR313, or the LT-A subunit gene (not shown).

Isolation of λ FDC1

We isolated the above-mentioned hybridizing DNA region from IMSS-1, a Mexican reference clinical isolate. We used a genomic library, constructed in our laboratory by introducing 10 to 20 kb DNA fragments, from a partial *Sau*3A restriction endonuclease digest, into the BamHI restriction sites of coliphage λ vector 1059. Phage DNA was isolated from pools of 24 recombinant phage, as described in *Experimental procedures*. After cutting with HindIII, nitrocellulose blots were prepared with DNA from 72 pools, and hybridized. From one pool we isolated recombinant phage λ FDC1, which carries a 5.6 kb hybridizing band (Fig. 2, lanes b-d). This screening approach enables the detection of relatively weak radioactive bands, without a host *E. coli* DNA background.

Enterotoxin activity coded by λ FDC1 in rat ileal loops and CHO cells

Supernatants from lysates of λ FDC1-infected *E. coli* Q359 cells were positive for enterotoxin activity when tested in the rat ileal loop assay (Table 1). Only background-level activity was seen with lysates from λ 1059 phage *E. coli* Q358 (or Q359)-infected cells. Furthermore, λ FDC1, but not λ 1059, supernatants caused elongation of CHO cells in the assay system of Guerrant et al. (1974) (not shown).

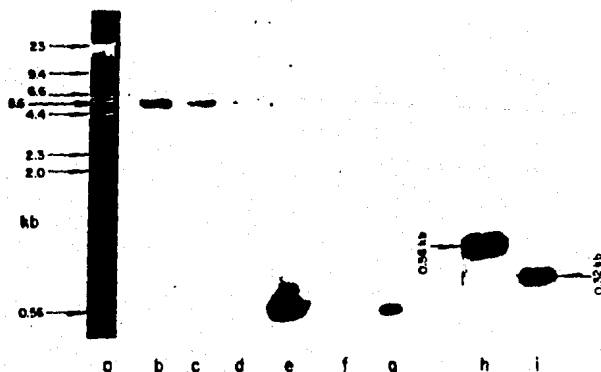


Fig. 2. Hybridization of Southern-blotted λ FDC1 DNA and pEWD299 with the LT/B 0.56 kb EcoRI-HindIII radioactive gene fragment (lanes b-e) and with the 24-mer radioactive CT-LT/B trp88 oligonucleotide (lanes f-i). HindIII-cut λ FDC1 DNA: ethidium bromide-stained agarose gel electrophoretic pattern (a); autoradiograms of lanes containing 200 (b), 100 (c), 50 (d) and 200 (f) ng of the 5.6 kb band. pEWD299 containing 10 (e, g) or 100 ng (h) of the 0.56 kb band (carrying the whole LT/B gene), or 50 ng (i) of the 0.32 kb EcoRI-HindIII fragment (carrying only the carboxy-terminal side of the LT/B gene).

Probing with a CT-LT/B trp88 oligonucleotide

The 5.6 kb band of λ FDC1 DNA did not hybridize (Fig. 2, lane f) to the mixed oligonucleotide shown in Fig. 3 which we designed to be complementary to the coding region around tryptophan 88 (mature polypeptide without the leader sequence) of the B subunit genes of CT and LT (Lockman and Kaper, 1983; Leong *et al.*, 1985). It has been proposed that this tryptophan participates in the binding of CT to ganglioside G_{M1} , which appears to be a vital component of the cell surface receptor for CT (De Wolf *et al.*, 1981; Eidels *et al.*, 1983). In pEWD299 this coding region is contained either in the 0.56 kb *EcoRI-HindIII* fragment (Fig. 2, lanes g, h) or in a 0.32 kb *EcoRI-HincII* fragment (Fig. 2, lane i). The latter contains codons 56–104 on the carboxy-terminal side of LT/B (Dallas *et al.*, 1979; Dallas and Falkow, 1980).

ELISA with antibodies against LT and with ganglioside G_{M1}

A double 'sandwich' enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed with an anti-LT monoclonal antibody (MAb), LT 39:5, adsorbed to the plate as capture antibody, and with rabbit LT polyclonal antibodies as second ligands, was positive for λ FDC1 lysates. In contrast, the ELISA was negative when ganglioside G_{M1} was used as the capture ligand (Table 1). This result is in accord with the oligonucleotide hybridization data presented above and suggests the possibility that the *S. typhi* enterotoxin has a cell receptor which differs from that of CT and LT.

Discussion

We have isolated an *S. typhi* gene coding for an enterotoxin that has similarities with CT and LT. The enterotoxin, coded by recombinant coliphage λ FDC1, causes fluid secretion in rabbit ileal loops, elongates CHO cells, and is antigenically similar to LT when probed with antibodies in an ELISA. λ FDC1 DNA has some sequence homology with the LT/B subunit gene; interestingly, under the same hybridization detection conditions, we did not observe homology with the LT/A subunit gene. Nevertheless, the fact that enterotoxic activities can be detected in the rat ileal loop and CHO cell-elongation assays suggests that the *S. typhi* enterotoxin has a functionally CT-LT/A-like subunit.

We are interested in finding the similarities and differences, at the functional and structural level, of the *S. typhi* enterotoxin compared with other members of the cholera family. It is important to find out about its distribution and expression in other clinical isolates from different geographical origins. The possible role of the λ FDC1 gene

Oligo: 3' TT^C AAT ACA CAT ACC TT^A TT^A TTT 5'

Amino acids: Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys

Position: 84 85 86 87 88 89 90 91

CT/B: 5' AAG TTA TGT GTA TGG AAT AAT AAA 3'

LT/B: 5' AAA TTA TGT GTA TGG AAT AAT AAA 3'

Fig. 3. Sequence of the mixed-oligonucleotide probe that we designed to be complementary to the coding region around tryptophan at position 88 (mature polypeptide) of the CT and LT/B subunit genes. The sequence allows for codon divergence at lysine 84, and asparagines 89 and 90. The CT/B and LT/B nucleotide sequences are as reported by Lockman and Kaper (1983) and by Leong *et al.* (1985), respectively.

product in the pathogenesis of typhoid fever remains an open question.

Experimental procedures

Strains and plasmid

S. typhi IMSS-1 was isolated from a patient with typhoid fever and was kindly provided by Dr Jesús Kumate and collaborators from the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City. Seventeen *S. typhi* clinical isolates (MK series) were collected by us at the Instituto Nacional de la Nutrición in Mexico City. *S. typhi* reference strains Ty2 and Rawlings were obtained from the American Type Culture Collection (Nos 19430 and 167, respectively). *E. coli* Q358 and Q359, as well as coliphage vector λ 1059, are described by Kam *et al.* (1980). Plasmid pEWD299 (Dallas *et al.*, 1979) was a gift from Dr Walter Dallas of The Wellcome Research Laboratories.

Table 1. Detection of the *S. typhi* enterotoxin by the rat ileal loop assay and by ELISA.

Supernatant samples	Rat ileal loop assay. Fluid secretion (ml)/loop length (cm)	Double sandwich ELISA	G_{M1} ELISA
Rawlings strain ^a	0.80 ^b	0.630	0.186
λ FDC1 lysate	0.82	0.619	0.178
λ 1059 lysate	0.10	0.288	0.182
Purified CT ^c	0.98	1.41	0.700
Crude LT ^c	ND	1.10	0.572

a. Overnight culture.

b. Loops were considered positive with values above 0.3.

c. $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ were used in the rat ileal loop assay and in the ELISA, respectively; crude LT was a preparation performed as in Clements and Finkelstein (1979) that did not undergo the last Saphcnryl S-200 chromatography step. All data are the mean ratios of five experiments. ND, not determined.

DNA hybridization

S. typhi total genomic DNA was isolated as described by Bellach et al. (1976). In order to screen our *S. typhi* recombinant phage genomic library, we seeded the phage onto lawns of *E. coli* Q359 in pools of 24 from which they were eluted for growth in liquid culture (Puente et al., 1987). Recombinant bacteriophage DNA was isolated as described by Maniatis et al. (1982).

DNA was cut with the site-specific restriction endonuclease *Hind*III, separated by agarose gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose filters as described by Southern (1975). The *Eco*RI-*Hind*III fragment from pEWD299 (Leong et al., 1985) containing the LT/B subunit gene was isolated by preparative agarose gel electrophoresis, and [³²P]-labelled to 10⁶-10⁸ cpm μg⁻¹ using a commercially available nick-translation labelling kit (Amersham International, UK). The filters were hybridized in 1 ml per lane of 50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 100 μg ml⁻¹ calf thymus DNA, 5X SSC (0.75M NaCl, 0.075M Na-citrate), 10X Denhardt's solution (0.2% each of ficoll, polyvinylpyrrolidone and bovine serum albumin), 30% formamide and 10⁷ of the radioactive probe, for 18 h at 42°C. Prehybridization was for 2 h in the same solution without probe. After hybridization, the filters were washed twice in 2X SSC plus 0.1% SDS and once in 2X SSC, at 25°C, and subjected for 2 days to autoradiography at -70°C using Kodak X-OmatK film and enhancing screens.

The CT-LT/B trp88 oligonucleotide was synthesized on solid support using automated phosphoramidite chemistry (Nielsen et al., 1986). It was purified by preparative polyacrylamide gel electrophoresis, [³²P]-labelled (10⁶-10⁸ cpm μg⁻¹) at the 5' end with T4 polynucleotide kinase and gamma-[³²P]-ATP, and separated from the unincorporated substrate, following standard procedures (Matthes et al., 1984; Maniatis et al., 1982). The radioactive oligonucleotide was hybridized at 2 × 10⁶ cpm ml⁻¹ in 6X NET (0.9M NaCl, 6mM EDTA, 90mM Tris-HCl pH 7.5), 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS, 10% dextran sulphate, at 20°C for 18 h. Prehybridization of the Southern blots was for 2 h under the same conditions, but in the absence of radioactive probe. Post-hybridization washes were twice in 6X SSC for 15 min at 25°C.

Preparation of phage lysate supernatants

Phage were grown in CY medium supplemented with Tris-HCl and MgCl₂ (Kam et al., 1980) by infecting and lysing *E. coli* Q358 or Q359, using the preabsorption-dilution-shaking method of Blattner et al. (1977). Lysate supernatants, containing about 10⁹ phage ml⁻¹, were obtained after removing the cell debris by centrifugation at 4000 × g for 10 min. The supernatants were placed inside dialysis bags and concentrated 3-fold at 4°C over polyethylene glycol prior to enterotoxin determinations.

Rat ileal loop assay

Assays for enterotoxic activity were performed in the rat ileal loop model essentially as described by Klipstein and Engert (1979). Five to seven 5-cm-long intestinal loops were tied in male (150 to 200 g) Wistar rats. Duplicate samples of 0.3 ml were tested and injected at random positions. Ileal loops injected with 0.3 ml of PBS (25mM Na/K phosphate (pH 7.4), 0.15M NaCl) were included as negative controls.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISAs were done essentially as described by Voller et al. (1980) and Ruiz-Palacios et al. (1985), using 0.15 ml samples. LT 39-5 is a MAb that reacts with LT in the presence of ganglioside G_{M1}; it was kindly donated by Dr Ann-Mari Svennerholm of the University of Göteborg (Svennerholm et al., 1986).

CHO cell enterotoxin assay

The assay was performed as described by Guerrant et al. (1974). Microscopic determinations were done after the phage supernatant samples (0.2 ml) were incubated with the CHO cells (5 × 10⁵ in 0.25 ml) for 18 h at 37°C. Cell elongation of 60% or more was considered as a positive result.

Acknowledgements

This project was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (PCSA-BNA-030735) and from the United Nations Program for Latin American Biotechnology Development (UNESCO contract No. 249.824.7). The CT-LT/B trp88 oligonucleotide was synthesized at the Service Facilities of the University of Wisconsin Biotechnology Centre, Madison, Wisconsin, USA by Dr Ron L. Niece. We thank Drs Paul M. Lizardi and Lourival Possani for critically reviewing the typescript.

References

- Axon, A.T.R., and Poole, D. (1973) Salmonellosis presenting with cholera-like diarrhoea. *Lancet* 7: 745-746.
- Baloda, S.B., Faris, A., Krovacek, K., Rönnerberg, B., and Wadström, T. (1984) Cytotoxic enterotoxins and cytotoxic factors produced by *Salmonella*. In *Bacterial Protein Toxins*. Alout, J.E. et al. (eds). London: Academic Press, pp. 365-366.
- Bellach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M., and Boyer, H.W. (1976) A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *Eco*RI restriction modification of DNA. *Fed Proc* 35: 2037-2043.
- Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L., and Smithies, O. (1977) Charon phages: safer derivatives of bacteriophage λ for DNA cloning. *Science* 198: 161-169.
- Chopra, A.K., Houston, C.W., Peterson, J.W., Prasad, R., and Mekalanos, J.J. (1987) Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. *J Bacteriol* 169: 5095-5100.
- Clements, J.D., and Finkelstein, R.A. (1979) Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect Immun* 24: 760-769.
- Dallas, W.S., Gill, D.M., and Falkow, S. (1979) Clonings encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. *J Bacteriol* 139: 850-858.
- Dallas, W.S., and Falkow, S. (1980) Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature* 286: 499-501.
- De Wolf, M.J.S., Fridkin, M., and Kohn, L.D. (1981) Tryptophan residues of cholera toxin and its A and B protomers. Intrinsic fluorescence and solute quenching upon interacting with the ganglioside G_{M1}, oligo-G_{M1} or dansylated oligo-G_{M1}. *J Biol Chem* 256: 5489-5496.

- Eidels, L., Proia, R.L., and Hart, D.A. (1983) Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol Rev* 47: 596-620.
- Finkelstein, R.A., Marchlewics, B.A., McDonald, R.J., and Boesman-Finkelstein, M. (1983) Isolation and characterization of a cholera-related enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett* 17: 239-241.
- Finkelstein, R.A., Burks, M.F., Zupan, A., Dalles, W.S., Jacob, C.O., and Ludwig, D.S. (1987) Epitopes of the cholera family of enterotoxins. *Rev Infect Dis* 9: 544-551.
- Guerrant, R.L., Bruntton, L.L., Schnaitman, T.C., Rebhun, L.I., and Gilman, A.G. (1974) Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive *in vitro* assay for enterotoxins of *Vibrio cholera* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 10: 320-327.
- Hariharan, H., Booth, B.A., Brickman, T.J., Katt, W.C., Boesman-Finkelstein, M., and Finkelstein, R.A. (1986) Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for cholera-related enterotoxins in *Salmonella typhimurium*. *J Clin Microbiol* 24: 298-300.
- Hornick, R.B. (1985) Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XX. Typhoid fever. *Rev Infect Dis* 7: 536-546.
- Houston, C.W., Koo, F.C.W., and Peterson, J.W. (1981) Characterization of *Salmonella* toxin released by mitomycin C-treated cells. *Infect Immun* 32: 916-926.
- Jwa, S.F.W. (1981) Probing for enterotoxigenicity among the *Salmonellae*: an evaluation of biological assays. *J Clin Microbiol* 14: 463-472.
- Kaura, Y.K., and Sharma, V.K. (1983) Production, partial purification and characterization of *Salmonella* heat-labile enterotoxin. *Zbl Bakt Hyg A* 258: 87-102.
- Klipstein, F.A., and Engen, R.F. (1979) Protective effect of active immunization with purified *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in rats. *Infect Immun* 23: 582-589.
- Koupal, R.L., and Deibel, R.H. (1975) Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect Immun* 11: 14-22.
- Kühn, H., Tschäpe, H., and Rische, H. (1978) Enterotoxigenicity among *Salmonellae*. A prospective analysis for a surveillance programme. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A* 240: 171-183.
- Leong, J., Vinal, A.C., and Dalles, W.S. (1985) Nucleotide sequence comparison between heat-labile toxin B-subunit cistrons from *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Infect Immun* 48: 73-77.
- Lockman, H., and Kaper, J.B. (1983) Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J Biol Chem* 258: 13722-13726.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Matthes, H.W.D., Zenke, W.M., Grundström, T., Staub, A., Wintzerith, M., and Chambon, P. (1984) Simultaneous rapid chemical synthesis of over one hundred oligonucleotides on a microscale. *EMBO J* 3: 801-805.
- Nielsen, J., Taagaard, M., Marugg, J.E., van Boom, J.H., and Dahl, O. (1986) Application of 2-cyanoethyl N, N, N', N'-tetra-isopropylphosphoramidite for *in situ* preparation of deoxyribonucleoside phosphoramidites and their use in polymer-supported synthesis of oligodeoxynucleotides. *Nucl Acids Res* 14: 7391-7403.
- Puente, J.L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y., and Calva, E. (1987) Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* 61: 75-83.
- Roy, S.K., Speelman, P., Butler, T., Nath, S., Rahman, H., and Stoll, B.J. (1985) Diarrhoea associated with typhoid fever. *J Infect Dis* 151: 1130-1143.
- Ruiz-Palacios, G.M., López-Vidal, Y., Torres, J., and Torres, N. (1985) Serum antibodies to heat-labile enterotoxin of *Campylobacter jejuni*. *J Infect Dis* 152: 413-416.
- Sakazaki, R., Tamura, K., Nakamura, A., and Kurata, T. (1974) Enteropathogenic and enterotoxigenic activities on ligated gut loops in rabbits of *Salmonella* and some other enterobacteria isolated from human patients with diarrhoea. *Japan J Med Sci Biol* 27: 45-48.
- Sandefur, P.D., and Peterson, J.W. (1976) Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 14: 671-679.
- Sandefur, P.D., and Peterson, J.W. (1977) Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of Chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. *Infect Immun* 18: 988-992.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Svennerholm, A.-M., Wikström, M., Lindholm, L., and Holmgren, J. (1986) Monoclonal antibodies and immunodetection methods for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins. In *Monoclonal Antibodies Against Bacteria*, Vol. III. Macario, A.J.L., and Conway de Macario, E. (eds). London: Academic Press, pp. 77-97.
- Voller, A., Bidwell, D., and Bartlett, A. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay. In *Manual of Clinical Immunology*, 2nd edn. Rose, N.R., and Friedman, H. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp. 359-371.
- Wallis, T.S., Starkey, W.G., Stephen, J., Haddon, S.J., Osborne, M.P., and Candy, D.C.A. (1986) Enterotoxin production by *Salmonella typhimurium* strains of different virulence. *J Med Microbiol* 21: 19-23.

A P E N D I C E II

GEN 02223

Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*

(Recombinant DNA; phage λ vector; pBR322 plasmid; *E. coli* probe; porin; osmolarity; minicell analysis)

José Luis Puente, Valia Flores, Marcos Fernández, Yolanda Fuchs and Edmundo Calva

Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271 (México)

Received 30 June 1987
Revised 13 August 1987
Accepted 24 August 1987

SUMMARY

We have isolated the structural gene for an outer membrane protein of *Salmonella typhi*, from a genomic library constructed in bacteriophage λ 1059, using the *Escherichia coli ompC* gene as a heterologous probe. *E. coli ompC* codes for an outer membrane pore protein (porin) that is induced preferentially at high osmolarity and high temperature. The *S. typhi ompC*-like gene was subcloned in pBR322 and introduced into *E. coli* HB101 and into P678-54, a minicell-producing strain. In both strains it expressed a 38.5-kDa protein, which was incorporated into the outer membrane envelope and comigrated with an *S. typhi* outer membrane protein which was expressed both at low and high osmolarity *in vivo*.

INTRODUCTION

The epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, bacteriology, pathogenesis, pharmacology and immunology of typhoid fever in man have been

Correspondence to: Dr. E. Calva, CEIINGEBI/UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271 (México) Tel. (52)(73)17-27-99.

Abbreviations: bp, base pair(s); kb, 1000 bp; *ompA*, gene coding for OmpA; OmpA, outer membrane structure protein; *ompC*, gene coding for OmpC; OmpC, outer membrane pore protein (porin); *ompF*, gene coding for OmpF; OmpF, outer membrane pore protein (porin); PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; *phoE*, gene coding for PhoE; PhoE, outer membrane pore protein (porin); SM, stabilizing medium, see MATERIALS AND METHODS, section 4; SSC, 0.15 M NaCl-0.015 M Na-citrate pH 7.6. TAE, Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer.

the subject of a recent review (Edelman and Levine, 1986). Due to its significant incidence in developing countries and to the invasive character of *S. typhi*, the causal agent of typhoid fever, it is important to develop a vaccine to protect against this disease. It also would be of value to have a very specific and sensitive test for the detection of antigen in body fluids. Currently available killed whole-cell vaccines afford only limited protection and cause adverse side effects (Tapa and Cvjetanović, 1975). An attenuated live cell vaccine, consisting of strain Ty21a, although without side effects, provides variable protection. Also, present diagnostic methods are not sufficiently fast and reliable (Edelman and Levine, 1986).

It has been shown that outer membrane protein preparations from *S. typhimurium* protect mice against salmonellosis (Kuusi et al., 1981; Udhayakumar and Muthukaruppan, 1987a); also a purified

porin elicits delayed-type hypersensitivity (Udhayakumar and Muthukkaruppan, 1987b). In addition, patients with typhoid fever generate antibodies that recognize *S. typhi* outer membrane proteins (Calderón et al., 1986). Thus, outer membrane proteins could serve as protein antigens in a cellular or acellular vaccine, or in a rapid diagnostic assay.

E. coli outer membrane proteins have been well characterized. Genes for the major porin proteins OmpC, OmpF and PhoE, which allow membrane permeability, have been cloned and sequenced. These porins are very abundant, form diffusion pores for small solutes (less than 400 to 600 Da), and serve as receptors for phages and colicins. OmpF and OmpC are regulated by the osmolarity and temperature of the growth medium. OmpC is preferentially expressed at high osmolarity (100–300 mM NaCl), where OmpF levels are very low. PhoE is induced at low phosphate concentrations; it shows selectivity for anions over cations and is proposed to participate in the scavenging and passage of phosphorylated compounds across the outer membrane. In contrast, OmpF is cation-selective; the permeability properties of OmpC are similar to those of OmpF, except that it forms the smallest pores of all three proteins. In addition to an OmpD protein, *S. typhimurium* contains OmpF, OmpC, and PhoE proteins similar to those found in *E. coli*; although their corresponding pore sizes appear to be larger (reviewed by Nakae, 1986). So far, the gene for the *S. typhimurium* structural (non-porin) outer membrane protein, OmpA, has been the only *omp* gene characterized from the *Salmonella* genus (Freudl and Cole, 1983).

No characterization of the physiological transport properties of the *S. typhi* outer membrane proteins has been reported so far. A purification scheme, some physicochemical properties, and a hemolytic effect have been described (Calderón et al., 1984).

Based on the fact that Gram-negative bacteria contain porins with similar characteristics to those found in *E. coli* (Nikaido and Vaara, 1985), we have undertaken the task of identifying, isolating and characterizing the genes for *S. typhi* outer membrane proteins using *E. coli* porin genes as heterologous probes. In this paper we describe the isolation and initial characterization of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *S. typhi*.

MATERIALS AND METHODS

(a) Strains and plasmids

S. typhi IMSS-1, a 9, 12, d, Vi serotype clinical strain isolated from a patient with typhoid fever, was kindly provided by Dr. J. Kumate and coworkers from the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City. *S. typhi* strains Ty2 and Rawlings (both of serotype 9, 12, d, Vi), and *S. typhimurium* strains NCTC74 (Mutton) and CDC6516-60 were all obtained from the American Type Culture Collection (Nos. 19430, 167, 13311 and 14028, respectively). Seventeen *S. typhi* clinical isolates of the MK series were kindly provided by Dr. G.M. Ruiz-Palacios and coworkers from the Instituto Nacional de la Nutrición, Mexico City. *E. coli* HB101, Q358, Q359, P678-54 and bacteriophage cloning vector λ 1059 have been described (Bolívar and Backman, 1979; Karn et al., 1980; Dougan and Kehoe, 1984). Plasmid pMY111 (Mizuno et al., 1983), carrying *E. coli ompC* was kindly supplied by Dr. M. Inouye; plasmid pBR322 (Bolívar et al., 1977; Balbás et al., 1986) was a gift from Dr. F. Bolívar.

(b) Construction of a *Salmonella typhi* gene library

S. typhi total DNA from strain IMSS-1 was isolated as described by Belach et al. (1976). Fragments of 10–20 kb from a partial *Sau*3A digest were introduced into the *Bam*HI sites of bacteriophage λ 1059 as described by Karn et al. (1980). Recombinant phages were generated by in vitro encapsulation, using commercially available packaging extracts (Packagene, Promega Biotec, Madison, WI) and plated onto *E. coli* Q359.

(c) DNA hybridization

Plasmid pMY111 was used as a heterologous probe. It was purified following standard procedures (Bolívar and Backman, 1979), and labeled with [α -³²P]dCTP (> 3000 Ci/mmol; Amersham International, Amersham, U.K.) to 10⁸ cpm/ μ g using a commercially available nick-translation kit (Amersham International, Amersham, U.K.). Total genomic *S. typhi* or recombinant bacteriophage λ DNA was digested using restriction endonucleases (Promega Biotec; Madison, WI). The resulting fragments

were separated by agarose gel electrophoresis and Southern-blotted onto nitrocellulose filters (Schleicher & Schuell, Keene, NH) (Southern, 1975). Unless otherwise stated, the filters were pre-hybridized for 1 h at 42°C in 6 × SSC, 10 × Denhardt's solution (0.2% each of Ficoll, polyvinyl pyrrolidone and bovine serum albumin), 0.1 mg/ml of sonicated calf thymus DNA and 40% formamide. They were hybridized with 1 ml/lane of the same solution plus 0.1% SDS, 1.0 mM EDTA and 10⁶ cpm/ml of labeled plasmid at 42°C for 18 h. Subsequently, the filters were washed four times, 15 min each, with 1 × SSC at 65°C, dried, and exposed for autoradiography to Kodak X-OmatK film using enhancing screens.

(d) Screening of the bacteriophage gene library

Two thousand recombinant bacteriophage plaques were seeded onto lawns of *E. coli* Q359. Per petri dish 24 phages were inoculated; this was done in duplicate. One copy of each pool of 24 phages was eluted with SM (0.1 M Tris · HCl pH 7.9, 0.15 M NaCl, 0.01 M MgCl₂, and 0.1% gelatin). Aliquots from six pools were used for infecting 200 ml cultures by the preabsorption-dilution-shaking method described by Blattner et al. (1977). Bacteriophage DNA was prepared from these cultures, restricted with *Bgl*II, Southern-blotted, and hybridized with a ³²P-labeled pMY111 fragment carrying only the *E. coli ompC* gene. One group of bacteriophages, containing the appropriate hybridization signal, was further analyzed in the same manner by preparing, successively, DNA from individual pools and from individual bacteriophage.

This screening strategy allowed for the adequate representation of slow-growing bacteriophages and the probing of *S. typhi* cloned DNA without interference from hybridizing *E. coli* DNA. As control, the bacteriophage Southern blots were probed with ³²P-labeled pBR322, to discard any false-positive signals from rearranged λ1059 DNA (Schoenberg, 1984).

(e) Plasmid subcloning and minicell analysis

Standard procedures (Maniatis et al., 1982) were followed for subcloning DNA fragments from recombinant bacteriophage λ1059 into pBR322; and for subsequent transformation into *E. coli* HB101 or

the minicell-producing *E. coli* P678-54. Minicells were purified, pulse-chased with [³⁵S]methionine, and analyzed by 0.1% SDS-15% PAGE as described (Dougan and Kehoe, 1984).

(f) Preparation of outer membrane envelopes

Cells were cultured in nutrient broth (Bactonutrient broth; Difco, Detroit, MI) according to Nara et al. (1984). Triton X-100 insoluble envelope fractions were obtained as described by Matsuyama et al. (1984).

RESULTS AND DISCUSSION

(a) Isolation of the *Salmonella typhi ompC*-like gene

Plasmid pMY111 hybridized to a 3.0-kb band of *S. typhi* genomic DNA cleaved with *Bgl*II (Fig. 1). This was not observed when pBR322 vector or other *E. coli* outer membrane protein genes (*ompF*, *ompA* and *phoE*), were used as probes (not shown).

Screening of the *S. typhi* genomic library gave two recombinant bacteriophages which carried the 3.0-kb *Bgl*II band (Fig. 1). They gave lower titers with respect to the bulk recombinant bacteriophage population; this could be due to a deleterious effect on the host *E. coli* cells caused by the overexpression of a cloned outer membrane protein gene (see below, section c).

One phage, λVFC1, was chosen for further analysis. The 3.0-kb band was subcloned into the *Bam*HI site of pBR322 to construct plasmid pVF27. This subclone has the structure shown in Fig. 2.

(b) Expression and mapping

Derivatives pVF271, pVF274 and pVF275, containing smaller fragments of the insert as shown in Fig. 3A, were used to transform an *E. coli* minicell-producing strain. The proteins expressed by these plasmids in minicells were labeled with [³⁵S]methionine, subjected to SDS-PAGE, and analyzed by autoradiography (Fig. 3B). Plasmids pVF27 and pVF271 produced a very intense 38.5-kDa protein and a less intense 39.5-kDa protein. The

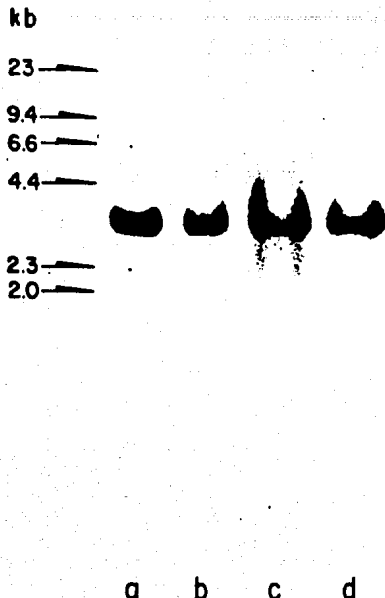


Fig. 1. Autoradiograph of the hybridization of (a, b) ^{32}P -labeled plasmid pMY111 (carrying *E. coli ompC*) to Southern blots of total genomic *S. typhi* DNA (3 μg) cut with *Bgl*II (lane a) or *Bgl*II + *Bam*HI (lane b); and (c, d) of the *Hind*III-*Sca*I ^{32}P -labeled fragment from pMY111 to purified recombinant phage λVFC1 (lane c) and λVFC2 (lane d) blotted DNA (1 μg) cut with *Bgl*II. DNA *M*, markers are indicated in kb, and correspond to wild-type λ DNA digested with *Hind*III. Electrophoresis was done at 100 V for 2 h through 1% 1.5-mm thick agarose gels in TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8). The DNA was transferred in $6 \times \text{SSC}$ to nitrocellulose membranes; and then hybridized as described in MATERIALS AND METHODS, section c. The radioactive probes had a specific activity of 10^6 cpm/ μg of DNA.

other two constructs, pVF274 and pVF275, did not express these proteins nor truncated forms. All the plasmids generated the β -lactamase (BL) vector gene product in its different forms of around 28 kDa.

To find a smaller fragment containing the whole *ompC*-like gene, Southern blots of different restriction fragments of the 3.0-kb *Bgl*II band were hybridized to the purified *Hind*III-*Sca*I fragment of pMY111 encompassing only *E. coli ompC* (Mizuno et al., 1983). Results of these experiments are shown

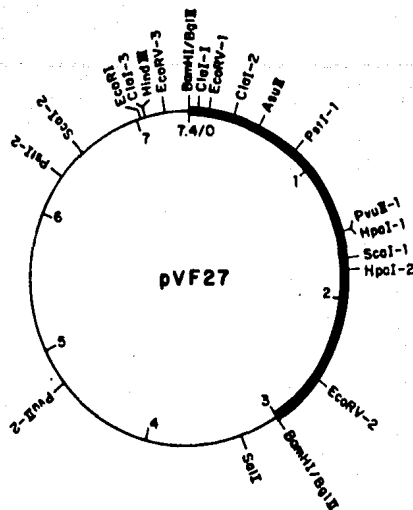


Fig. 2. Circular restriction map of plasmid pVF27, which carries the *S. typhi ompC*-like gene. The insert DNA is shown as a heavy line; the thin line represents pBR322 vector DNA. When the 3.0-kb *Bgl*II fragment from λVFC1 is ligated to the pBR322 digested with *Bam*HI, both restriction sites are lost in the recombinant plasmid pVF27. The scale is in kb.

in Fig. 4. It can be inferred that the 1.3-kb fragment that spans the region from the *Asu*II to the *Hpa*I-2 site contains the entire *ompC*-like gene since there were no hybridization signals observed in fragments pictured to the left of the *Asu*II site or to the right of the *Hpa*I-2 site. Therefore, considering that the *ompC*-like gene is located towards the left side of the 3.0-kb *Bgl*II fragment (Fig. 4), and since no protein is generated by pVF274 plasmid (Fig. 3), we deduce that the start of transcription lies to the right of the *Pvu*II site, possibly in the 0.25-kb *Hpa*I-*Hpa*I fragment. This implies that the direction of transcription proceeds to the left, from the *Hpa*I-2 to *Asu*II restriction sites. Based on the apparent *M_r* of the protein product, the structural gene should fit between these two sites.

Comparison of the *S. typhi ompC*-like gene with its counterpart in *E. coli* (Mizuno et al., 1983) reveals the conservation of the *Pst*I, *Pvu*II, and *Sca*I restriction sites in the structural gene. In contrast, there are two *Hpa*I sites in *S. typhi* that are absent in *E. coli*. Sites for *Eco*RI and *Bgl*II in *E. coli* are missing in *S. typhi*.

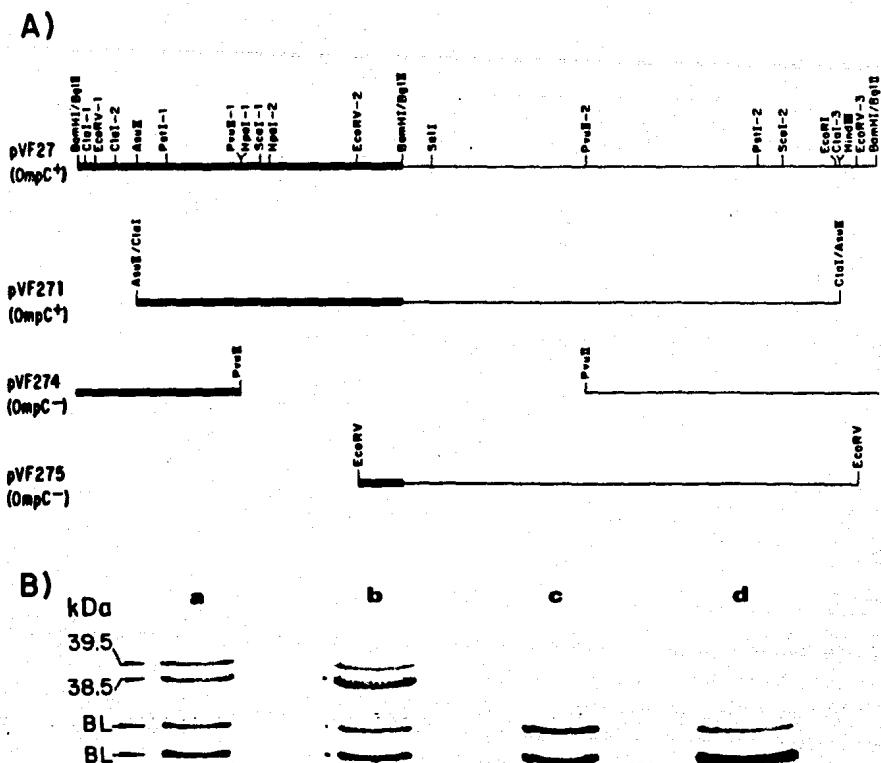


Fig. 3. Analysis of plasmid pVF27 and its products. **(A)** Diagrams of plasmids pVF27 and its derivatives, pVF271, pVF274, and pVF275. The *S. typhi* DNA inserts are shown as thick lines; thin lines represent pBR322 DNA. DNA that is missing in each plasmid is shown as gaps. Plasmids coding for the OmpC-like protein are indicated with an OmpC⁺ symbol. Deletion mutant plasmids of pVF27 were constructed digesting purified pVF27 DNA with *Ase*II + *Cla*I, *Pvu*II, or *Eco*RV. After subsequent ligation of the largest purified fragment of each restriction pattern, the DNA preparations were transformed into strain HB101, selecting for ampicillin-resistant colonies. Plasmids pVF271, pVF274 and pVF275 were selected for further characterization in minicell-producing *E. coli* P678-54. Sites for *Ase*II and *Cla*I are lost in pVF271. *Pvu*II and *Eco*RV sites are regenerated in pVF274 and pVF275, respectively. **(B)** Autoradiograph of ³⁵S-labeled proteins produced in minicells containing plasmids pVF27 (lane a), pVF271 (lane b), pVF274 (lane c), and pVF275 (lane d). The apparent protein *M_s* are indicated in kDa; BL represents the β-lactamase plasmid products. Experimental details were as described in MATERIALS AND METHODS, section e. Briefly, minicells carrying each plasmid were purified by centrifugation through 20% sucrose gradients; then, plasmid-specific products were pulse-labeled with 2.0 μCi of [³⁵S]methionine (> 800 Ci/mmol; Amersham International, Amersham, U.K.) for 30 min at 37°C, and resuspended in 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 3% SDS, 0.125 M Tris (pH 6.8), 0.1% bromophenol blue; boiled (95°–100°C) for 5 min and then analysed by 0.1% SDS–15% PAGE at 40 mA for 4 h; the gel was dried and exposed to x-ray film.

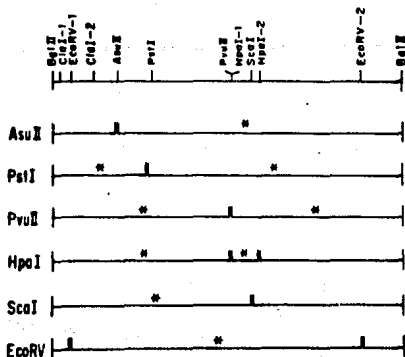


Fig. 4. Restriction map of the 3.0-kb *Bgl*II insert of *S. typhi* DNA contained in pVF27. The segments that hybridize with the *Hind*III-*Sca*I fragment of pMY111 (*E. coli ompC*) are indicated with asterisks.

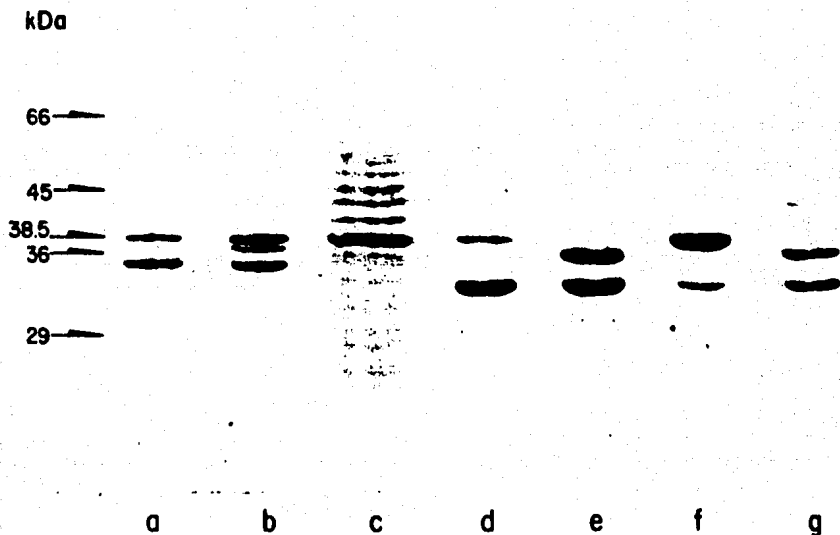


Fig. 5. Electrophoretic pattern of Coomassie brilliant blue-stained outer membrane protein preparations, separated by 0.1% SDS-15% PAGE, from: *S. typhi* IMSS-1 grown in nutrient medium in the presence (lane a) or absence (lane b) of 20% sucrose; *E. coli* HB101 (lanes d, e) and P678-54 (lanes f, g) grown in nutrient medium in the absence of sucrose carrying (lanes d, f) or not (lanes e, g) plasmid pVF27. Lane c corresponds to a total cell extract of *E. coli* P678-54 minicells harboring pVF27. The outer membrane protein preparations were obtained as follows: cells were grown to late logarithmic phase at 37°C in the appropriate culture medium. Cells were washed, resuspended in 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) and disrupted by sonication. The membrane fraction was recovered by centrifugation at 40000 rev./min in the Beckman Ti70 rotor for 30 min and then resuspended in 2% Triton X-100, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2). After incubation at 37°C for 15 min, the Triton X-100-insoluble fraction was recovered by centrifugation at 40000 rev./min for 30 min. This pellet was finally washed in 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) and resuspended in 1% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 10 M urea, and 0.005% bromophenol blue. It was boiled for 5 min and analysed by 0.1% SDS-15% PAGE at 40 mA for 4 h. Protein molecular weight markers are indicated in kDa; they correspond in descending order to plasma bovine albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), and carbonic anhydrase (29 kDa). The arrow at 38.5 kDa indicates the apparent *M_r* obtained for the OmpC-like protein.

(c) Analysis of outer membrane envelopes

Analyzing the proteins that constitute the outer membrane envelope of *S. typhi* (Fig. 5, lanes a and b), it can be observed that the *ompC*-like gene product (lane c) comigrates with a 38.5-kDa protein, which is expressed under low and high osmolarity conditions. This may indicate that regulation of the OmpC-like protein in *S. typhi* differs from that in *E. coli* since the latter is preferentially expressed at high osmolarity (Hancock, 1985). In contrast, the presence of a 37-kDa protein in the outer membrane of *S. typhi* is almost completely repressed at high osmolarity (Fig. 5, lane a), behaving in an *E. coli* OmpF-like manner.

SDS-PAGE analysis of the outer membrane proteins, purified from the two *E. coli* strains containing pVF27 (Fig. 5, lanes d and f), showed that the cloned 38.5-kDa OmpC-like protein is incorporated into the outer membrane of its host. The absence of the 39.5-kDa band (Fig. 3B) in outer membrane preparations suggests that it may correspond to an unprocessed precursor of the OmpC-like *S. typhi* protein, still carrying the uncleaved leader sequence. In *E. coli*, the *S. typhi* OmpC-like protein appears as one of the most abundant outer membrane proteins (Fig. 5, lanes d and f); interestingly, the presence of some endogenous proteins is lowered as compared with Fig. 5, lanes e and g. This might be due to the fact that the cloned gene is highly expressed, as evidenced by the predominant presence of its protein product in a total cell extract (Fig. 5, lane c). Thus, the multi-

copy gene and its product could possibly be competing favorably for expression or processing and membrane transport factors, respectively.

(d) Presence of the gene in different strains

The fact that the 38.5-kDa protein is expressed in *S. typhi* under both osmolarity conditions may be relevant to the bacteria in the environment provided by their natural host. We believe that this protein is a suitable candidate to be expressed in the serum of patients with typhoid fever, since the osmolarity of human serum is high (0.9%, or 150 mM, NaCl is nearly equivalent to 10% sucrose; Nikaido and Vaara, 1985). In this respect the *S. typhi ompC*-like gene is present in all 17 clinical isolates tested and also in *S. typhi* and *S. typhimurium* reference strains

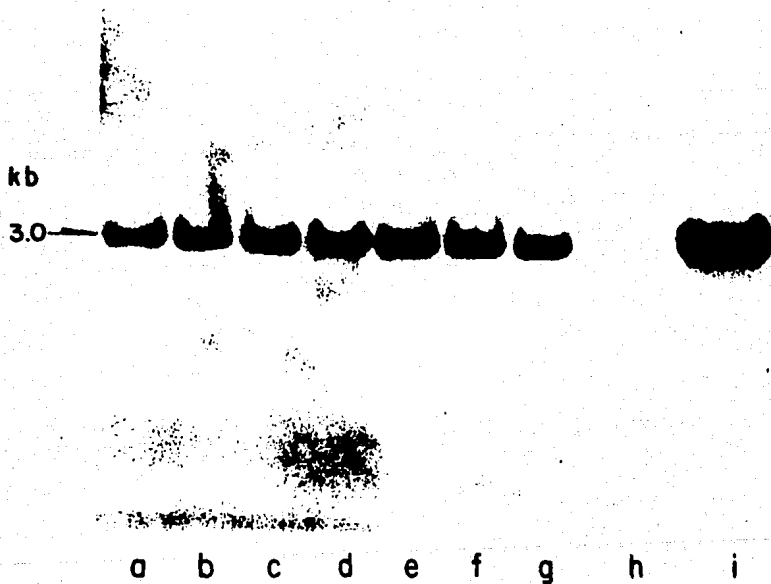


Fig. 6. Autoradiograph of the hybridization of the *S. typhi* ³²P-labeled *ScaI*-*NotI* fragment from pVF27 to Southern blots of *Bgl*II-cut DNA from: *S. typhimurium* strain CDC6516-60 (lane a); *S. typhi* clinical isolates MK20 (lane b), MK24 (lane c), MK27 (lane d), strains IMSS-1 (lane e), Ty2 (lanes f, i) and Rawlings (lane g); and *E. coli* Q359 (lane h). Lanes a-g contain 3 µg and lanes h-i 6 µg of DNA. Experimental details were as described in RESULTS AND DISCUSSION, section d. Electrophoresis and transfer of the gel were done as described in the legend to Fig. 1. Hybridization was done with 5×10^5 cpm/lane in a solution containing 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.5), 5 × SSC, 10 × Denhardt's solution (see MATERIALS AND METHODS, section c) and 100 µg/ml of sonicated calf thymus DNA, at 65°C for 18 h; then washed down to 0.1 × SSC, 0.1% SDS at 65°C and exposed for autoradiography to Kodak X-OmatK film using enhancing screens.

(see MATERIALS AND METHODS, section a). Representative hybridizations, to illustrate this point, are shown in Fig. 6. Hybridization of the *S. typhi ompC*-like gene probe was done under stringent conditions (0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.5, $5 \times \text{SSC}$, $10 \times$ Denhardt's solution, $100 \mu\text{g/ml}$ sonicated calf thymus DNA, 65°C , 18 h; with washes down to $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, at 65°C); interestingly, no signal is obtained with *E. coli* DNA (Fig. 6, lane h). It remains to be seen if the regions corresponding to exposed epitopes are conserved among the various *S. typhi* clinical isolates.

(e) Conclusions

Comparison of the N termini of the cloned *OmpC*-like protein and of the 38.5-kDa protein expressed by *S. typhi* in vivo should unequivocally establish their identity. Knowledge of the nucleotide sequence of the structural *ompC*-like gene should confirm the gene-product relationship.

Learning about outer membrane protein gene structure and function should allow the identification of exposed epitopes in the protein products (Freudl and Cole, 1983; Freudl et al., 1986), and in determining if any of them are species-specific. The possibility of overexpressing the outer membrane proteins, perhaps in a minicell system, should prove useful in protection experiments; large amounts of the protein of interest should aid in generating monoclonal antibodies that could be used in immunodiagnosis. Aside from possible biotechnological applications, we are interested in exploring the role of *S. typhi* *OmpC* protein in the humoral and cellular immunity events of typhoid fever.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Jesús Kumate and his collaborators, from the Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, for introducing us into the area of research on typhoid fever. We thank Drs. Luis Servín and Baltazar Becerril for critically reviewing the manuscript. This work was partially supported by grant PCSABNA-030735 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

REFERENCES

- Balbás, P., Soberón, X., Merino, E., Zurita, M., Lomeli, H., Valle, F., Flores, N. and Bolívar, F.: Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives — a review. *Gene* 50 (1986) 3–40.
- Betlach, M.C., Hershfield, V., Chow, L., Brown, W., Goodman, H.M. and Boyer, H.W.: A restriction endonuclease analysis of the bacterial plasmid controlling the *EcoRI* restriction modification of DNA. *Fed. Proc.* 35 (1976) 2037–2043.
- Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.-A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L. and Smithies, O.: Charon phages: safer derivatives of bacteriophage λ for DNA cloning. *Science* 196 (1977) 161–169.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J. and Falkow, S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2 (1977) 95–113.
- Bolívar, F. and Backman, K.: Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* 68 (1979) 245–267.
- Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H.A., Palomino, C., Rodríguez, L.H. and Mora, G.C.: Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect. Immun.* 52 (1986) 209–212.
- Calderón, I., Lobos, S.R. and Mora, G.C.: The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty2 porins. *Eur. J. Biochem.* 141 (1984) 579–583.
- Dougan, G. and Kehoe, M.: The minicell system as a method for studying expression from plasmid DNA. *Methods Microbiol.* 17 (1984) 233–258.
- Edelman, R. and Levine, M.M.: Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 8 (1986) 329–349.
- Freudl, R. and Cole, S.T.: Cloning and molecular characterization of the *ompA* gene from *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* 134 (1983) 497–502.
- Freudl, R., MacIntyre, S., Degen, M. and Henning, U.: Cell surface exposure of the outer membrane protein *OmpA* of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 491–494.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. and Cesareni, G.: Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5172–5176.
- Kuusi, N., Nurminen, M., Saxen, H. and Mäkelä, P.H.: Immunization with major outer membrane protein (porin) preparations in experimental murine salmonellosis: effect of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 34 (1981) 328–332.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982.
- Matsuyama, S.-I., Inokuchi, K. and Mizushima, S.: Promoter exchange between *ompF* and *ompC* genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 158 (1984) 1041–1047.
- Mizuno, T., Chou, M.-Y. and Inouye, M.: A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6932–6940.

- Nakae, T.: Outer membrane permeability of bacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13 (1986) 1-62.
- Nara, F., Inokuchi, K., Matsuyama, S.-I., and Mizushima, S.: Mutation causing reverse osmoregulation of synthesis of OmpF, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159 (1984) 688-692.
- Nikaido, H. and Vaara, M.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49 (1985) 1-32.
- Schoenberg, D.R.: Interference with the screening of genomic libraries by rearrangements of λ 1059. *Gene Anal. Technol.* 1 (1984) 8-12.
- Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503-517.
- Tapa, S. and Cvjetanović, B.: Controlled field trial on the effectiveness of one and two doses of acetone-inactivated and dried typhoid vaccine. *Bull. World Health Org.* 52 (1975) 75-80.
- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R.: Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 55 (1987a) 816-821.
- Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V.R.: An outer membrane protein (porin) as an eliciting antigen for delayed-type hypersensitivity in murine salmonellosis. *Infect. Immun.* 55 (1987b) 822-824.

Communicated by F. Bolivar.

RESULTADOS

A.- Caracterización preliminar del gene gnt de E. typhi.

- 1) Hibridación de DNA total de S. typhi con el fragmento EcoRI-HindIII del plásmido pEWD299.
- 2) Aislamiento del fago lambda FDC1.
- 3) Actividad enterotoxigénica codificada por el fago lambda FDC1 en asas ileales de rata y en células CHO.

Los resultados de esta sección A se describen en el apéndice I.

B.- Mapa de sitios de restricción del bacteriófago lambda FDC1.

Con el propósito de determinar la región del DNA del inserto de S. typhi que hibrida con el fragmento de DNA EcoRI-HindIII del plásmido pEWD299, se hizo un mapa del DNA del bacteriófago lambda FDC1, con enzimas de restricción (fig.1) Como se puede observar en esta figura, la región que hibrida está comprendida en un segmento de 5.6 kpb de HindIII-HindIII y de SalI-SalI.

C.- Expresión del fago lambda FDC1 en maxicélulas

Para poder examinar las proteínas codificadas por el lambda FDC1, se utilizó una cepa de E. coli M159 sensible a luz ultravioleta, (maxicélulas). Como control se utilizó un fago no recombinante lambda 1059 y otro fago recombinante, (fig. 2). Este análisis reveló que el fago lambda FDC1 expresa al menos para dos polipeptidos de peso molecular aparente (P.M.A.) de 15 KDa y de 27 KDa, que no se encuentran en el lambda 1059 ni en otro fago recombinante.

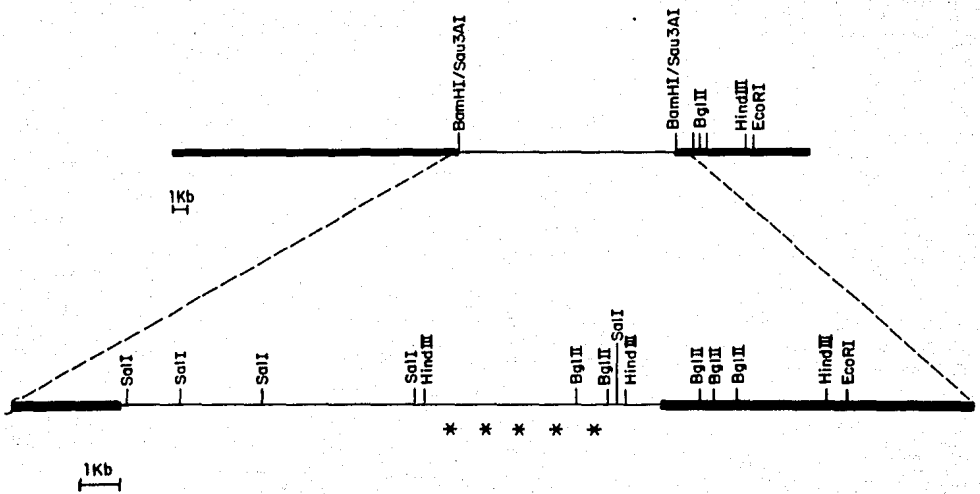


Fig.1.- Mapa de restricción del bacteriofago recombinante lambda FDC1. (*****). Región donde hibrida el detector eltbp.

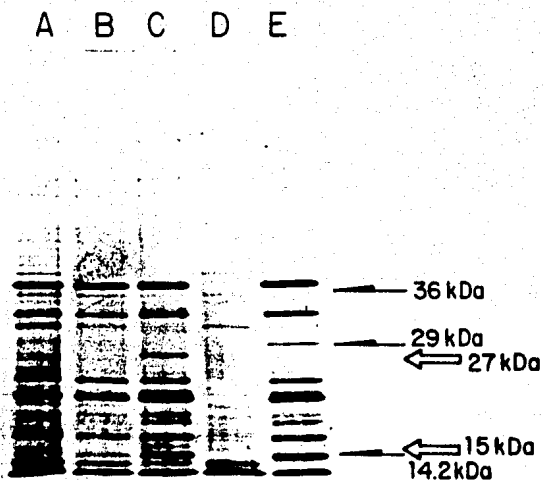


Fig.2.- Expresión de las proteínas codificadas por el bacteriofago lambda FDC1 en maxicélulas de *E. coli* M159 (carril C). En el autorradiograma se observa el patrón electroforético de las proteínas marcadas con 35-S-metionina. Los carriles A) y B) corresponden a otros bacteriofagos recombinantes, D) a la cepa M159 sin fago y E) al vector lambda 1059.

D.-Subclonación

El fragmento de 5.6 kpb, generado con la endonucleasa HindIII, del fago lambda FDC1 se subclona al vector pBR322, generando el plásmido recombinante pFM24.

E.-Mapa del plásmido pFM24

Con el fin de determinar en que orientación quedó el inserto subclonado en el plásmido, con respecto al lambda FDC1, se digirió dicho plásmido con endonucleasas de restricción y se elaboro un mapa. Además, se determino que región de este segmento, de 5.6 kpb, hibrida con el gene eltB porcino. Este experimento reveló que un segmento de 0.8 kpb, correspondiente al inserto, generado con HincII, hibrida con el detector radioactivo (Fig. 3)

F.-Expresión del plásmido pFM24 en minicélulas.

La expresión de los polipeptidos codificados por el plásmido pFM24 en minicélulas reveló que cuando menos hay dos polipeptidos, de 38 kDa y 15 kDa, que no se encuentran en el control que es el vector pBR322 no recombinante. (fig 4). No se hicieron experimentos para determinar la orientación de transcripción de los polipeptidos observados en este experimento.

G.-Secuenciación

Un fragmento con un P.M.A. de 0.8 kpb del inserto del plásmido pFM24, generado con HincII-HincII, el cual hibrida con el fragmento de DNA de EcoRI-HindIII del plásmido pEWD299, fue subclonado al vector M13mp18 en HincII como primer paso de secuenciación. Posteriormente, el inserto de esta clona fué clonado en el vector M13mp19, en EcoRI-HindIII, para determinar la secuencia en la orientación reversa. En la figura 5 se muestra la estrategia

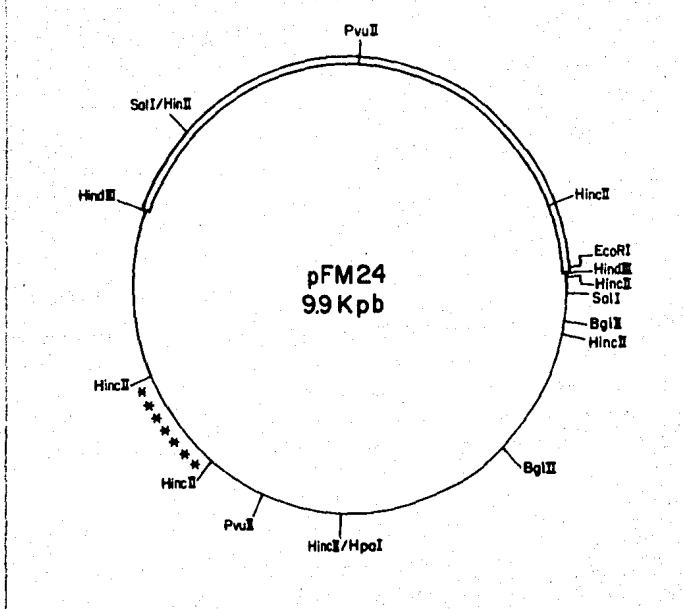


Fig.3.- Mapa de restricción del plásmido recombinante pFM24.
 (*****) Región donde hibrida el detector eltp.

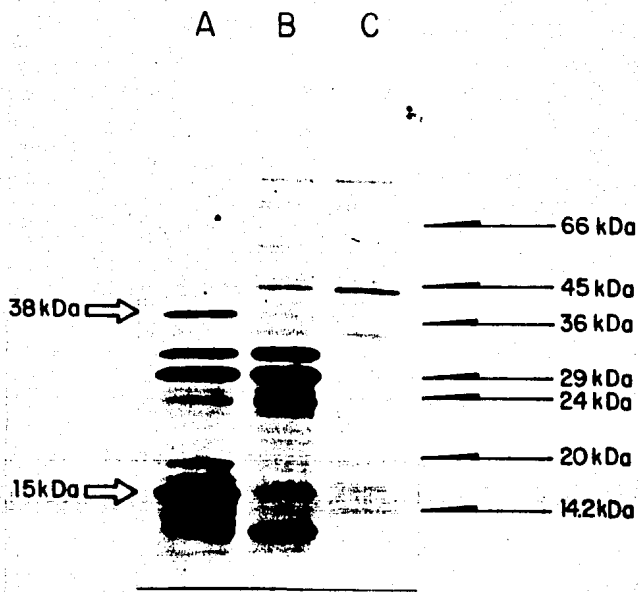


Fig.4.- Expresión de las proteínas codificadas por el plásmido recombinante pFM24 en minicélulas de *E. coli* P678-54 (carril A). En el autorradiograma se observa el patrón electroforético de las proteínas marcadas con ³⁵S-metionina. El carril B) corresponde al vector pBR322 y el C) corresponde a la cepa P678-54

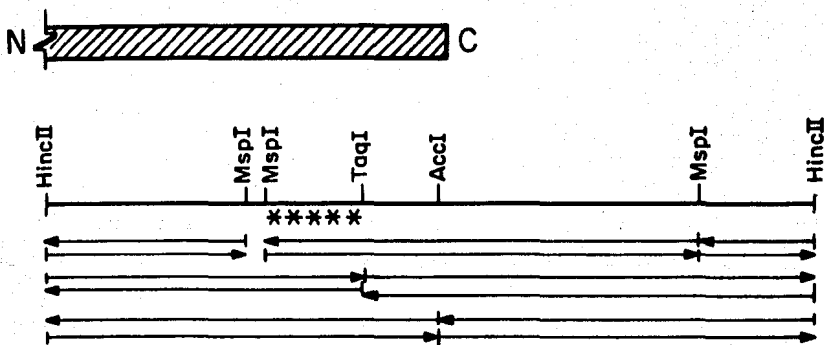


Fig.5.- Estrategia de secuenciación del fragmento de 729 nucleótidos HincII-HincII. (*****) Región donde hibrida el detector *eltbp*
 // Fase de lectura abierta, iniciando a partir del 3er nucleótido.

de secuenciación.

La secuencia nucleotídica se determinó utilizando fragmentos de menor tamaño, derivados por digestión con diferentes enzimas de restricción del fragmento de 0.8 kpb, y clonándolos en los vectores mp18 y mp19 para obtener ambas orientaciones. Con la obtención de la secuencia completa de este inserto, se observó que esta comprendido de 729 nucleótidos. La figura 6 muestra la secuencia nucleotídica completa del fragmento.

H.-Hibridación

Con el propósito de determinar más finamente en donde estaba hibridando el gen eltb porcino en el segmento de S. typhi de 0.8 kpb, generado con HincII, y el cual se había subclonado en fragmentos más pequeños en M13, se procedió a realizar un experimento tipo "Southern", el cual reveló que la región que hibrida esta comprendida entre los sitios de TaqI y MspI, la cual abarca 92 nucleótidos (deducido por secuencia). (Fig. 5).

I.-Análisis de la secuencia del fragmento de 0.8 kpb de S. typhi.

La comparación nucleotídica de este segmento contra el "Gene Bank", utilizando el programa mencionado (ver Materiales y Métodos), nos dió como resultado un alineamiento a partir de los nucleótidos 275 a 588 y 301 a 604 de la región 3' terminal del gen eltBp y eltBh, respectivamente, con el fragmento de S. typhi. La región de más similitud (78.7%) está comprendida del nucleótido 200 al 270 del inserto de S. typhi, con la región del nucleótido 490 al 563 del gen eltBp. Se ha sugerido que en esta última hay una señal para término de transcripción (Yamamoto et al., 1983). Esta región de DNA de S. typhi está comprendida entre los sitios de TaqI y MspI (Fig. 7).

10 20 30 40 50 60
 AAC ACG ATA TAC AAA ATC AUC ALC TGA ATG ALC AAA AAA ATA CTA AAA ATA ATA TTA CTT
 N T I Y K I S T - M T K K I L K I I L L
 T R Y T F S A P E - P K K Y - K - Y I T F
 H D I D N D H L N D Q K N T K N N I T F
 *
 70 80 90 100 110 120
 TTT TAT CAT ACT CTC ICC TAC AGA AAC TAT CAG GAA AAC CAC CTA ATG TGT TAA ACG GAG
 F Y H T L S G Y R N Y D A N H L M C - T E F
 F I I L S P T E T I R D T T - C V K P S
 L S Y S L L Q K L S G K P P N V L N R V
 *
 130 140 150 160 170 180
 TGC TAA CCA TAG CTC AGT CAT AAT TTA CGT CTC GCT GGA TAA AAT TAG AAA AAC AAA CCT
 C - P - L S H T L R L A G - N - K N C - T A A
 A N H L S V I L Y V S L D K I R K T N L
 L T I A D S Y F T S R W I K L E K Q T S
 *
 190 200 210 220 230 240
 CCC CGG TTT ACG GCA CCA AAA TCC CGG TAA TTG CGC AAT GCC GAT CCT TAA ACT GCG GCA
 P R F T A R K S R - L R N A D P C - P A R
 P G L R H E N P G N C A M P I L K L R H
 P V Y G T K I P V I A Q C R S L C R G T
 *
 250 260 270 280 290 300
 CTA TAA CCG GTT CCC TAC AGG BGG CCG TTT TGT TAT GTC ACT TCT CAA TGA CCT GCT CGA
 L - Y R L P Y R E P F C Y V T S Q - P A R
 Y N G F P T G S R F V M S L L N D L L D
 I T A S L Q G A V L L C H F S M T C S I
 *
 310 320 330 340 350 360
 TTT CAG CCA CCA TCC CCT TAT GCC ACC GCC TTC AGC GCA GAT GTT TNC GGA ACA TCT ICC
 Q R P D S P Y A T A F S A D V C T S S
 F S D H P L M P P P S A Q M F A E H L P
 S A T I P L C H R L Q R R C L R N I F L
 *
 370 380 390 400 410 420
 TGC TGA GTG TAT ACG ACA CTG CCT GAC GGT CTC TAA GCA TGC AAC CAG TCG CCT GCG GTT
 C - V Y T T L P D A L L - A C A C N R S P G V
 A E C I Q H C L T L S K H A T V R L A F
 L S V Y N T A - R S L S M Q P F A W R S
 *
 430 440 450 460 470 480
 CCG GTT TAT CCG CCT GGT TTA CCT CTA ATA CAC CTG GCT GCG GCT TTA CTC TTT TCT TIG
 R L Y P P G L P L I H L L A A L L G L F S L
 G F I R L V Y L - Y T W L R L Y S F L W
 A L S A W F T S D T P G C G F T L F F G
 *
 490 500 510 520 530 540
 GCA CCG AGT TCC AGL GCG TAG ATA GCA CCA TGT TCA GGA CAG CAC CAG ACA ACG TTT CTG
 A R S P A R - I A P C S G G H O T T L L
 H A V P A R R - H H V G D S T R D R C C
 T G F D R V D S T M F R T A P D N V A V
 *
 550 560 570 580 590 600
 TAA GCA GGA GAA AAC CAT TCC CGA CAA ACT TTG CAT TTA CCG CGC CGT AAT TTA GCC AGT
 - A G G N H S R Q T L H L R R R N L A S
 K Q E E T I F D K L L C I Y G A V I - P V
 S R R K P P P T N F A F T A P - F S Q S
 *
 610 620 630 640 650 660
 CTC ACC TCA GAC CCG GTT ACG GAT ATA GCA TCT AAT AAC GTT AGA TTA TGC ATG CCT GAC
 L T S D R V T D I A S N N V R L C M P D
 S P G E T L R I - H L I T L D V A C L T
 H L R P G Y G Y S I - - R - I M H A - H
 *
 670 680 690 700 710 720
 ATT GTT ACG CCA GAA TAC GGA AGA GTA ATA ATT CAT AGC ATA TCT ATA TTA ATG CAA ATA
 I V R R E Y G R V I I H S I S I L M Q I
 L G E N T E E - F I A Y L V - C K -
 C - A R I R K S N N S - H I Y I N A N K

AAA TAC AG
 K Y
 N T
 I Q

Fig. 6.- Secuencia nucleotídica del fragmento de 729 nucleótidos, HincII-HincII y secuencia de aminoácidos a partir del 1er, 2o y 3er nucleótido.

ECOELTBP E.coli (from pig) heat-labile enterotoxin 108 108 170
 78.7% identity in 75 nt overlap

```

      10      20      30      40      50      60
sa11 AACACGATATACAAAATCAGCACCTGAATGACCAAAAAAATACTAAAATAATATTACTT
ECOELT GAAAGGATGAAGGACACATTAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAAATGATAAATTA
      300      310      320      330      340      350

      70      80      90      100     110     120
sa11 TTTTATCATACTCTCTCCTACAGAACTATCAGGCCAAACCACCTAAATGTGTTAAACCGAG
ECOELT TGTGTATGGAATAATAAAACCCCCAATTCATTGCGGCAATCAGTATGAAAAACTAGTTT
      360      370      380      390      400      410

      130     140     150     160     170     180
sa11 TGCTAACAAATAGCTCAGTCATACTTTACGTCCTCGCTGGATAAAATAGAAAAACAAACCT
ECOELT GCTTTAAAGCATGTCTAATGCTAGGAACCTATATAACAACACTACTGTACTTATACTAATG
      420     430     440     450     460     470

      190     200     MspI 210     220     230
sa11 CCCCAGTTTACGGCACGAAATCCCGGTA-ATTGCGCAATGCCGATCCTTAAACTGCGGC
      :: :::: : :::: X: ::::: ::::: :
ECOELT AGCCTTATGCTGCATTTGAAAAGGCGGTAGAGGAGGCAATACCGATCCTTAAACTGTAAC
      480     490     500     510     520     530

      240     250     260     270     280     290     TaqI
sa11 ACTATAACGGCTCC-CTACAGGGAGCCGTTTTGTTATGTCACTTCTCAATGACCTGCTC
      ::::: ::::X ::::: ::::: :
ECOELT ACTATAACAGCTCCACTACAGGGAGCTGTTATAGCACACAGAAAAAATAAGCTAGGCT
      | 540     550     560     570     580     590

      300     310
sa11 GATTTGAGCGACCA
ECOELT GGAGGGGCAAGCTT
      600
  
```

Fig.7.- Alineamiento de la secuencia del fragmento HincII-HincII, con el gen eltbp.

La traducción de este inserto a proteína (utilizando el programa mencionado en Materiales y Métodos), iniciada en la primera ,segunda y tercera base, nos dió como resultado dos fases de lectura abierta.

La primera, es tomando la segunda base para inicio de traducción, inicia en la base 104 hasta la 445, dando un péptido de 113 aminoácidos. La segunda fase, aparece al tomar la tercera base para inicio de traducción, e inicia en el nucleotido 3 y termina en el nucleotido 383, codificando para un péptido de 127 aminoácidos. (Fig. 6).

DISCUSION Y CONCLUSION

En resumen, los resultados sugieren la presencia de una enterotoxina, que tiene similitud con CT y LT, codificada por un inserto de DNA de S. typhi, portado por el bacteriofago recombinante lambda FDC1. Esta conclusión se basa principalmente en que extractos crudos de lisados del lambda FDC1 promueven la elongación de células CHO y la secreción de fluido en asas ileales de intestino de conejo, y en que la toxina es antigénicamente similar a LT cuando se prueba con anticuerpos en ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay").

La conclusión también se basa en los resultados de hibridación del DNA, con lo cual se aisló el gen. El segmento de DNA que porta el gen de la enterotoxina tiene un estrecho homólogo con el gen de la subunidad B de LTp. Es interesante notar que, bajo las mismas condiciones de hibridación, no observamos homología con la subunidad A de LTp. Sin embargo, debido a que las actividades enterotoxigenicas pueden ser detectadas, pensamos que la enterotoxina de S. typhi tiene una subunidad similar a CT/LT/A.

Otra diferencia notable es que la enterotoxina de S. typhi parece tener un receptor diferente a membranas de eucariontes; esto se basa en el hecho de que anticuerpos monoclonales (Mab's) dirigidos contra el receptor GM1 de la subunidad LT/B, en experimento tipo ELISA, fué negativo.

Además, se demostró que un detector, consistente en una mezcla

de oligodeoxiribonucleótidos (24mero, fig. 3 del apéndice I), correspondiente a la región que codifica para el sitio de unión de las enterotoxinas CT y LT al receptor en células eucariotas (el gangliosido GM1), no hibrida con el DNA del bacteriofago recombinante.

Maxicélulas y minicélulas

El bacteriofago recombinante lambda FDC1 porta un inserto de S. typhi de aproximadamente 15 Kpb y, como se mencionó en RESULTADOS, este bacteriofago codifica al menos para dos polipeptidos, de peso molecular aparente (P.M.A.) de 27 kDa y 15 kDa.

Como comparación, las subunidades de las enterotoxinas CT y LT tienen un P.M. de: 27,215 Da para CT/A y 11,677 Da para CT/B (Betley et al., 1986) ; 29,673 Da para LT/A (Spicer et al., 1982) y 11,780 Da para LT/B (Dallas et al., 1980), respectivamente.

Se ha reportado que en S. typhimurium que las subunidades de la enterotoxina (S-LT) tienen un P.M.A. de 27 kDa para S-LT/A y 14 kDa para S-LT/B (Finkelstein et al., 1983). Más recientemente, Chopra et al (1987), sugieren que la enterotoxina de S. typhimurium está compuesta de tres subunidades con P.M.A. de 45, 26 y 12 kilodaltones.

El inserto de 5.6 Kpb de S. typhi, contenido en el plásmido pFM24, codifica al menos para dos péptidos que tienen un P.M.A. de 38 kDa y de 15 kDa, lo cual sugiere que el péptido de 15 kDa podría corresponder al observado en maxicélulas.

Es interesante notar que el péptido de 38 kDa no se logró detectar en el experimento de maxicélulas, esto puede ser debido a

que comigre con una proteína estructural del bacteriofago. Por el contrario, el péptido de 27 kDa del bacteriofago lambda FDC1 no se observó en el experimento de minicélulas. Esto puede ser debido a que esta proteína comigra con la beta-lactamasa (enzima responsable para el fenotipo de resistencia a ampicilina) y por lo tanto no se distingue completo. Otra posibilidad es que en el inserto de S. typhi, en el plásmido, no esté completo el gen para esta proteína.

Otra posibilidad es, que el gen para el polipeptido de 27 kDa si esté presente, pero que su expresión esté regulado positivamente por otra proteína , y que el gen para esta proteína regulatoria no este completo o no lo contenga el plásmido pFM24.

Es interesante notar que no se logró detectar actividad biológica de la enterotoxina del plásmido pFM24, en asas ileales de rata (experimento realizado en el laboratorio del Dr Guillermo Ruiz-Palacios del Instituto Nacional de la Nutrición. Datos no mostrados). Esto pudo ser debido a que no haya genes completos en el plásmido, como se mencionó anteriormente.

Como comparación, se ha reportado que la enterotoxina de S. typhimurium es expresada en E. coli y además que tiene una actividad biológica detectable en el ensayo de asas ileales y por las alteraciones en la permeabilidad vascular de la piel de conejo. Esta enterotoxina de S. typhimurium está codificada en un segmento de 6.3 Kpb obtenido con las enzimas Pst1-EcoRI, clonado en el vector pBR322, e introducido a una cepa de E. coli (Chopra et al., 1987).

Secuencia

Con el analisis de la secuencia del fragmento obtenido con

HincII podemos sugerir varias posibilidades:

(1) Que el fragmento secuenciado codifica para péptidos de 113 ó de 127 aminoácidos (fig), que por secuencia de aminoácidos no tiene relación con la subunidad LT/B. Dicho péptido pudiera ser el de P.M.A. de 15 kDa observado en minicélulas.

(2) Otra posibilidad es que no contemos con la secuencia completa del gen para la subunidad similar a LT/B. Esto se basa en el análisis de la fase de lectura abierta, tomando la tercera base como inicio de traducción. Se observa que la fase podría extenderse hacia la dirección 5', y que, por tanto, este péptido esté formado de un número mayor de aminoácidos (Fig.).

Es interesante observar que, en ambas posibilidades, la región de homología por nucleótidos con eltbp corresponde al extremo 3' no codificante de eltBp, pero en S. typhi corresponde a parte de una fase de lectura abierta.

La determinación de la secuencia nucleotídica de los genes estructurales clonados de la toxina de S. typhi (SE), similar a LT, será necesario para proporcionar datos mayores sobre su estructura y su función.

Importancia de la presencia de la enterotoxina

La producción de una enterotoxina por una bacteria invasiva, como lo es S. typhi, comparada con una bacteria productora de enterotoxina no invasiva, como V. cholerae y E. coli enterotoxigénica, plantea diferentes preguntas:

-En que estado de la infección ejerce la enterotoxina su efecto en la mucosa del intestino?.

-Podría la enterotoxina afectar el curso de la infección sistémica?

-Es antes o después de la invasión a las células epiteliales que la toxina altera los niveles de AMP cíclico ?.

En este sentido, la invasión a las células epiteliales por la bacteria pudiera proporcionar un mecanismo muy eficiente para liberar la enterotoxina a las células epiteliales del intestino.

Pequeñas cantidades de enterotoxina producida por Salmonella spp pudieran ejercer efectos sustanciales en transporte de agua y electrolitos durante la infección intestinal (Chopra et al., 1987).

La disponibilidad del gen clonado para la enterotoxina facilitará en el futuro hacer estudios con, mutantes, para resolver estas u otras preguntas.

Como un ejemplo de estudios del papel de una toxina en la patogenia nos referimos al trabajo de Relman et al, 1989. Ellos realizaron experimentos para evaluar la adherencia de Bordetella pertussis a células de cultivo, a saber: a células CHO y a células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio de conejo. Correlacionaron esta adherencia con la presencia de la hemaglutinina filamentososa (FHA) y con la presencia de la toxina pertussis. La FHA es una proteína asociada a superficie, la cual ha recibido atención como una supuesta adhesina y por ende como un determinante de virulencia.

Obtuvieron como resultados que la FHA es necesaria para la adhesión de la bacteria, tanto a células CHO como a células ciliadas respiratorias de conejo. Por otro lado, la toxina pertussis parece no tener ningún efecto en la adherencia bacteria-células CHO

y si parece tener un papel en la adherencia a células ciliadas respiratorias de conejo. La diferencia en los resultados obtenidos en los dos modelos de adherencia sugiere que B. pertussis podría usar múltiples mecanismos y/o adhesinas durante su interacción con el hospedero que es el hombre (Relman et al., 1989).

Importancia en la epidemiología molecular

Es posible que patrones particulares de bandas de ácidos nucleicos puedan servir como "huellas digitales" para clasificar cepas específicas (Calva et al., 1988). Esta metodología se basa en la utilización de tres procedimientos para determinar si diferentes cepas de una misma especie son idénticas (esto es, clonas), o bien representan organismos diferentes genotípicamente. Los procedimientos usados son:

(1) El estudio de patrones plasmídicos por electroforesis, el cual se ha probado ser un sistema rápido, económico y de tipificación epidemiológica reproducible para algunos patógenos bacterianos;

(2) el análisis electroforético de los fragmentos de restricción de DNA bacteriano, BRENDA ("Bacterial restriction-*endonuclease* DNA analysis"), el cual ha generado información adicional y especificidad a los resultados.

Sin embargo, estos dos procedimientos están limitados a la presencia de plásmidos y de patrones de restricción claramente discernibles (para revisión ver Eisenstein et al., 1986 y Wachsmuth, K. 1986), y

(3) Genes aislados de S. typhi pueden ser utilizados como detectores radioactivos en el estudio de genética molecular de

poblaciones, haciendo uso de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR), los cuales pueden permitir hacer la clasificación de diferentes cepas de acuerdo a su origen geografico o a los sintomas clinicos.

Este tipo de análisis está basado en la presencia de los polimorfismos geneticos, los cuales pueden reflejar ausencia o presencia de sitios de corte especificos para enzimas de restricción.

Así, el DNA de varios aislados clinicos puede ser cortado con una enzima de restricción; los fragmentos obtenidos de esta manera son separados por electrofóresis en gel y transferidos a una membrana la cual puede ser de nitrocelulosa (técnica de 'Southern').

En estos filtros, es posible visualizar bandas particulares utilizando detectores radioactivos, estos pueden ser genes especificos. Un cambio en la banda patrón es indicativo de polimorfismo.

Estos tres procedimientos representan la técnica de "huellas digitales" moleculares y pueden ayudar a determinar:

(a) si la mayoría de los episodios infecciosos en una comunidad se deben a una cepa clonal en particular, indicando un reservorio y sistema de transmisión común; o si se deben a diferentes cepas, indicando reservorios y/o sistemas de transmisión múltiples;

(b) si los episodios de infecciones recurrentes por la misma especie, en un individuo en particular, se deben a la misma cepa o existe la adquisición de nuevas cepas.

(c) Además, estas técnicas pueden ser usadas para distinguir cepas virulentas de cepas no-virulentas, de la misma especie, y para

identificar factores que seleccionan o favorecen la persistencia en una comunidad de una cepa patógena.

Por ejemplo, de Yersinia enterocolitica se han aislado dos genes que confieren la capacidad de invasión (inv) y adherencia (ail de "attachment invasion locus"). Existe una excelente correlación epidemiológica entre la presencia de estos genes en cepas de Yersinia y el cuadro clínico que presentan los individuos de donde se aisló la cepa.

Todos los aislados clínicos de Y. enterocolitica y de otras especies de Yersinia tienen secuencias homólogas a inv; cinco patrones de hibridación se han observado. Aislados clínicos teniendo cualquiera de dos de estos patrones son invasivos para células en cultivo y están asociados con enfermedades epidémicas. Aquellos que tienen cualquiera de los otros tres patrones no son invasivos para células en cultivo y de dudosa relevancia clínica.

Por otro lado, todas las cepas examinadas de Y. pseudotuberculosis presentan sólo un tipo de patrón de hibridación al detector inv y son invasivas en células de cultivo. La presencia de secuencias de DNA específicas de ail es aún un mejor indicativo de un fenotipo invasivo, ya que sólo las especies patógenicas de Yersinia tienen homología al detector ail.

Los aislados de Y. enterocolitica que poseen secuencias homólogas a ail, producen el siguiente cuadro clínico. Enterocolitis (caracterizada por fiebre, diarrea y dolor abdominal), adenitis mesentérica aguda e ileitis (inflamación del ileon) terminal, artritis y septicemia. Leucocitos, sangre (no muy común) y moco, pueden estar presentes en heces. Usualmente los pacientes tienen: dolor de cabeza, fiebre y dolor abdominal con o

sin diarrea. Cepas de Y. enterocolitica que no estan asociadas con este cuadro clinico o no son capaces de entrar a células en cultivo estan completamente desprovistas de las secuencias ail.

Asi, este detector especifico de invasión sirve como un excelente medio para detectar Yersinia spp patógenicas (Finlay., et al 1989).

De forma similar a los experimentos realizados con Yersinia, un detector de DNA especifico para la enterotoxina de S. typhi (SE) deberá ser útil en el establecimiento de la prevalencia de la enterotoxina, como de su gen estructural, entre aislados clinicos de S. typhi.

BIBLIOGRAFIA

- BETLEY, J. M., MILLER, L. V. y Mekalanos J.J. (1986). Genetics of bacterial enterotoxins. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:577-605.
- BODHIDATTA, L., TAYLOR, D.N., THISYAKORN, U. y ECHEVARRIA, P. (1987). Control of typhoid fever in Bangkok, Thailand, by annual immunization of school-children with parenteral typhoid vaccine. *Rev. Infect. Dis.* 9:841-845.
- BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R.L., GRENE, P.J., BETLACH, M.C., HEYNECKER, H.L., BOYER, H.W., CROSA, J. y FALKOW. (1977). Construction and characterization of new cloning system. *Gene* 2:95-113.
- BUTLER, T., KNIGHT, J., NATH, S.K. SPEELMAN, P., ROY, S.K. y AZAD, M.A.D. (1985). Typhoid fever complicated by intestinal perforation: a persisting fatal disease requiring surgical management. *Rev. Infect. Dis.* 7:244-256.
- CALHOUN, D.H. y GRAY, E.J. (1981). Detection of proteins coded by cloned DNA segments. *Focus BRL* 3:1-12.
- CALVA, E., PUENTE, J.L. y CALVA, J.J. (1988). Research opportunities in Typhoid Fever: epidemiology and molecular biology. *Bioessays.* 9:173-177.
- CHOPRA, K.A., HOUSTON, W. C., PETERSON, W. J., PRASAD, R. y MEKALANOS, J.J. (1987). Cloning and expression of the Salmonella enterotoxin gene. *J. Bact.* 169:5095-5100.
- CLARKE, D.J. y MAALE, O. (1967). DNA replication and the division cycle of Escherichia coli *J. Mol. Biol.* 23:99-112.
- DALLAS, W.S. (1983). Conformity between heat-labile toxin genes from human and porcine enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* 40:647-652.
- DALLAS, W.S. y FALKOW, S. (1979). The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of Escherichia coli. *Nature* 277:499-501.
- DALLAS, W.S. y FALKOW, S. (1980). Amino acid sequence homology between cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin. *Nature* 288:499-501.
- DOUGAN, G y KEHOE, M. (1984). The minicell system as a method for studying expression from plasmid DNA. *Methods in Microbiology* 17: 233-256.
- EDELMAN, R y LEVINE, M.M. (1986). Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 8:329-349.

EIDELS, L., PROIA, L. R. y HART, A. D. (1983). Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.* 47:596-620.

EISENSTEIN, B. I. y ENGLEBERG, C. (1986). Applied molecular genetics: new tools for microbiologists and clinicians. *J. Infect. Dis.* 153:416-430.

ELWELL, L. y SHIPLEY, P.L. (1980). Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:465-496.

FERNANDEZ, M., SIERRA-MADERO, J., DE LA VEGA, H., VAZQUEZ, M., LOPEZ-VIDAL, Y., RUIZ-PALACIOS, y CALVA, M. (1988). Molecular cloning of a Salmonella typhi LT-like enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.* 2:821-825.

FERRECCIO, C., LEVINE, M.M. MANTEROLA, A., RODRIGUEZ, G., RIVERA, I., PRENZEL, I., BLACK, R.E., MANCUSO, T. y BULAS, D. (1984). Benign bacteremia caused by Salmonella typhi and paratyphi in children younger than two years. *J. Pediatr.* 104:899-901.

FINKELSTEIN, A.R., BURKS, F.M., ZUPAN, A., DALLAS, S.W., JACOB, O.Ch. y LUDWING, S.D. (1987). Antigenic determinants of the Cholera/Coli family of enterotoxins. *Rev. Infect. Dis.* 9:490-502.

FINKELSTEIN, A.R., MARCHLEWICZ, A.B., McDONALD, J.R. y BOESMAN-FINKELSTEIN, M. (1983). Isolation and characterization of a cholera-related enterotoxin from Salmonella typhimurium. *FEMS M Let.* 17:239-241.

FINLAY, B.B. y FALKOW, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microb. Rev.* 53:210-230.

GEARY, S.J., MARCHLEWICZ, B.A. y FINKELSTEIN, R.A. (1982). Comparison of heat-labile enterotoxins from porcine and human strains of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 36:215-220.

GEMMELL, G.C. (1984). Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. *J. Med. Microbiol.* 17:217-235.

GERDES, J.C. y ROMING, W.R. (1975). Genetic basis of toxin production and pathogenesis in Vibrio cholerae: Evidence against phage conversion. *Infect. Immun.* 11:445-452.

HORNICK, R.B. (1985). Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world XX Typhoid fever. *Rev. Infect. Dis.* 7:536-546.

HOUSTON, C.W., KOO, F.C.W. y PETERSON, J.W. (1981). Characterization of Salmonella toxin released by mitomycin C-treated cells. *Infect. Immun.* 32:916-926.

JIIWA, S.F.W. (1981). Probing for enterotoxigenicity among the Salmonellae: an evaluation of biological assays. *J. Clin. Microbiol.* 14:463-472.

- KAPER, J.B. y LEVINE, M.M. (1981). Cloned cholera enterotoxin genes in study and prevention of cholera. *Lancet* 11:162-163.
- KOUPAL, R.L. y DEIBEL, R.H. (1975). Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by Salmonella. *Infect. Immun.* 11:14-22.
- KLUGMAN, K.P., GILBERTSON, I.T., KOORNHOF, H.J., ROBBINS, J.B., SCHEERSON, R., SHULZ, D., CADOS, M., ARMAND, J. y VACCINATION ADVISORY COMMITTEE. (1987). Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* 11, 1165-1169.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- LEVINE, M.M., FERRECCIO, C., BLACK, R.E., GERMANIER, R. y CHILEAN TYPHOID COMMITTEE. (1987). Large-scale field trial of Ty21A live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* 1,1049-1052.
- LEVINE, M.M., HERRINGTON, D., MURPHY, J.R., MORRIS, J.G., LOSONKY, G., TALL, B., LINDBERG, A.A., SVENSON, S., BAGAR, S., EDWARDS, M.F. y STOCKER, B. (1987). Safety, infectivity, immunogenicity, and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of Salmonella typhi, 541 Tya and 543 Ty, as live oral vaccines in humans. *J. Clin. Invest.* 79: 888-902.
- MANIATIS, I., FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MARTINEZ, M.H. (1987). Sequence Analysis Programs Manual. University of California at San Francisco, San Francisco, California.
- MEKALANOS, J.J., SWARTA, D.J., PEARSON, G.D., HARFORD, N., GROVNE, F. y de WILDE, M. (1983). Cholera toxin genes: Nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* 306:551-557.
- MIDDLEBROOK, L.J. y DORLAND, B.R. (1984). Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action. *Microbiol. Rev.* 48:199-221.
- MOSELEY, S.L., HUG, I., ALIM, A.R.M.A., SO, M., SAMADPOUR-MOTALEBI, M. y FALKOW, S. (1980). Detection of enterotoxigenic Escherichia coli by DNA colony hibridization. *J. Infect. Dis.* 142:892-898.
- PEARSON, G.D. y MEKALANOS, J.J. (1982). Molecular cloning of Vibrio cholerae enterotoxin genes in Escherichia coli K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2976-2980.
- PUENTE, J.L. (1988). Caracterización del gene para la proteína de membrana externa OmpC de Salmonella typhi. CCH/UACPyP. Tesis de Maestría.
- PUENTE, J.L., FLORES, V. FERNANDEZ, M. FUCHS, Y. y CALVA, M.

- PUENTE, J.L., FLORES, V. FERNANDEZ, M. FUCHS, Y. y CALVA, M. (1987). Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from Salmonella typhi. Gene 61:75-83.
- PUENTE, J.L., FLORES, V., FERNANDEZ, M., FUCHS, Y CALVA, E. (1987). Isolation of Salmonella typhi ompC-, ompF- and phoE-like outer membrane protein genes. Twenty-seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abstract no. 716.
- RELMAN, A.D., DOMENIGHINI, M., TUOMANEN, E., RAPPUOLI, R., Y FALKOW, STANLEY. (1989). Filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis: Nucleotide sequence and crucial role in adherence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:2637-2641.
- RODRIGUEZ, L.R. y TAIT, C.R. (1983). Recombinant DNA techniques an introduction. Addison-Wesley Publishing Company.
- SANDEFUR, P.D. y PETERSON, J.W. (1976). Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of Salmonella thiphymurium. Infect. Immun. 14:671-679.
- SANDEFUR, P.D. y PETERSON, J.W. (1977). Neutralization of Salmonella toxin-induced elongation of Chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. Infect. Immun. 15:988-992.
- SILVA, B.A., GONZALEZ, C., MORA, G.C. y CABELLO, F. (1987). Genetic characteristics of the Salmonella typhi strain Ty21A vaccine. J. Infect. Dis. 155:1077-1078.
- SPICER, E. K. y NOBLE, J.A. (1982). Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Nucleotide sequence of the A subunit gen. J. Biol. Chem. 257:5716-5721.
- TABOR, S. y RICHARDSON, C.C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerasa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4771-4771.
- VERDUGO, R.A. (1989). Inmunodetección temprana de la fiebre tifoidea con preparación de proteínas de membrana externa. CCH/UACPyP-UNAM. Tesis de Maestría.
- WACHSMUTH, K. (1986). Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. R. INFEC. DIS. 8:682-692.
- YAMAMOTO, T., TAMURA, T., YOKOTA, T. y TAKANO, T. (1982). Overlapping genes in the heat-labile enterotoxin operon originating from Escherichia coli human strain. Mol. Gen. Genet. 188:356-359.
- YAMAMOTO, T., SUJAMA, A., MORI, N., YOKOTA, T. y WADA, A. (1985). Gene expression in the polycistronic operons of Escherichia coli heat-labile toxin and cholera toxin: A new model of translational control. FEBS Lett. 183:377-380.