

01672

9.
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE
PROTEINAS CON ACTIVIDAD ENTEROTOXICA
TIPO CT DE *Salmonella gallinarum***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTADA POR:

MVZ ODETE URQUIZA BRAVO

**Asesores: MVZ, M en B., Dr. Antonio Verdugo Rodríguez
QFB, M en IBB., PhD. Yolanda López Vidal
MVZ, M en C., PhD. Francisco Suárez Güemes
MVZ, EA José Antonio Quintana López**



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE
PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ENTEROTÓXICA
TIPO CT DE *Salmonella gallinarum***

Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado e Investigación
de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del grado de

MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

por la
MVZ ODETTE URQUIZA BRAVO

1995

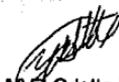
ASESORES

MVZ, M en B., Dr. Antonio Verdugo Rodríguez
QFB, M en IBB., Ph.D. Yolanda López Vidal
MVZ, M en C., Ph.D. Francisco Suárez Güemes
MVZ, EA. José Antonio Quintana López

DECLARACION

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que este ejemplar de tesis, esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

ATENTAMENTE



MVZ Odette Urquiza Bravo

DEDICATORIAS

A tí Dios por estar a mí lado.

**A mis padres :
Manuel Urquiza Sánchez y Bertha Bravo Lozano.**

**A mis Hermanos:
Betty y Manuel
por apoyarme y estar conmigo.**

**A todos mis amigos,
a quienes ya no les dediqué tiempo:
Ángeles, Gustavo, Raúl, Nora,
Chriss, Ricardo, Julia, Gaby y Kalú
por su comprensión.**

A Diana, Ma. Elena B. y Chela, por su amistad invaluable.

A Mariel R., por su apoyo, comprensión y amistad.

**A mi amigo y compañero del mismo dolor ;
Alejandro Banda,
de quien siempre tuve un apoyo en todo momento.**

**A mis 2/3 faltantes:
Salvador Tavera Carrillo y
Juan Carlos Valladares de la Cruz.
Sin ellos...**

AGRADECIMIENTOS

**A mis asesoras honorarias
y siempre amigas:
Amelia Díaz, Luz Elena Cervantes y Pilar Ramos,
por la orientación recibida.**

**A Luis Manuel, Verónica, Enrique, Julia, Gustavo,
Fer Arteaga, Fer Tuz y Gonzálo.
por su tiempo, apoyo y sus sabios consejos incondicionales,
todos ellos del INNSZ.**

**Al Dr. Guillermo Ruíz Palacios,
por la atención recibida durante mi estancia en el INNSZ.**

**Al Dr. José Antonio Quinatana y al Dr. Carlos López Coello,
por su amistad, confianza y
la virtud de escucharme y apoyarme siempre.**

**A todos los miembros y ex-miembros del DPA: Aves,
pero principalmente:**

**A mi semillita: Benjamín Barrientos,
A mis estrellitas: Blanca Bautista, Cecilia Rosario y Amando Alcalá.
A mi estrellita honoraria : Ma. Luisa Calderón
Sin todos ellos, sin su comprensión, tiempo, apoyo y compañía ...**

A mis asesores:

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez
Dra. Yolanda López Vidal
Dr. Francisco Suárez Güemes
Dr. José Antonio Quintana López

por su orientación, formación profesional y asesoría científica recibida.

A mi Jurado:

Dr. Guillermo Téllez Isaías
Dra. Camila Arriaga de Morilla
Dr. Juan Carlos Valladares de la Cruz
Dr. Ernesto Ávila González
Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

por su tiempo y por sus consejos.

A todos, !!!MUCHAS GRACIAS!!!

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Producción Animal :Aves
y el Departamento de Microbiología e Inmunología de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la
Universidad Nacional Autónoma de México,
y el Departamento de Infectología
del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".**

**Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal
Académico con el Proyecto de Apoyo para la Investigación e Innovación
Tecnológica (PAPIIT) con el No. de Proyecto IN 301691 y 506294.**

**así como con el Programa de Apoyo a la División de Estudios de Posgrado
(PADEP) Proyecto No. 016006.**

**y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la
beca crédito para estudios de Maestría No. 64403.**

**Este trabajo fue presentado en el 95avo Congreso Americano de
Microbiología, celebrado en Mayo en el Cd. de Washington, D.C. 1995.**

Acepta errores propios y de los demás.

Siempre está dispuesto a cooperar.

En todo momento es un guía, nunca egoísta.

Siempre es paciente, comprende.

Ocasionalmente se molesta.

Reúne los requisitos de un buen padre.

ODDY/95

ABREVIATURAS

TA.-	Tifoidea Aviar
CICC.-	Caldo Infusión Cerebro Corazón
CAA.-	Caldo Casaaminoácidos
CT.-	Toxina Termolábil de <i>V. cholerae</i>
CT-A.-	Subunidad A de la toxina de <i>V. cholerae</i>
CT-B.-	Subunidad B de la toxina de <i>V. cholerae</i>
LT.-	Toxina termolábil de <i>E. coli</i>
ST.-	Toxina termoestable de <i>E. coli</i>
CJT.-	Enterotoxina de <i>C. jejuni</i>
ETEC.-	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
<i>E. coli</i> HS.-	<i>Escherichia coli</i> no enterotoxigénica
CHO.-	Células de Ovario de Hamster Chino
D.O.-	Densidad Óptica
PSNC.-	Proteínas del Sobrenadante dl Cultivo
PP.-	Proteínas Periplasmáticas
UAB.-	Unidad de Actividad Biológica
PM.-	Peso Molecular
kDa.-	Kilodaltons
G _M .-	Receptor de Membrana (gangliósido)
nm	Nanómetros

CONTENIDO

	Página
Resúmen	1
Summary	3
Introducción	5
Tifoidea Aviar	6
Etiología	7
Mecanismos de patogenicidad bacteriana	9
Mecanismos de patogenicidad del género <i>Salmonella</i>	10
Toxinas bacterianas	13
Estructura y función de las exotoxinas	14
Enterotoxina de <i>Vibrio cholerae</i>	16
Enterotoxinas de <i>Escherichia coli</i>	19
Enterotoxina de <i>Campylobacter jejuni</i>	21
Enterotoxinas de <i>Salmonella typhi</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>	21
Justificación	24
Objetivos	24
Materiales y Métodos	25
Resultados	30
Discusión	34
Conclusiones	41
Literatura Citada	42

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1.- Cuantificación de proteínas y valores de absorbancia (D.O. 660 nm) de la cinética de crecimiento de <i>S. gallinarum</i> FVA-1.	53
Cuadro 2.- Cinética de crecimiento bacteriano en valores de absorbancia (D.O. 660 nm.) de las cepas utilizadas como controles, y concentración de las proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y Proteínas Periplasmáticas (PP).	54
Cuadro 3.- Efecto de las proteínas de los sobrenadantes y de las proteínas periplasmáticas de las diferentes cepas bacterianas en células CHO.	55
Cuadro 4.- Cantidad necesaria de proteínas del sobrenadante del cultivo y de proteínas periplasmáticas de <i>S. gallinarum</i> FVA-1 para producir una Unidad de Actividad Biológica en células CHO.	56
Cuadro 5.- Relación entre la cinética de crecimiento (D.O. a 660 nm.) y Actividad Específica de las PSNC de <i>S. gallinarum</i> FVA-1.	57
Cuadro 6.- Relación entre la cinética de crecimiento en absorbancia (D.O. 660 nm) y la actividad Específica de las PP de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1.	58
Cuadro 7.- Pesos moleculares aproximados obtenidos mediante <i>Immunoblot</i> de PSNC y las PP de las cepas de <i>V. cholerae</i> , <i>ETEC</i> , <i>E. coli</i> HS y <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1	59

Cuadro 8.- Actividad específica de las PSNC y de las PP de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1 y de los controles, a partir de los cultivos de 24 horas.	60
Figura 1.- Diagrama de flujo para la extracción y purificación de la enterotoxina de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1.	61
Figura 2.- Diagrama de flujo para la elaboración de <i>Immunoblot</i> .	62
Figura 3.- Concentración de proteínas de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1 en relación a su cinética de crecimiento (D.O.).	63
Figura 4.- Concentración de proteínas de <i>Escherichia coli</i> HS y en relación a su cinética de crecimiento (D.O.).	64
Figura 5.- Concentración de proteínas de <i>ETEC</i> en relación a su cinética de crecimiento (D.O.).	65
Figura 6.- Concentración de proteínas de <i>Vibrio cholerae</i> en relación a su cinética de crecimiento (D.O.).	66
Figura 7.- Cinética de crecimiento y actividad específica en células CHO con las PSNC de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1.	67
Figura 8.- Cinética de crecimiento y actividad específica en células CHO con las PP de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1.	68
Figura 9.- Ensayo de <i>Immunodot</i> con las PSNC y con las PP de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1 empleando anticuerpos anti CT, anti CT-A, y anti CT-B producidos en conejo.	69
Figura 10.- Ensayo de <i>Immunoblot</i> utilizando anticuerpos de conejo anti CT-A.	70

Figura 11.- Actividad específica en células CHO de las PSNC y de las PP de <i>Salmonella gallinarum</i> FVA-1 y de las cepas control, a partir de los cultivos de 24 horas.	71
Figura 12.- Efecto de las proteínas de los controles sobre células CHO.	72
Figura 13.- Efecto de las PSNC y PP de <i>S. gallinarum</i> FVA-1 sobre células CHO.	73

RESUMEN

Urquiza Bravo Odette.: Purificación y Caracterización Parcial de Proteínas con Actividad Enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum* (bajo la dirección de los MVZ, M en B., Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, QFB, M en IBB., PhD. Yolanda López Vidal , MVZ, M en C. PhD Francisco Suárez Güemes y MVZ, E.A. José Antonio Quintana López.

El mecanismo por el cual *Salmonella gallinarum* produce diarrea, aún no se ha estudiado al detalle. En el presente estudio se describió la actividad enterotóxica CT-like de *S. gallinarum*, valorada mediante ensayos de elongación en células CHO. Se utilizó una cepa mexicana de campo de *S. gallinarum* FVA-1, que posee una secuencia nucleotídica similar a *ctxA* y *elt A* que codifican para las enterotoxinas CT-A de *Vibrio cholerae* y LT-A de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), respectivamente. De dicha cepa se obtuvo el extracto proteico con actividad de enterotoxina, el cual es liberado al medio de cultivo cuando la bacteria está en fase logarítmica de crecimiento (PSNC). Así mismo, cuando se rompió la membrana periplasmática bacteriana usando polimixina B (PP), desde la primera hora de crecimiento, se indujo elongación en células CHO. La actividad específica de las PP de un cultivo de 24 horas de *S. gallinarum* FVA-1, después de concentrarse 20 veces, mostró que con 1 mg de proteína se obtienen $1,685 \pm 124.3$ unidades de actividad biológica, mientras que con las PSNC, se obtienen $1,128 \pm 688$ unidades. Con estos datos se determinó que *S. gallinarum* FVA-1, además de poseer una secuencia nucleotídica similar a *ctxA* de *V. cholerae* y *elt A* de ETEC, también posee actividad enterotóxica. Por otra parte, se observó la reactividad cruzada de anticuerpos policlonales anti CT-A de *V.*

cholerae, contra las proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum*, detectándose una banda de peso molecular aproximado de 66 kDa. Estos resultados, sugieren que *Salmonella gallinarum* FVA-1, produce una enterotoxina CT- like, cuyo impacto en la patogénesis podría ser relevante.*

* Enterotoxina de *Salmonella gallinarum*, *S. gallinarum*, *S. gallinarum* CT like.

SUMMARY

Urquiza Bravo Odette.: Purification and Partial Characterization of Proteins in *Salmonella gallinarum* with Enterotoxigenic Activity CT like . (under the direction of the MVZ, M in B., Dr. Antonio Verdugo-Rodríguez, QFB, M in IBB, PhD. Yolanda López Vidal, MVZ, MC. PhD Francisco Suárez Güemes and MVZ, E.A. José Antonio Quintana López.

The mechanism of *Salmonella gallinarum* produces diarrhea in poultry, has not been studied in detail. In this study, it is described the enterotoxigenic activity CT-like of *S. gallinarum*, evaluated by elongation in CHO cells assays. *Salmonella gallinarum* FVA-1, a Mexican strain from an outbreak, which possess a nucleotide sequence similar to *ctxA* and *eit A* that codifies for the *Vibrio cholerae* CT-A and enterotoxigenic *Escherichia coli* LT-A (ETEC), respectively, was used. The proteic extract with enterotoxigenic activity was obtained from the culture medium when the bacteria reached the logarithmic growth phase (SNCP). Also, elongation in CHO cells was detected when the bacterial periplasmic membrane was broken (PP) since the first hour of growth. The specific activity of the 20 folds-concentrated PP from *S. gallinarum* FVA-1, from a 24 hours growth culture, showed that, 1 mg of protein induces $1,685 \pm 124.3$ units of biological activity, whereas SNCP induces $1,128 \pm 688$ units. These data suggest that, in addition to the similarities between the *S. gallinarum* FVA-1 DNA sequences with that of *V. cholerae ctxA* or ETEC *eit A*, *Salmonella gallinarum* FVA-1 induces enterotoxigenic activity. On the other hand, by Western blot, crossed immuno-reactivity was observed using polyclonal antibodies anti CT A of *V. cholerae*. This crossed reacting antibodies identified one *S. gallinarum* FVA-1 periplasmic protein of approximately 66 kDa. These results suggest that, *Salmonella gallinarum*

FVA-1 produces a CT-like enterotoxin, whose impact in to the pathogenesis could be relevant.*

* Key Words.- *S. gallinarum* Enterotoxin, *S. gallinarum*, *S. gallinarum* CT like

INTRODUCCION.

La industria avícola actual, se caracteriza por ser altamente especializada y tecnificada. Los productos avícolas, como la carne de pollo y el huevo de gallina, representan las fuentes de proteína animal de buena calidad con mayor demanda en todos los estratos socioeconómicos de nuestro país, debido a su costo accesible y a su constante disposición en el mercado (10,62,77). Esta industria es una de las mas importantes del área pecuaria del país y también de las mas susceptibles a pérdidas económicas provocadas por factores de mercado y problemas sanitarios; de ahí que es de considerable importancia el conocimiento de los resultados de los estudios de laboratorio para determinar la frecuencia de las enfermedades de las aves (29).

Algunas de las enfermedades bacterianas que ocasionan mayores pérdidas a la industria avícola, y a la vez pueden causar graves problemas de salud pública, son las ocasionadas por el género *Salmonella*. Este género fue descrito por primera vez en 1880 y comprende aproximadamente 2,200 serotipos, de los cuales, los de interés en la industria avícola pueden ser divididos en dos grupos principales: el de las salmonelas no móviles, representado por *Salmonella gallinarum* y *S. pullorum*, y el de las salmonelas móviles, que incluye a los demás serotipos del género (2,3,6,12,14,37,43,53).

Salmonella gallinarum es el agente etiológico de la Tifoidea Aviar (TA), y *S. pullorum* de la Pulosis o Diarrea Blanca Bacilar. Estas especies no infectan al hombre. En contraste, las salmonelas móviles producen las paratifoideas en las aves, siendo las mas frecuentes en las aves *S.*

typhimurium y *S. enteritidis*, las cuales producen en el humano salmonelosis o intoxicaciones alimenticias (2,30,38).

Tifoidea Aviar

En México se reportó la presencia de *S. gallinarum* desde 1978, con la presentación de alta mortalidad en parvadas de pollo de engorda y grave desajuste en la producción en aves progenitoras y reproductoras, lo que se reflejó en una deficiencia de reproductoras pesadas, calculándose entre 450,000 y 600,000 aves para 1980. Por este hecho, la TA es una prioridad sanitaria avícola, a la cual se dedicaron los recursos existentes para su atención prioritaria, por lo que se estructuró, desde fines de 1979, una comisión interinstitucional que permitiese contar con toda la participación profesional y técnica en el problema sanitario. Los criterios básicos fueron los de erradicación en la población general de aves progenitoras del país, control y erradicación en su caso de la población general de aves reproductoras en el territorio nacional. Sin embargo, en esa época en Latinoamérica, las condiciones económicas que imperaban, no permitieron una aplicación plena de verdaderos planes de erradicación (10,34,53,).

En el año de 1984, Canadá, Estados Unidos de Norteamérica y varios países europeos, reportaron la ausencia de TA, mientras que en África, Centroamérica, Sudamérica y México se reportó un dramático incremento de la presencia de TA (57). A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha para la erradicación de la TA, aún continúan presentándose brotes de esta enfermedad (10), por lo cual, sigue siendo una enfermedad de gran importancia

económica, debido a varias causas: las aves que se recuperan de un brote, son aves con retraso en el crecimiento considerándose aves de desecho, existen portadoras asintomáticas, las aves en postura disminuyen la producción hasta en un 30%, además de que existe una baja fertilidad e incubabilidad y alta mortalidad sobre todo en aves jóvenes. (3,46,51,52,57.).

Las especies susceptibles a TA son principalmente: la gallina doméstica, guajolote, gallina de guinea, faisán, codorniz y paloma, aunque *S. gallinarum* puede ser aislada de la mayoría de las aves. (3,51,52,57).

En el caso de la gallina doméstica, la resistencia por parte del hospedador hacia *S. gallinarum* puede ser:

- a) Genética.- Las aves ligeras son menos susceptibles a una infección por *S. gallinarum*.
- b) Resistencia por la edad.- Las aves adultas son más refractarias a TA que las aves jóvenes.
- c) Acidez del contenido intestinal.- Las aves alimentadas con dietas que acidifican el tracto intestinal, son menos susceptibles a la colonización por *S. gallinarum* (57,77).

Etiología

Salmonella gallinarum es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es inmóvil, no posee cápsula, no esporula, y es anaerobio facultativo. Este microorganismo no descarboxila la ornitina, no fermenta la lactosa ni la salicina, pero sí puede fermentar y producir gas en glucosa. Se le considera un parásito intracelular facultativo (9,23). Puede

resistir 9 meses en ropa almacenada en lugares frescos y oscuros, 20 días en agua no expuesta directamente al sol, 30 semanas en cama de aves, una semana en heces de aves infectadas, tres meses en aves muertas (a partir de médula ósea), puede resistir la congelación y descongelación durante 43 veces seguidas. *Salmonella gallinarum* es sensible a los rayos ultravioleta, al calor, la desecación y a los desinfectantes comunes como el fenol al 0.1% y el formol al 2% (3,51,52,53,57,81).

El período de incubación de la TA es de 4-5 días con un curso de 5 días hasta 2 semanas, produciendo una morbilidad del 5 al 20% y una mortalidad del 5 al 50% dependiendo de la virulencia de la cepa (3,51,52,53,81).

La transmisión de TA puede ser de tipo vertical o transovárica y de tipo horizontal de forma directa o indirecta, siendo la transmisión vertical mas importante, ya que los pollitos nacen enfermos y mueren en pocos días, además, de ser la forma de perpetuación del padecimiento de una generación a otra. La transmisión horizontal es la forma de infección entre casetas de una misma granja o entre granjas (3,51,52,53,57).

Los signos clínicos que se observan frecuentemente en aves jóvenes son: apatía, somnolencia, deshidratación, empastamiento cloacal, depresión, ceguera, mortalidad, y diarrea; mientras que en aves adultas, la producción se reduce hasta un 30%, anorexia, cianosis de cresta y barbillas, deshidratación y pobre crecimiento (3,51,52,53,57,81).

La diarrea que se observa tanto en aves jóvenes como en aves adultas, es de tipo secretor, similar a las diarreas producidas por otras bacterias enteropatógenas productoras de enterotoxinas, como son *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *S. typhi* y

S. typhimurium, de las cuales se han descrito algunos de los mecanismos de patogenia para producir diarrea (5,12,20,35,36,40,48,63,65,66,71,78,80).

Mecanismos de Patogenicidad Bacteriana.

La capacidad de algunas bacterias para colonizar los tejidos de un animal, depende de algunas propiedades interrelacionadas como:

- a) Lograr acceso a alguna de las superficies del hospedador
- b) Evitar los mecanismos de defensa inespecíficos.
- c) Obtener los nutrimentos para su multiplicación y desarrollo .
- d) Capacidad para producir toxinas.

Muchas de las bacterias logran el acceso a las superficies del organismo, como es el caso de la piel y la conjuntiva o las membranas mucosas del tracto respiratorio o digestivo, pero solamente algunas penetran en forma profunda a los tejidos del organismo como resultado de heridas o abrasiones. En muchos de los casos la respuesta del primer desafío es eliminar a la bacteria del organismo o establecer una relación simbiótica con el hospedero, pero con bacterias patógenas, la respuesta puede ser con signos clínicos de la enfermedad y en algunos casos la muerte (65).

El criterio para juzgar si una toxina es responsable de signos clínicos de una enfermedad es:

- a) Se conoce que la bacteria produce toxinas.
- b) Las bacterias virulentas producen toxinas y las avirulentas no las producen.

- c) La inyección de la toxina separada de la bacteria, produce síntomas que semejan la enfermedad.
- d) El organismo infectante produce la enfermedad sin que se multiplique profusamente o que se difunda extensivamente y los órganos que se encuentran a distancia del sitio de infección son afectados.
- e) La enfermedad puede ser prevenida mediante inmunización contra la toxina (65).

Debido a las diferentes sustancias químicas que forman a las toxinas, sus mecanismos de acción y su origen no se puede emitir una definición que abarque adecuadamente a todas ellas, sin embargo, se han realizado diferentes intentos.

Estas sustancias pueden intervenir en la colonización, aumentar la invasión hacia tejidos más profundos, modificar la integridad normal y fisiológica de las células del hospedero, o, en muchos de los casos, reproducir los signos clínicos de la enfermedad. Muchos de estos productos son tóxicos para animales de laboratorio o en cultivos celulares *in vitro*, pero sólo ellos contribuyen con un paso esencial en el mecanismo de patogenia en la enfermedad natural, por lo que se les llaman toxinas virulentas (65,67).

Mecanismos de Patogenicidad del Género *Salmonella*

Muchas de las bacterias patógenas entéricas tienen la capacidad de invadir cultivos celulares de mamíferos por medio de la acción de la actina, que como resultado induce la formación de seudópodos para que sea

fagocitada a la bacteria. *Salmonella* spp, fuerza a las células del hospedero a que sean fagocitadas. La unión de *Salmonella typhimurium* y *S. choleraesuis* en cultivos celulares, produce cambios en la superficie de la célula del hospedero, semejante a un líquido que salpica (efecto "splash"), haciendo contacto con la superficie de la célula. Este efecto "splash" provoca que la membrana celular se deforme y adquiera un aspecto rugoso (membrana rugosa), que finalmente, tiene como resultado, la penetración de la bacteria dentro de una vesícula endocítica. Una vez que la bacteria es fagocitada, la célula recupera su forma normal y, dentro de la vesícula endocítica las bacterias se dividen, y diferentes vesículas crecen juntas formando grandes vesículas llevando en su interior muchas bacterias (67).

El mecanismo mediante el cual la membrana celular adquiere el aspecto rugoso para la penetración de la bacteria, parece ser mediada por un grupo de genes cromosomales designados *inv* (*inv A-P*). Se ha sugerido que muchos de los genes *inv* codifican para la producción de algunas proteínas auxiliares en el proceso de invasión. Existen otros genes llamados *hil* (hiperinvasión) que están localizados cerca de la cadena *inv* en *S. typhimurim* los cuales están encargados de aumentar la frecuencia de invasión (67).

S. typhimurium contiene plásmidos de virulencia con genes llamados, *spvA*, *spvB*, *spvC* y *spvD* organizados en un operón y *spvR* que es una unidad transcripcional separada, estos genes son altamente expresados durante la fase estacionaria de la bacteria. Los genes *spv* (*Salmonella plasmid virulence*) contienen de 50-90 kilobases, y su ausencia, reduce la capacidad de la bacteria para causar infecciones sistémicas en ratón, sugiriendo que los plásmidos llevan genes de virulencia importantes. Se ha obtenido la secuencia

de DNA de estos genes, pero el único gene que tiene una secuencia significativa similar con los genes de funciones conocidas, es *spvR*, un gene regulador. Los genes *spvA-D* codifican para las proteínas de membrana pero aún no se conoce su función completa (67).

La *S. typhimurium* ha desarrollado un complejo de adaptación a la ingestión por fagocitos. La sobrevivencia en fagocitos es debida a dos características que son: la resistencia al oxígeno, y la resistencia a las defensinas. Los genes *oxy* son expresados en presencia de tensión por oxígeno y codifican también para catalasa y para superoxidasa dismutasa, se encuentran localizados en el operón *phoP/phoQ*, los cuales controlan genes para la sobrevivencia en macrófagos. La falta de *phoP/phoQ* aumenta la DL_{50} en más de 10,000 veces, indicando que este operón regulador controla genes esenciales para la virulencia en ratones (67).

Los genes *pag* son controlados por *phoP/phoQ* y son llamados *pag* por que provienen de *phoPQ activated*, son altamente expresados con la limitación de carbono, bajo pH y condiciones aeróbicas; y los genes de represión son llamados *prg* (*phoPQ-repressed genes*), son expresados en medios enriquecidos, en condiciones aeróbicas y pH neutro. La ausencia de algunos genes *pag* (*pagA* y *pagB*) no tienen efecto en la DL_{50} , pero la ausencia de *pagC* aumenta la DL_{50} hasta 1,000 veces. El gene *pagC* codifica una proteína para la membrana externa de la cual se desconoce aún su función. Los genes *prg A-H* codifican para proteínas excretadas. *prgH* es necesaria para la virulencia de la administración oral o inyectada de la bacteria, pero su función específica en el proceso de infección no está bien establecido. La ausencia de *prgH* disminuye la invasión de macrófagos cultivados. Este hecho, y, junto con

el que *prgH* esta íntimamente unido a *hil*, que a su vez esta unido a *invA-H*, sugiere que *prgH* probablemente codifique para una invasina o una proteína involucrada en el proceso de invasión (67).

Otro factor de virulencia importante de *Salmonella* spp, en el suero, es la resistencia al sistema complemento, el cual, es debido a las grandes cadenas del antígeno O del LPS, además, existe una proteína de membrana externa producida llamada Rck (*Resistance to complement killing*), codificada por el gene del plásmido de virulencia en *S. typhimurium*. Rck, actúa previniendo la formación, y, la inserción, del complejo C9 completamente polimerizado dentro de la membrana externa de la bacteria (67).

Toxinas Bacterianas

Las toxinas se clasifican en endotoxinas y exotoxinas. Las endotoxinas forman una parte estructural del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa, mientras que las exotoxinas pueden ser producidas extracelularmente durante el crecimiento o ser liberadas durante la muerte bacteriana mediante lisis celular (65).

En aves inoculadas experimentalmente con la endotoxina (parte del LPS) de *S. gallinarum* se observa aumento de la temperatura corporal, disminución del peso de la bolsa de Fabricio y cambios en los parámetros hematológicos y serológicos (76).

Las exotoxinas clásicas son considerablemente más tóxicas que las endotoxinas, son proteínas termolábiles y pueden ser convertidas en toxoides, que pueden estimular la producción de anticuerpos, neutralizando la actividad

biológica de los efectos de la toxina, antes y frecuentemente después de ser administrada a los animales. Muchas de las bacterias Gram negativas producen exotoxinas, y a las producidas por enterobacterias se les denomina enterotoxinas (6,12,37,55).

Estructura y Función de las Exotoxinas

Las exotoxinas pueden ser divididas en tres tipos con base en su estructura y actividades.

1) **Toxina tipo A-B.**- Son aquellas toxinas que poseen dos fragmentos: Fragmento B; el cual se une al receptor de la célula del hospedero y está separado por el fragmento A, que posee actividad enzimática responsable de la toxicidad. El fragmento B, puede estar formado por un solo polipéptido o tener varias subunidades. El receptor en la célula del hospedero es reconocido frecuentemente por la subunidad B, pero no siempre se trata de carbohidratos en la superficie de la célula del hospedero. La subunidad A, penetra al citoplasma de la célula blanco ya sea inmediatamente después de la unión del fragmento B a su receptor o después de la endocitosis de la toxina completa. El fragmento A de muchas de las toxinas A-B, inactivan proteínas del huesped por unión covalente de un grupo ADP ribosil (ADP ribosilación).

2) **Toxinas que desorganizan las membranas de las células del hospedero.**- Son aquellas toxinas que pueden formar poros o hidrolizan fosfolípidos en la membrana. Las primeras, permiten que los componentes celulares salgan, entonces entra agua y por ende la célula muere. Estas toxinas pueden ayudar a la bacteria fagocitada a escapar de la vesícula

fagocítica y entrar al citoplasma de la célula del hospedero, no tienen actividad enzimática, pero producen un efecto tóxico por medio de la inserción dentro de las membranas, usualmente uno de sus receptores es el colesterol. Las segundas, son fosfolipasas, las cuales remueven una porción de lípidos de los fosfolípidos de la membrana plasmática de las células del hospedero y entonces, al ser removidos estos lípidos, la membrana se desestabiliza y ocurre la muerte celular. Ejemplo de estas toxinas son las "hemolisinas" (citotoxinas).

3) **Superantígenos.**- Son proteínas bacterianas que necesitan una estructura tipo A-B y actúan estimulando a las células T para liberar citocinas (67).

Existen dos grupos de exotoxinas basados en su mecanismo de acción:

1.- **Toxinas citolíticas.**- Fueron las primeras en ser descritas, debido a que causan hemólisis alrededor de los cultivos de agar sangre. Las toxinas citolíticas modifican la membrana celular permitiendo la salida de los componentes intracelulares, dando como resultado la lisis de la célula, aunque se ha descrito que muchas de estas toxinas son capaces de provocar cambios de permeabilidad en la membrana sin causar lisis celular como se observa con la exotoxina de *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Pasteurella haemolytica*.

2.- **Toxinas con actividad intracelular:** Son aquellas que afectan la actividad metabólica de la célula mediante 2 formas principalmente:

a) **Toxinas citotóxicas.**- Inhiben la síntesis de proteínas en el interior de la célula como se observa con las toxinas de *Shigella dysenteriae* y *Campylobacter jejuni* (40,59,65,68,73).

b) **Toxinas citotónicas** .- Activan intracelularmente la adeniliclasa, ejemplos de éstas son la toxina de *Vibrio cholerae* (CT) y la toxina termolábil *Escherichia coli* enterotoxigénica (LT). Algunas de las bacterias que colonizan el tracto intestinal, producen exotoxinas a las cuales se les conoce como enterotoxinas y ejercen su acción en los enterocitos. *Vibrio cholerae*, ETEC, *S. typhi* y *S. typhimurium* producen enterotoxinas las cuales juegan un papel muy importante en la producción de diarreas durante la infección. Se ha propuesto que uno de los mecanismos por los cuales *Salmonella gallinarum* produce diarrea es a través de una enterotoxina.

Enterotoxina de *Vibrio cholerae*

Durante la infección, *V. cholerae* no penetra a las células epiteliales del intestino, sino que el daño lo provoca por medio de la producción de una potente enterotoxina, además, la bacteria se multiplica colonizando gran parte del epitelio intestinal, interfiriendo con la capacidad de absorción del colon, dando como resultado una gran pérdida de agua del organismo (5,35,36,47,48,71).

La enterotoxina de *V. cholerae* (*cholera toxin*: CT) es una toxina de tipo A-B ADP-ribosiladora, es termolábil, y está compuesta por dos subunidades: la subunidad A con un peso molecular (PM) de 27.215 kilo Daltons (kDa) y una subunidad B con un PM de 11.67 kDa y está codificada por los genes *ctxA* y *ctxB*, respectivamente, que se encuentran en el cromosoma de la bacteria (5,47,67,71).

La molécula de la toxina biológicamente activa, esta compuesta por cinco subunidades B y una subunidad A (5,47). La subunidad B constituye el sitio de unión de la toxina con receptor de membrana de las células eucarióticas, el gangliósido G_{M1} , y posiblemente facilita la entrada de la subunidad A dentro de la célula blanco (67). La subunidad A tiene actividad enzimática y toxigénica y puede ser cortada proteolíticamente generando dos cadenas denominadas A1 y A2 (5,15,20,25,35,45,47,48,71).

Cuando *V. cholerae* coloniza el intestino delgado excreta CT, la cual se une a las células de la superficie de la mucosa del hospedero, por medio de la unión del gangliósido. G_{M1} es un ácido siálico que contiene un oligosacárido covalentemente unido a un lípido ceramida. La porción del lípido está embebida en la célula de la membrana del hospedero y el oligosacárido está expuesto en la superficie de la célula del hospedero. El oligosacárido es la mitad reconocida por la subunidad B de la toxina. *V. cholerae* secreta una neuraminidasa llamada sialidasa, que remueve los residuos del ácido siálico del complejo oligosacárido para hacerlo estructuralmente más similar a G_{M1} . Se ha sugerido que la neuraminidasa contribuye a la virulencia de *V. cholerae* aumentando el número de receptores disponibles para que se una CT (67).

Una vez que CT se une a G_{M1} , la subunidad A1 es liberada de la toxina, probablemente por medio de una reducción de la unión disulfuro que une a A2, y penetra a la célula del hospedero por medio de un mecanismo de translocación desconocido. La subunidad A1, ADP-ribosila una proteína de membrana llamada G_s . A1, ADP-ribosila otras proteínas de las células del hospedero, pero G_s parece ser el primer blanco. G_s es una proteína de la familia GTP-hidrolizantes, (llamadas proteínas G) que regulan muchos de los

aspectos de las funciones de las células eucarióticas. Gs es una proteína G que regula la actividad de la adenilato ciclasa de la célula del hospedero, a manera de una hormona-dependiente y entonces determina el nivel del AMP cíclico (AMPc) en las células blanco. La forma activa de Gs (Unión GTP), aumenta la actividad de la adenilato ciclasa, mientras que la forma inactiva de la unión GDP, extrae la adenilato ciclasa inactiva. Normalmente la forma activa es producida en respuesta a la estimulación hormonal y es convertida en forma inactiva después de un período corto. Esta "activación y desactivación", asegura que el AMPc (una molécula reguladora en células eucarióticas) se produzca en altos niveles, suficientes, para hacer su trabajo, pero no le es permitido la acumulación por interrupción de las funciones normales de la célula. Los "corto circuitos" (activación y desactivación sin control) de la ADP ribosilación de Gs, provocan que Gs permanezca "activa", y entonces, los niveles de AMPc permanecen sin control y son liberados en altos niveles. Esta variedad de efectos, provoca que exista una alteración en el transporte de sodio y cloro. Estas alteraciones producen un desequilibrio de iones que causa la pérdida de agua asociada a cólera (35,46,47,48,67).

El proceso por el cual la toxina de cólera completa es excretada hacia el fluido extracelular aún no está bien estudiado, pero CT está estructuralmente y funcionalmente relacionada a la enterotoxina lábil de *Escherichia coli* (LT) (50,67,70,72).

Enterotoxinas de *Escherichia coli*

Existe evidencia de que muchos de los casos llamados "diarrea del viajero" son causados por una infección de algunas cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). ETEC produce dos tipos de enterotoxinas, una es conocida como LT (*lábil toxin*: toxina termo lábil), y la segunda es conocida como ST (*heat-stable toxin*: toxina termoestable) (20,41,48,71).

La enterotoxina ST de *E. coli*, ha sido asociada a algunos casos de diarrea en viajeros y en niños. Es una proteína extracelular, no tiene reactividad humoral cruzada con LT o CT, tiene un peso molecular bajo (2,000 daltons) y es estable a 100°C por 15 - 30 minutos. Los genes que codifican para ST se encuentran en plásmidos y son conocidos como *estA*. Los plásmidos de ST han sido transferidos por conjugación a *V. cholerae* y otras enterobacterias, y han estimulado la acumulación de fluidos en ensayos en ratón y asas ligadas ileales en conejo, aunque la respuesta es rápida, ésta no se sostiene por más de 6 horas (5,20,22,48,65,67).

ST se divide en dos subgrupos; metanol soluble (*STa*) y metanol insoluble (*STb*). *STa* provoca un aumento en el nivel del GMP cíclico (GMPc) del citoplasma del enterocito del hospedero, este aumento, provoca la pérdida del mismo tipo de fluidos causados por la liberación descontrolada de AMPc. El sitio de unión de ST es la parte apical de la membrana de la célula intestinal del hospedero y esta unión es la que activa la guanilato ciclasa. Hallazgos recientes, han sugerido que *STa* imita una hormona que normalmente activa a GMPc. El proceso de activación requiere ATP, pero el papel del ATP no está bien entendido aún y existen muchos factores auxiliares (como las proteínas

ATP unidoras) también involucrados. *STa* y *STb* actúan de manera diferente y tienen una secuencia de aminoácidos diferente. Existe la evidencia de que los receptores de *ST* son diferentes a los de *CT* y *LT* (5,20,67).

LT tiene un peso molecular de 91 kDa, y esta compuesta por una subunidad A con un PM de 25,500 daltons y una subunidad B de 59,000 daltons. Los genes que codifican para *LT* se conocen como *elt A* y *elt B* respectivamente (5,20,65,71,75). Los genes de *LT* se localizan en una familia de plásmidos denominados *ent*, de los cuales se ha determinado la secuencia nucleotídica, observándose una alta similitud con la del gene *CT* (80 % de la secuencia de aminoácidos en la porción amino terminal de la subunidad A1, y de un 31 a 55% de similitud con el péptido A2 (20). Sin embargo, *LT* no es secretada hacia el sobrenadante durante el crecimiento en un medio de cultivo en el laboratorio, sino que se localiza en el espacio periplasmático de la bacteria (5,20,26,36,41,46,67).

Muchas de las cepas de *E. coli* producen una *LT* de tipo I (*LT-I*) que causan una diarrea secretora y activan la adenilato ciclasa en las células de la mucosa del intestino delgado (14). Existe un segundo grupo de enterotoxinas de *E. coli* denominadas *LT-II*, cuyos genes se localizan en el cromosoma bacteriano. Las *LT-II* no son neutralizadas por antiseros dirigidos contra *CT* y *LT*, aunque poseen una reacción inmunosérica cruzada muy débil con *LT-I* y *CT*. Dos miembros de la familia *LT-II* (*LT-IIa* y *LT-IIb*) están formados por subunidades A y B similares a las de *CT* y *LT-I*, con la diferencia de que la subunidad B de las toxinas del grupo *LT-II* no tiene la capacidad de unirse a G_{MI} (17,26,30,36,65,67).

Enterotoxinas de *Campylobacter jejuni*

Se ha demostrado que *C. jejuni* produce una enterotoxina que se encuentra en el espacio periplasmático, y sus propiedades inmunológicas y actividad enzimática son similares a CT y LT. Esta enterotoxina induce elongación en células de ovario de hamster chino (*chinese ovary cell*: CHO), lo cual indica que el AMP cíclico intracelular se encuentra elevado. Los hallazgos obtenidos por Daikoku *et al.* (16) y Díaz-Barroso *et al.* (18), sugirieron que existe una banda de 68 kDa y 62 kDa empleando anticuerpos IgG anti CT y anti CT-B, respectivamente. La toxina de *C. jejuni* (CJT), puede ser neutralizada con antisuero de CT y LT. Sin embargo, aunque CT se une preferentemente al gangliósido G_{M1} mas que al GD1b, CJT no se une la gangliósido GD1b pero si se une al gangliósido G_{M1}. CJT está muy relacionada con la producción de enfermedades diarreicas (1,7,16,28,39,55, 64,74,80) .

Las preparaciones concentradas de *Campylobacter jejuni*, inducen acumulación de fluidos en asas ileales ligadas de rata y conejo, pero no en ensayos de ratón lactante.

Enterotoxinas de *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*

En trabajos recientes sobre la patogenia de las infecciones intestinales causadas por *S. typhi* y *S. typhimurium*, se ha propuesto que producen una enterotoxina que altera la secreción de fluidos y electrolitos en el intestino, como las que inducen las toxinas de *V. cholerae*, *E. coli* y *C. jejuni*. Dichas

enterotoxinas podrían tener un papel importante en los padecimientos entéricos producidos por *Salmonella* (12,65).

Fernández *et al.*, en 1988, aislaron un gene de *S. typhi* que codificaba para una enterotoxina que tenía similitud con CT y LT. La enterotoxina codificada por un colifago recombinante λ FDC1, induce secreción de fluidos en asas ileales en rata, elonga células CHO, y es antigénicamente similar a LT cuando se confrontó con anticuerpos por medio de ELISA. El DNA del λ FDC1, contiene una secuencia que hibrida con el gene que codifica para la subunidad B de LT; y, cuando fue hibridado en las mismas condiciones para su detección, no se observó homología con el gene para la subunidad A de LT. Sin embargo, el hecho de que la actividad enterotóxica pueda ser detectada en asas intestinales ileales ligadas en rata y en elongación en células CHO, sugiere que la enterotoxina de *S. typhi* tiene una subunidad funcionalmente similar a CT-LTA (24).

Estudios hechos por Prasad *et al.* en 1992 (59), donde clonaron el gene de plásmido *stn* de *S. typhimurium* en *Escherichia coli*, que codificaba para enterotoxina CT-like, mostraron que existió secreción de fluidos en el modelo de asas intestinales ligadas en conejo, y posteriormente Chopra *et al.*, en 1994 (11), demostraron que el título de elongación en células CHO, se incrementa cuando el gene *stn* es mayormente expresado en medios con alta osmolaridad.

La actividad biológica de las enterotoxinas similares a CT y LT de *S. typhimurium*, evaluadas *in vitro*, también producen una elongación en células CHO, así como un incremento en la secreción de fluidos en asas ligadas intestinales ileales de ratón, sugiriendo una similitud en el mecanismo

de patogenia entre las enterotoxinas de *S. typhi* y *S. typhimurium*, con CT y LT subunidad A (11,24,26,27).

La enterotoxina de *S. typhi* parece tener un receptor diferente a G_{M1} de las membranas eucarióticas (12), mientras que la enterotoxina de *S. typhimurium* puede ser neutralizada por una antitoxina de cólera y su efecto biológico en células CHO es bloqueado por el gangliósido G_{M1} (12,26).

Se ha demostrado también que anticuerpos contra el fragmento B de CT (CT-B) de *V. cholerae*, puede neutralizar la actividad biológica de la toxina de *S. typhimurium*, así como la elongación de células CHO que induce. Por lo antes mencionado, se resume que existe una relación antigénica entre las enterotoxinas de *V. cholerae*, *E. coli*, *C. jejuni*, *S. typhi* y *S. typhimurium* y que la LT de *E. coli* y *S. typhimurium* poseen determinantes antigénicos presentes en CT-B (12,68).

Recientemente, se demostró que *S. gallinarum* posee una secuencia nucleotídica homóloga con un fragmento del gene *elt A* de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en un 95% y con el gene *ctx A* de *V. cholerae* en un 83%. Así mismo, mediante ensayos de asas intestinales ligadas de rata, se observó que lisados de *S. gallinarum* generaban un incremento en la secreción de fluidos (4,79).

Con base en los estudios anteriores se sugiere que *S. gallinarum* produce una enterotoxina similar a CT de *V. cholerae* y a LT de ETEC.

JUSTIFICACIÓN

- Se desconocen los mecanismos de patogenia de *S. gallinarum*.
- No se ha descrito, la existencia de una enterotoxina de *S. gallinarum* y si dicha toxina interviene como parte del mecanismo de patogénesis de la enfermedad.
- No se ha descrito un ensayo para medir la capacidad enterotoxigénica de *S. gallinarum* en células CHO.
- No se ha determinado la reactividad cruzada contra LT de *ETEC* o CT de *V. cholerae*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las cepas de *S. gallinarum* que contienen el gene *ctxA like*, producen una enterotoxina con actividad biológica y determinar la existencia de reactividad cruzada con los anticuerpos anti-CT por *Immunoblot*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si las cepas de *S. gallinarum* de referencia, poseen actividad biológica mediante ensayos en células CHO.
- Por medio de *Immunodot* e *Immunoblot*, determinar la existencia de inmunoreactividad cruzada de sueros anti-CT contra las proteínas de *S. gallinarum* con actividad biológica.
- Determinar si la toxina, se libera al ambiente o permanece en el espacio periplasmático.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas utilizadas para este estudio fueron:

1) *Vibrio cholerae* de referencia " El Tor Inaba" E 38776 FMV 087772 obtenida del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ); 2) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) de referencia Núm. 5-II, obtenida del INNSZ; 3) *E. coli* no enterotoxigénica de referencia HS, del Centro para el Desarrollo de Vacunas en Maryland, donada del INNSZ (44); 4) *S. gallinarum* FVA-1 donada por la Dra. Trinidad Perusquía del Departamento de producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM (4).

Extracción de las Enterotoxinas

Se realizó un cultivo primario con ochenta colonias de las cepas de *V. cholerae*, ETEC y *E. coli* HS por separado, en matraces Erlenmeyer de 250 ml., conteniendo 50 ml. de medio líquido de Casaminoácidos (CAA), suplementándose con 0.15 % de Extracto de Levadura¹, 0.25 % de NaCl², 0.87% de K₂HPO₄², 0.005% de MgSO₄², 0.005% de MnCl₂², 0.005 % de FeCl₂, 0.8% de NaOH 3M² y 0.2% de CAA³, incubándose en agitación a 200 RPM⁴ durante 24 horas a 37° C (21,22).

Diez ml de cada cultivo primario fueron sembrados en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml. de CAA y se incubaron bajo las condiciones antes descritas.

¹ Bioxón de México, S.A. de C.V., Cuautitlán, Edo. de Méx.

² J.T. Baker S.A. de C.V., Edo. de Méx. México

³ Difco, Laboratories, Detroit, Michigan. USA.

⁴ New Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A., Modelo G-24

Cada 2 horas de incubación se obtuvieron alícuotas de 20 ml, midiéndose Densidad Óptica (D.O.) a 660 nm, por medio de espectrofotometría⁵. Cada alícuota fue centrifugada a 12,000 RPM durante 30 minutos a 4 °C⁶. El sobrenadante se mantuvo en refrigeración para posteriormente ser filtrado a través de membranas de 0.22 µm⁷. El precipitado de células obtenido, fue lavado 2 veces con una solución amortiguadora salina fosfatada (PBS) con pH 7.4 y centrifugado en cada ocasión a 12,000 RPM a 4°C. En el último lavado, la pastilla fue resuspendida con PBS, se trató con 0.001g/10ml de sulfato de polimixina B⁸, (22,59) y se incubó en agitación durante 30 minutos a 37 °C. El sobrenadante obtenido fue filtrado como se describió anteriormente.

La misma metodología fue empleada para la extracción de la enterotoxina de *S. gallinarum* FVA-1, excepto que se utilizó Caldo Infusión Cerebro Corazón (CICC) en lugar de CAA (19,66), además, se obtuvieron las alícuotas cada 30 minutos desde la 1a. media hora de incubación, hasta las 6 horas y posteriormente cada dos horas (Figura 1).

Las proteínas de los sobrenadantes del cultivo (PSNC) y las proteínas periplamáticas (PP) obtenidas de las células tratadas con polimixina, fueron precipitadas posteriormente con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)⁸ al 70% y se dializaron contra una solución de trizma base al 0.05 M, NaCl 0.2 M, Na₂EDTA 0.001 M, NaN₃ 0.003 M⁹, pH 7.5. Las proteínas precipitadas se analizaron mediante geles de poliacrilamida-SDS al 12 % (1,42), depositándose en cada

⁵ Beckman, USA, Mod. DU

⁶ Sorvell, RC-5B, DuPont Company, Wilmington, DE.,USA.

⁷ Millipore HVLP02500

⁸ Sigma, Chemicals. St. Louis, MO. USA

carril, aproximadamente 1µg de cada muestra, tanto de los controles positivos y negativos, como de *Salmonella gallinarum* FVA-1.

En la preparación de los geles de poli(acrilamida)-SDS al 12 %, se utilizó una solución madre de bis(acrilamida)⁹ 30:0.8%, persulfato de amonio al 10%⁹, duodecil sulfato (SDS) al 10 %⁹, TEMED⁹, y agua desionizada.

Las muestras fueron tratadas con una solución amortiguadora de disociación, que consistió de tris HCl⁹ al 0.626M, pH 6.8, glicerol⁹ al 20%, mercaptoetanol 14M⁹, SDS 10%, y azul de bromofenol al 0.1%, en relación 1:1, calentándose a 100°C durante 5 minutos.

El voltaje administrado fue de 100 volts durante 3 horas.

Los métodos inmunológicos empleados para este trabajo, tienen como base la detección de antígenos o anticuerpos en monocapa, usualmente uno de ellos adherido a la fase sólida (plástico o papel). El complejo formado antígeno- anticuerpo se detecta por la utilización de un conjugado (antígeno ó anticuerpo marcado enzimáticamente) con peroxidasa o fosfatasa. La enzima unida es capaz de utilizar sustratos incoloros para convertirlos en coloridos e insolubles, permitiendo detectar la evidencia de la reacción antígeno-anticuerpo.

Los ensayos inmunológicos empleados en este estudio fueron: *Immunodots* e *Immunoblots* descritos previamente (1,42). para estos ensayos, se utilizó suero hiperinmune anti-subunidad A de CT. Los sueros hiperinmunes contra CT y CT-A fueron producidos en conejo a partir de la toxina comercial CT subunidad A¹⁰ (Figura 2).

⁹ Bio Rad Laboratories, Richmond, CA. USA

¹⁰ List Biological Laboratories, Inc. Campbell CA. USA

La actividad biológica de la enterotoxina fue realizada en ensayos con células CHO (8,31,64). Un cultivo confluyente de 48 horas de células CHO, fue tratado con tripsina al 0,25%, una vez desprendidas las células, se resuspendieron en medio F-12¹¹ con suero fetal bovino al 2% y se depositaron 200µl de esta suspensión en cada pozo, con una concentración de 1,000 células/pozo. La placa fue incubada durante 20 minutos para permitir la adherencia de las células a la placa. Las PSNC y las PP de *Salmonella gallinarum* FVA-1 fueron diluidas en el medio F-12 desde la dilución 1:2 a 1: 128, al igual que las PSNC y las PP de *ETEC*, las PSNC y las PP de *V. cholerae* fueron diluidas desde 1:32 hasta 1:2056. Finalmente se depositaron 30 µl de cada muestra en cada pozo. El control positivo conocido fue CT¹⁰ comercial y el control negativo fue el mismo medio F-12, la solución de dializado y las PSNC y PP de *E. coli* HS.

Las placas fueron incubadas durante 72 horas, realizándose lecturas cada 24 horas para la observación de elongación, considerándose como positivos aquellos pozos en donde se observara el 50% de elongación.

Las Unidades de Actividad Específica se definieron mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de proteína que indujeron el 50\% de elongación (1UAB)}}{1 \text{ mg de proteína}}$$

¹¹ Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Grand Island, NY, USA
 * 1 UAB.- 1 Unidad de Actividad Biológica

Donde es necesario determinar la cantidad mínima de proteína que indujo el 50 % de elongación (1UAB) y se determina el número de unidades de actividad biológica producidas por mg de proteína.

RESULTADOS

Cuantificación Proteica.- Mediante la cuantificación de proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) de *S. gallinarum* FVA-1, obtenida por medio del estuche comercial BCA, que se basa en el uso del ácido bicinonínico¹ (56), se determinó una concentración máxima de proteínas correspondiente a 2.67 mg/ml, durante las primeras dos horas de crecimiento, y aunque finalmente a las 24 horas existió una disminución en la concentración (0.052 mg/ml), se observó una tendencia a mantenerse constante durante todo el crecimiento de la bacteria (promedio $2.1 \pm$ mg/ml) (Cuadro 1 y Figura 3).

En la cuantificación de las proteínas del espacio periplasmático (PP) de *S. gallinarum* FVA-1, previa liberación con polimixina B, se observó una concentración máxima de 2.48 mg/ml durante las primeras dos horas de crecimiento y una reducción hasta 0.236 mg/ml a las 4.5 horas. Posteriormente existió una elevación, aunque menor a la concentración de las primeras dos horas, y, a las 24 horas se observó una reducción drástica en dicha concentración proteica (0.0745 mg/ml) (Cuadro 1 y Figura 3).

Las PSNC de *E. coli* HS, utilizada como control negativo, no fueron detectadas, en contraste con las PP de este mismo cultivo donde se observa que la cantidad mayor fue de 1.770 mg/ml encontrada a las 24 horas de crecimiento. Las proteínas correspondientes al crecimiento de 12 a 16 horas, no fueron detectadas, coincidiendo con el momento en que hubo un descenso en la lectura del valor de absorbancia debido al comienzo de la lisis celular (Cuadro 2 y Figura 4).

¹ Pierce Chemical, Co., Rockford, IL, USA

Las PSNC de *ETEC* no fueron detectadas, en contraste con las PP, donde la mayor cantidad de proteínas se encontró a las 24 horas del cultivo a una concentración de 3.904 mg/ml (Cuadro 2 y Figura 5).

Las PSNC de *E. coli* HS y *ETEC* no fueron detectadas durante las 24 horas de crecimiento.

La cinética de crecimiento de *V. cholerae* y su cuantificación de proteínas se muestran en la figura 6, donde se observa que la máxima concentración de las PSNC se detectó a las 24 horas de incubación, cuando la bacteria está en fase de lisis celular. Las PP se detectaron de manera irregular, existiendo una liberación máxima a las 24 horas de crecimiento, aunque entre las 14 y las 16 horas también existió esa misma producción. Entre las 6 y las 10 horas del cultivo de *V. cholerae* se detectó una liberación de proteínas hacia el medio sin que existiera una ruptura de las células por acción de polimixina B, lo cual coincide con la primera elevación de proteínas por acción de polimixina B, sugiriendo que en ese momento se inicia la liberación de proteínas hacia el medio (Cuadro 2 y Figura 6).

Actividad Biológica en células CHO.- La elongación de células CHO inducida por las PSNC y por las PP de *S. gallinarum* FVA-1, fue observada a las 48 horas post-exposición, estos resultados fueron similares a lo descrito con *CJT* en donde esta elongación es observada después de 48 horas de exposición. En contraste, se observó que el efecto de las PSNC de *V. cholerae*, así como las PSNC y las PP de *ETEC*, fue a las 24 horas post exposición. Con las PSNC y las PP de *E. coli* HS, no se observó elongación aún después de 72 horas post-exposición a dichas proteínas (Cuadro 3).

* Díaz-Barroso A. Departamento de Infectología, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", datos no publicados.

Para inducir el 50 % de elongación, se requirió un mínimo de 18.9 μg de PSNC de *S. gallinarum* FVA-1 de la primera media hora de incubación. En contraste, se necesitaron $1.08 \pm 0.66 \mu\text{g}$ de estas proteínas a partir de un cultivo de 24 horas para obtener los mismos resultados. Con las PP de *S. gallinarum* FVA-1, fue necesario utilizar 37.2 μg de proteínas, de un cultivo de 2 horas, para observar 50 % de elongación (Cuadro 4).

La actividad específica de las PSNC de *S. gallinarum* FVA-1 de 24 horas, fue 1128 ± 688 unidades de actividad biológica (UAB)/mg de proteína, mientras que con las PP de este mismo cultivo fue de 1685 ± 1243.3 UAB/mg (Cuadro 5 y 6, Figuras 7 y 8).

Ensayos Inmunoenzimáticos

Immunodot .- Mediante el uso de anticuerpos anti CT-A contra 1.4 μg de las PSNC y 1.48 μg de las PP de *S. gallinarum* FVA-1, no se observó inmunoreactividad. En contraste, usando 2 μg de CT comercial, se observó inmunoreactividad positiva (Figura 9).

Immunoblot .- Por medio de *Immunoblot*, utilizando anticuerpos anti CT-A, en las PP de *S. gallinarum* FVA-1 (cultivo de 24 horas), se detectó una banda de aproximadamente 66 kDa, en contraste, no se observó reactividad contra las PSNC. En las PSNC de *V. cholerae* de 24 horas, que se utilizaron como control positivo, se observó una banda de 66 kDa, mientras que en las PSNC de 24 horas de *ETEC*, se observó una banda de 60 kDa

aproximadamente, en contraste con las PP de este mismo cultivo, donde se observaron bandas de 60, 89 y 97 kDa aproximadamente. En las PSNC de *E. coli* HS de 24 horas usada como control negativo, se observaron bandas débiles de 60 y 80 kDa. aproximadamente, en contraste, con las PP de este mismo cultivo, solamente se observó una banda de 60 kDa. aproximadamente. Cabe mencionar que se utilizaron también como controles positivos *CT*, *CT-A* y *CT-B* comerciales, en donde se observó que *CT* muestra una banda, con un peso molecular aproximado de 26 kDa; contra *CT-A* se revelaron dos bandas, una de 26 y otra de 11 kDa aproximadamente, y, contra *CT-B* se detectó, una banda de 66 kDa, aproximadamente (Cuadro 7 y Figura 10).

DISCUSION

Se ha determinado que las enterotoxinas bacterianas son factores importantes en los mecanismos de patogenia de muchas enfermedades diarreicas. (58,78).

Algunos estudios han sugerido la participación de enterotoxinas del tipo CT o LT en la patogenia de infecciones por *Salmonella* (24,25,40,58,67). Se ha demostrado que existe una secuencia homóloga de DNA cromosomal entre algunas cepas de *Salmonella* (12,24), y los genes *ctxA* de CT y *elt A* de LT (4) que inducen elongación en células CHO (24,59) y que además, lisados de *Salmonella gallinarum*, inducen acumulación de fluidos en asas ligadas intestinales en rata (79).

Tomando en cuenta lo anterior y que las diarreas observadas por *V. cholerae*, *E. coli*, (12,67) *C. jejuni*, (64) *S. typhi* (63), *S. typhimurium* (58) y *S. gallinarum* (57,78) son de tipo secretor y que se desconocen los mecanismos de patogenia de *S. gallinarum*, en este estudio, se determinó mediante ensayos en células CHO, que la cepa de *S. gallinarum* FVA-1, que contiene una secuencia génica parcial similar a *elt-A* y a *ctxA* sintetiza proteínas con actividad de enterotoxina y se determinó, además, la existencia de una reactividad cruzada de estas proteínas con anticuerpos anti-CT-A por medio de *Immunoblot*.

La actividad biológica de las enterotoxinas similares a CT, LT y CJT de *S. typhi* y de *S. typhimurium*, evaluadas *in vitro*, producen una elongación de las células CHO, así como un incremento en la secreción de fluidos en asas ligadas intestinales ileales de rata, sugiriendo una similitud en el efecto entre las enterotoxinas de *S. typhi* y *S. typhimurium* con CT y LT (24,26,27).

En 1975, Kunkel *et al.* (41), demostraron la existencia de una enterotoxina de *S. enteritidis* que estaba muy relacionada a la membrana externa de la bacteria. Sadruddin *et al.* (66), en 1981; Prasad *et al.* (58,59), en 1990 y 1992 y, Chopra *et al.* (11), en 1994, demostraron la existencia de una enterotoxina similar a CT producida por *S. typhimurim* y que inducía elongación en células CHO; sin embargo, no especifican las condiciones en las que se observó dicho efecto, es decir, concentración protéica, tiempo de exposición a la toxina y valoración de la actividad biológica.

Se ha demostrado que es suficiente 1 µg/ml de CT de *V. cholerae* para producir una elevación de AMP cíclico intracelular en 18 diferentes líneas celulares de mamíferos, y la respuesta máxima (elongación) en células CHO, se ha observado a las 24 horas posteriores a una exposición de CT de *V. cholerae* (30).

Por otra parte, se ha demostrado que CT de *V. cholerae* es liberada al medio y una mínima cantidad permanece en el espacio periplasmático. (50,67,70,72). En contraste, se ha observado que LT de ETEC es liberada al ambiente durante la fase estacionaria de crecimiento o cuando la membrana del espacio periplasmático es lisada por la acción de antibióticos (5,20,26,36,41,46,67). En este estudio, para saber si las proteínas con actividad de enterotoxina de *S. gallinarum* FVA-1 se encontraban en el sobrenadante o en el espacio periplasmático, se procedió a realizar ensayos con ambos tipos de proteínas en células CHO, para conocer su actividad biológica relacionándola con su cinética de crecimiento. Los resultados obtenidos indican la existencia de proteínas que inducen elongación en células CHO a partir de ambos tipos de proteínas, las cuales tuvieron una actividad específica de $1,128 \pm 688$ y de $1,685 \pm 1243.3$ unidades/mg de proteína (U/mg) respectivamente, después de 48

horas de exposición. Las proteínas de los controles positivos (*V. cholerae* y *ETEC*), tuvieron una actividad específica de 4,166 U/mg con las PSNC y 934 U/mg con las PP de *V. cholerae*, y 68.35 U/mg para *ETEC* con PP cuyos resultados fueron observados 24 horas post-exposición. Con las PSNC de *ETEC* no se obtuvieron resultados positivos, por lo que la actividad específica fue nula (0.0 U/mg). Con las PSNC y las PP de *E. coli* HS, utilizada como control negativo, no se observó elongación aún después de 72 horas de exposición, la actividad específica fue nula (0.0 U/mg) (Cuadro 8 y Figura 11).

La elongación en células CHO, tanto con las PSNC como con las PP de *S. gallinarum* FVA-1, 48 horas post-exposición, sugiere que la actividad específica de estas proteínas es diferente que la de *CT* y *LT*. Esta misma situación ha sido descrita por Díaz-B* en 1995, para la enterotoxina de *Campylobacter jejuni* (*CJT*), cuya actividad específica en células CHO, es observada después de 48 horas post-exposición (18). Los resultados de los controles positivos, utilizados en este estudio, muestran que existe actividad biológica menor con las PP de *Vibrio cholerae*, en contraste con las PSNC de este mismo cultivo, aunque la cantidad de proteínas cuantificadas fue mayor. Las PSNC de *ETEC* no fueron detectadas, y no se observó actividad biológica, posiblemente debido a la manera en que fueron purificadas las proteínas. Cuando se evaluó *CT* comercial, usada como control positivo, la elongación fue observada a las 24 horas post-exposición, mientras que en el PBS, CAA, CICC, Medio F-12 y la solución para dializar, utilizados como controles negativos, no se observó elongación, aún después de 72 horas post-exposición.

* Departamento de Infectología, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". Datos no publicados.

Un hallazgo interesante, es que en las células CHO expuestas, tanto a las PSNC como a las PP de *S. gallinarum* FVA1 sin diluir, se observó un efecto temprano de vacuolización a las 24 horas post-exposición, similar a lo descrito por Cover y Blaser (13), en 1992; Papini *et al.* (54) en 1993 y Schmitt y Haas en 1994 con *Helicobacter pylori* durante las primeras horas post-exposición. Por otra parte, las PSNC y las PP de *S. gallinarum* FVA-1, mostraron un efecto citotóxico similar a lo descrito por Guerrant *et al.* (32) en 1987 y Mizuno *et al.* en 1994, debido a una citotoxina producida por *Campylobacter jejuni*. Estos hallazgos sugieren, que además de la existencia de una proteína con actividad biológica de enterotoxina tipo CT en *S. gallinarum* FVA-1, también podrían existir otros componentes proteicos con actividad tóxica que producen lisis celular, y cuyo efecto es observado dentro de las primeras 24 horas post-exposición, por lo que podrían estar enmascarando el efecto de enterotoxina. El efecto citotóxico de las proteínas encontradas en *S. gallinarum* FVA-1, fue eliminado al realizar diluciones dobles seriadas de estos sobrenadantes en el medio F-12 de las células CHO, para entonces observar el efecto de enterotoxina (13,32,49,54,69) (Figuras 12 y 13).

Por otra parte, debido a que se trabajó con diferentes géneros bacterianos, se optimizó el método de obtención de las proteínas para que las concentraciones de cada una de las especies en este estudio fueran similares. Las cantidades de PSNC y de PP procedentes de cultivos de 24 horas de ETEC, *E. coli* HS, *V. cholerae* y *S. gallinarum* FVA-1 obtenidas en este estudio, fueron en promedio muy similares (2.8 mg/ml) en todas las cepas utilizando los métodos descritos anteriormente para su extracción. Lo anterior coincide con Duhamel *et al.* (19), quien detectó que la misma cantidad de proteínas se puede encontrar desde las primeras 6 horas de cultivo hasta las 24 horas.

En algunos estudios, se menciona que es necesaria una aereación del cultivo, por medio de agitación de 100 rpm hasta 300 rpm, para obtener una máxima cantidad de enterotoxina (19,22,41,60,61). En este trabajo, se utilizaron de 150 a 200 rpm, y se obtuvieron resultados similares, con un volúmen de 1/3 en comparación de otros trabajos donde se emplean volúmenes menores (1/10).

La cantidad de sulfato de amonio utilizada para la precipitación de proteínas en el presente trabajo fue de 70%, mientras que en otros ensayos se han empleado desde el 60% hasta el 90 %. (1,22,40,61). En otros trabajos, las proteínas fueron concentradas desde 6 a 30 veces, a través de membranas de ultrafiltración³ (19,22,25,41). Así mismo, las proteínas obtenidas por medio de la precipitación de sulfato de amonio solamente, fueron concentradas 20 veces para obtener resultados en los ensayos celulares e *Immunoblot*, no así en *Immunodot*, ya que a pesar de esta concentración obtenida de las PSNC y de las PP de *S. gallinarum* FVA-1, en 20µl de estas muestras depositados en la membrana de nitrocelulosa⁴, solamente había 1.4 y 1.48 µg respectivamente, cantidad insuficiente para obtener resultados positivos por medio de *Immunodot*, en contraste con el control positivo de CT comercial, donde fueron depositados 2 µg de la muestra, con los cuales se observaron resultados positivos. Para este ensayo no se utilizaron las PSNC de *V. cholerae* ni las PSNC de *ETEC* ni sus PP las cuales hubieran sido controles positivos más adecuados para evaluar con mejor certeza este ensayo.

En ensayos de *Immunoblot* realizados por Rahman *et al.* (60) en 1994 y Harme *et al.* (33) en 1994, demostraron la existencia de una enterotoxina de *S. typhimurium* y *S. newport* con un peso molecular aproximado de 100 kDa, pero

³ Amicon Corp., Lexington, Mass.

⁴ Sigma Chem. Co., St. Louis, MO.

que no estuvieron antigénicamente relacionadas con *CT*, *LT* o la toxina de *Shigella*. La enterotoxina de *S. typhimurium* y la de *S. typhi*, tampoco se unieron al gangliósido G_{M1} , aunque sí tuvieron actividad biológica en células CHO (24,61). En el presente estudio, la banda detectada en *S. gallinarum* FVA-1 de las PP, que tuvo un peso molecular aproximado de 66 kDa, si estuvo relacionada con la subunidad A de *CT*, ya que se utilizaron anticuerpos anti-*CT-A*. Por otra parte, Prasad *et al.* en 1992, demostraron que la afinidad de la enterotoxina de *S. typhimurium* hacia G_{M1} fue 3,000 veces menor que la de *CT*, de ahí la importancia de realizar ensayos de ELISA G_{M1} a partir de las PSNC y de las PP de *S. gallinarum* FVA-1. Sería conveniente concentrar aún más las proteínas (quizás con otra metodología) las PSNC y las PP de *S. gallinarum* FVA-1 para encontrar si existe afinidad o no hacia el gangliósido G_{M1} o por otra parte, si se trata un receptor diferente, realizar ensayos con otros receptores.

Para establecer si la banda detectada en este trabajo, por medio de *Immunoblot*, utilizando anti-*CT A*, coincide con la bandas de 100 kDa descritas por Rahman *et al.* (60) y Harne *et al.* (33), en *S. typhimurium* y *S. newport* respectivamente, sería necesario seguir la misma metodología realizada en esos trabajos, o utilizar esas cepas pero con esta misma metodología, ya que al realizar *Immunoblot* con las PP de *S.gallinarum* FVA-1 y con las PP de *V. cholerae* y *ETEC*, se observó que las bandas reveladas, fueron de peso molecular distinto al descrito por otros investigadores, además que también se utilizó una metodología diferente para la extracción y purificación de dichas proteínas (5,20,35,46,47,48,65,71,75). Por otra parte, cuando se utilizaron *CT*, *CT-A* y *CT-B* comerciales, las bandas reveladas en este trabajo, sí coinciden con las bandas descritas por estos investigadores. Cabe aclarar, que el método de extracción de estas proteínas fue diferente al descrito por diferentes autores (19, 25, 40, 41, 58,

66), por lo que es probable que existan proteínas de agregación (59) por el tipo de purificación utilizado en este trabajo.

Por toda la información obtenida en este estudio, se sugiere que *Salmonella gallinarum* FVA-1, que contiene una secuencia génica similar a *ctxA* de *Vibrio cholerae* y a *elt A* de *ETEC* (4), produce una proteína capaz de inducir elongación en células CHO, aunque es necesario mayor tiempo de exposición para poder determinar su efecto, y su respectiva actividad específica. También en este estudio se demostró que existe reactividad cruzada con anticuerpos anti CT-A, a partir de las PSNC y con las PP de *S. gallinarum* FVA-1. Por último, se debe enfatizar que el hallazgo del efecto de vacuolización y lisis celular temprano en células CHO antes de las 24 horas post-exposición, pudiera sugerir la existencia de una citotoxina que produce focos necróticos en corazón, intestino, páncreas, e hígado en aves moribundas infectadas en forma natural por TA (3), y sería el primer reporte descrito para el género *Salmonella*.

En los estudios hechos por Prasad *et al.* (59) en 1992, la actividad enterotóxica tipo CT y LT en *S. typhimurium*, fueron realizados por medio de clonación en *ETEC* del gene *stn* de *S. typhimurium*, sería conveniente que para estudios posteriores se realizara la clonación de este gene de *S. gallinarum* para demostrar esta actividad y confirmar los hallazgos encontrados en este trabajo, además de conocer el papel de las proteínas con actividad de enterotoxina y de las proteínas citotóxicas dentro de la patogénesis de *S. gallinarum*. Por otra parte, se debe demostrar como es la producción de estas proteínas, su ensamblaje y su excreción.

CONCLUSIONES

- Las proteínas obtenidas del sobrenadante del cultivo y las proteínas del espacio periplasmático de *S. gallinarum* FVA- 1, tienen actividad enterotóxica, la cual fue observada mediante elongación en células CHO, desde la primera media hora del cultivo bacteriano.
- Se demostró la existencia de reactividad cruzada entre proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum* en su forma desnaturalizada, y CT-A de *V. cholerae*, empleando anticuerpos anti subunidad A de la toxina de *V. cholerae*.
- Se encontró que también existe, un efecto de citotoxina a partir de las PSNC y de las PP de *S. gallinarum* capaz de producir lisis celular.
- Se observó, además un efecto vacuolizante temprano con las PSNC y con las PP de *S. gallinarum* FVA-1 en células CHO.

LITERATURA CITADA

- 1.- Angeles, M.V.: Obtención y caracterización de la enterotoxina de *Campylobacter jejuni*. Tesis de licenciatura. *Fac. de Cien. Biol.* Instituto Politécnico Nacional. México, D.F., 1986.
- 2.- Anónimo: All about Salmonella. *Misset World Poult.*, 4:25-27 (1992).
- 3.- Ashton, W.L.G.: Fowl Typhoid. Poultry Diseases. edited by Jordan, F.T.W. 3rd Ed. *Baillière Tindall*, London, England. 1990.
- 4.- Balcázar, Q.J.: Determinación de la existencia de un gene para una enterotoxina LT-like en *Salmonella gallinarum*. Tesis de licenciatura. *Fac. Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1993.
- 5.- Betley, J.M., Miller, L.V. and Mekalanos, J.J.: Genetics of bacterial enterotoxins. *Ann. Rev. Microbiol.*, 40: 577-605 (1986).
- 6.- Bouzouba, K., Nagaraja, V.K., Newman, A.J. and Pomeroy, S.B.: Use of membrane proteins from *Salmonella gallinarum* for prevention of fowl typhoid infection in chickens. *Avian Dis.*, 31:699-704 (1987).
- 7.- Calva, E., Torres, J., Vazquez, M., Angeles, V., de la Vega, H. and Ruiz-Palacios G.M.: *Campylobacter jejuni* chromosomal sequences that hybridize to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* LT enterotoxin genes. *Gene*, 75:243-251 (1989).
- 8.- Caprioli, A., Falbo, V., Roda, G. L., Ruggeri, M. F. and Zona, C.: Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.*, 39: 1300-1306 (1983).

- 9.- Carter, R.G. and Chengappa, M.N.: *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 4th ed. *Lea & Febiger*, Philadelphia, 1991.
- 10.-Castañeda, L.E.: Informe de los casos recibidos en el Departamento de Producción Animal :Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para el diagnóstico de *Salmonella gallinarum* en el período 1982-1993. Tesis de licenciatura. *Fac. Med. Vet. y Zoot*, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1994.
- 11.-Chopra, K.A., Brasier, R.A., Das, M., Xin-Jing Xu and Peterson, W.J.: Improved synthesis of *Salmonella typhimurium* enterotoxin using gene fusion expression systems. *Gene*, **144**: 81-85 (1994).
- 12.-Chopra, K. A., Houston, W. C., Peterson, W. J., Prasad, R. and Mekalanos, J.J.: Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. *J. Bacteriol.*, **169**: 5095-5099 (1987).
- 13.-Cover, L.T. and Blaser, J.M.: Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biological Chem.* **267**:10570-10575 (1992).
- 14.-Cox, N. A. y Bailey, J. S.: *Salmonela en la avicultura. El problema y la intervención en la investigación. Memorias del curso de actualización sobre Salmonella enteritidis y Campylobacter en las aves domésticas.* México, D.F. 1991. 1-3. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA).
- 15.-Cuatrecasas, P.: Interaction of *Vibrio cholerae* enterotoxin with cell membranes. *Biochemistry*, **18**: 3547 (1973).

- 16.-Daikoku, T., Kawaguchi, M., Takama, K. and Suzuki, S.: Partial purification and characterization of enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.*, 58: 2414- 2419 (1990).
- 17.-Dallas, S. W., Gill, M. D. and Falkow, S: Cistrons encoding *Escherichia coli* heat labile toxin. *J. Bacteriol.*, 139: 850-858 (1988).
- 18.-Diaz-Barroso, A., Lopez-Vidal, Y., Cervantes, L.E. and Ruiz-Palacios, G.M.: Partial purification and immunological characterization of *Campylobacter* enterotoxin. Abstracts of 95th General Meeting American Society of Microbiology. Washington, D.C. 1995. 182. American Society of Microbiology, Washington, D.C.. (1995).
- 19.-Duhamel, C. R., Talbot, P. and Grady, F. G.: Production, purification, and assay of cholera enterotoxin. *J. Infect. Dis.*, 121: S85- S91 (1970).
- 20.-Eidels, L., Proia, L.R. and Hart, A.: Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.*, 47: 596-620 (1983).
- 21.-Evans, G.D., Evans, J.D.Jr. and Pierce, F.N.: Differences in the response of rabbit small intestine to Heat-Labile and Heat-Stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 7: 873-880 (1973).
- 22.-Evans, J.D.Jr, Evans, G.D. and Gorbach, S.L.: Polymixin B-induced release of low-molecular-wight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 10: 1010-1017 (1974).
- 23.-Ewing, H.W.: Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. *Elsevier Science Publishing Co.* New York, 1986.

- 24.-Fernandez, M., Sierra-Madero, J., de la Vega H., Vazquez, M., Lopez-Vidal, Y., Ruiz-Palacios, M. G. and Calva, E.: Molecular cloning of a *Salmonella typhi* LT- like enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.*, 2: 821-825 (1988).
- 25.-Finkelstein, A. R., Marchlewiks, A. B., Mcdonald, J. R. and Boesman-Finkelstein, M.: Isolation and characterization of a cholera-related enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 17: 239-241 (1983).
- 26.-Fukuta, S., Magnani, L. J., Twiddy, M. E., Holmes, K. R. and Ginsburg, V.: Comparison of carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LTh-I, LT-IIa, LT-IIb. *Infect. Imm.*, 11:445-452 (1988).
- 27.-Gianella, R. A., Formal, S. B., Dammin, G. J. and Collins, H.: Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion and morphologic reactions in rabbit ileum. *J.Clin.Invest.*, 52: 441-453 (1973).
- 28.-Gill, M. D. and Meren, R.: ADP-rybosilation of membrane protein catalyzed by cholera toxin:basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75: 3050-3054 (1978).
- 29.-Gordon, R.F.: Enfermedades de las Aves. *El manual Moderno*, México, D.F., 1980.
- 30.-Green, A. B., Neill, J. R., Ruyechan, T. W., and Holmes, K. R.: Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucariotic target cells is not plasmid mediated. *Infect. Imm.*, 41:383-390 (1983).

- 31.-Guerrant, L. R., Brunton, L. L., Schnaiman, C. T., Rebhun, I. L. and Gilman, G. A.: Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: A rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 10: 320-327 (1974).
- 32.-Guerrant, L. R., Wanke, A. Ch, Pennie, A. R., Barret, J. L., Lima, M. A. A. and O'Brien, D. A.: Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.*, 55: 2526-2530 (1987).
- 33.-Harne, S.D., Sharma, V.D. and Rahman, H.: Purification and antigenicity of *Salmonella newport* enterotoxin. *Indian J. Med. Res.*, 99: 13-17 (1994).
- 34.-Hernández, Y.H.: Campaña Nacional contra la salmonelosis aviar en México. VII Congreso sobre el Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México. 1987. 40-50. *Comisión Permanente para el Control y Erradicación de la Pulorosis y Tifoidea Aviar*. México, D.F. (1987).
- 35.-Holmgren, J.: Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature*, 292: 413-417 (1981).
- 36.-Hunt, D.P. and Hardy, S.J.S.: Heat-Labile enterotoxin can be release from *Escherichia coli* cells by host intestinal factors. *Infec. Immun.*, 59:168-171 (1991).
- 37.-Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A.: Microbiología Médica. 14a ed. *El Manual Moderno*, México, D.F., 1992.
- 38.-Klipstein, A.F. and Engert, R.: Properties of crude *Campylobacter jejuni* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.*, 45: 314-319 (1984).

- 39.- Konkel, E. M., Lobet, Y. and Cieplak, W. Jr.: Examination of multiple isolates of *Campylobacter jejuni* for evidence of cholera toxin-like activity. In: *Campylobacter jejuni*, Current Status and future trends. Edited by Nachamkin, I., Blaser, J. M. and Tomkins, S.L., 193-198, *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1992.
- 40.-Koupal, R. L. and Deibel, H. R.: Assay characterization and localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.*, 11: 14-22 (1975).
- 41.-Kunkel, L.S. and Robertson, C.D.: Purification and characterization of the Heat-Labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. and Immun.*, 25: 586-596 (1979).
- 42.-Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685 (1970).
- 43.-Le Minor, L.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, edited by Kregg, N.R. & Holt, J.G. *Williams & Wilkins, Baltimore*, 2:427-458 (1984).
- 44.-Levine, M.,M., Bergquist, J.E., Nalin, R.D., Waterman, H.D., Hornik, B.R., Young, R.CH. and Sotman, S.: *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but not produce heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*, 1119-1122 (1978).
- 45.-Lopez-Vidal, Angeles, V., Pech, M. D., and Ruiz-Palacios, M. G.: Monoclonal antibodies against *Campylobacter jejuni* enterotoxin. Proceedings of the fifth International Workshop on *Campylobacter* Infections. *Campylobacter V*. Puerto Vallarta, Mexico, 1981, 206-208 Guillermo M. Ruiz-Palacios, Edmundo Calva y Beatriz R. Ruiz-Palacios editors. Mexico, D.F. (1981).

- 46.-Mekalanos, J. J., Collier, J. R. and Roming, R. W.: Enzymatic activity of cholera toxin. II Relationship to proteolytic processing, disulfide bond reduction and subunit composition. *J.Biol. Chem.*, 254: 5855-5861 (1979).
- 47.-Mekalanos, J.J.: Cholera toxin: Genetic Analysis, Regulation, and role in pathogenesis. *Current topics in Microbiol. and Immun.*, 118: 97-118 (1985).
- 48.-Middlebrook, L.J. and Dorland, B.R.: Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. *Microbiol. Rev.*, 48: 199-221 (1984).
- 49.-Mizuno, K., Takama, K. and Suzuki, S.: Characteristics of cytotoxin produced by *Campylobacter jejuni* strains. *Microbios*, 78: 215-228 (1994).
- 50.-Moseley, S.L. and Falkow, S.: Nucleotide sequence homology between the heat-labile enterotoxin gene of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 144: 444-446 (1980).
- 51.-Mosqueda, T. A.: Medidas Sanitarias para prevenir la Tifoidea Aviar. Memorias del VII Curso sobre el control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México. 1987. 22-32. *Comisión permanente para el control y erradicación de la Pullorosis y Tifoidea Aviar.* México, D.F. (1987).
- 52.-Padrón, N. M.: Control y prevención de la tifoidea aviar en las aves reproductoras pesadas. II Jornada Médico Avícola. DPA: Aves Fac. Med. y Zoot.. Universidad Nacional Autónoma de México. José Antonio Quintana López y Carlos López Coello editores. México, D.F., 1991, 126-149 (1991).
- 53.-Padrón, N. M.: Generalidades sobre pulorosis y tifoidea aviar. Memorias del VII Curso sobre Control y Erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, N.L., México, 1987, pp. 13-20. *Comisión Permanente para el control y Erradicación de la Pulatorosis y Tifoidea Aviar.* México, D.F. (1987).

- 54.-Papini, E., Bugnoli, M., De Bernard, M., Figura, N., Rappouli, R. and Montecucco, C.: Bafilomycin A1 inhibits *Helicobacter pylori*-induced vacuolization of HeLa cells. *Mol. Microbiol.*, 7: 323-327 (1993).
- 55.-Perez-Perez, I. G., Taylor, N. D., Echeverría, D. P. and Blaser, J. M.: Lack evidence of enterotoxin involvement in pathogenesis of campylobacter diarrhea. In: *Campylobacter jejuni*. Current Status and future trends. Edited by Nachamkin, I., Blaser, J.M. and Tomkins, S.L.. 184-192 *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1992.
- 56.-Pierce Chemical Company: Hand book for Micro BCA Protein Assay Reagent Kit U.S.A. (1993).
- 57.-Pomeroy, B. S. and Nagaraja, K.V.: Fowl Typhoid. In: Diseases of Poultry. 9th ed. Edited by Calnek, B.W. 72-86. *Iowa State University Press*, Ames, Iowa. 1991.
- 58.-Prasad, R., Chopra, K.A., Peterson, W.J., Pericas, R. and Houston, W.: Biological and immunological characterization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathogen.*, 9: 315-329 (1990).
- 59.-Prasad, R., Chopra, K.A., Parvathi, Ch. and Peterson, W.J.: Expression and characterization of cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin. *Microb. Pathogen.*, 13: 109-121 (1992)
- 60.-Rahman, H., Singh, V.B., Sharma, V.D.: Purification and characterization of enterotoxic moiety present in cell-free culture supernatant of *Salmonella typhimurium*. *Vet. Microbiol.*, 39: 245-254 (1994).

- 61.-Rahman, H., Singh, V. B., Sharma, V.D. and Harne, S.D.: Salmonella cytotoxic and cytolytic factors: their detection in Chinese hamster ovary cells and antigenic relatedness. *Vet. Microbiol.*, 31: 379-387 (1992).
- 62.-Rizo, Q.N.: Como está integrada la avicultura Nacional. Memorias del VII curso sobre el control y erradicación de la Tifoidea Aviar. Monterrey, Nuevo León. México, 1987. 2-12, *Comisión Permanente para el Control y Erradicación de la Pulorosis y Tifoidea Aviar*. México, D.F. (1987).
- 63.-Roy, S.K., Speelman, P., Butler, T., Nath, S., Rahman, H. and Stoll, B.J.: Diarrhoea associated with typhoid fever. *J. Infect. Dis.*, 151: 1138-1143 (1985).
- 64.-Ruiz-Palacios, G. M., Torres, N., Escamilla, E., Ruiz-Palacios, R. B., and Tamayo, J.: Cholera like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni* characterization and clinical significance. *Lancet*, 2 : 250-253 (1983).
- 65.-Ruttler, J. M.: Bacterial toxins as a virulence determinants of veterinary pathogens: an overview. In: *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. Edited by: Roth, A.J.. 213- 227. *Library of Congress Cataloging in Publication Data. American Society of Microbiology*. Ames, Iowa State University. 1988.
- 66.-Sadruddin, F.H.J.: Probing for enterotoxigenicity among the salmonellae: an evaluation of biological assays. *J. Clin Microb.* 14: 463-472 (1981).
- 67.-Salyers, A.A. and Whitt, D.P.: *Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. American Society for Mycrobiology Press. Washington, D.C., 1994.*

- 68.-Sandefur, D. P. and Peterson, W. J.: Neutralization of Salmonella toxin-induced elongation of chinese hamster ovary cells by Cholera antitoxin. *Infect. Immun.*, 15: 988-992 (1977).
- 69.-Schmitt, W. and Haas, R.: Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.*, 12: 307-319 (1994).
- 70.-Shinji, F., Magnani, J.L., Twiddy, E.M., Holmes, R.K. and Ginsburg, V.: Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. LT_h-I, LT-IIa and LT-IIb. *Infect. Immun.*, 52:1748-1753 (1988).
- 71.-Spangler, D.B.: Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.*, 56: 622-647 (1992).
- 72.-Spicer, E. K. and Noble, J.A.: *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: nucleotide sequence of the A subunit gene. *J. Biol. Chem.*, 257: 5716-5721 (1982).
- 73.-Suárez, G.F.: Mecanismos de patogenicidad bacteriana. En: Bacteriología general, principios químicos biológicos. Editado por Pérez, M.J., Suárez, G.F. y Flores, C.R. 363-399. *Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México*. México, D.F. 1990.
- 74.-Suzuki, S., Kaguaguchi, M., Mizuno, K., Takama, K. and Yuki, N.: Immunological properties and ganglioside recognitions by *Campylobacter jejuni*-enterotoxin and cholera toxin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 8: 207-211, 1994.

- 75.-Timmis, K.N., Montenegro, M.A., Bulling, E., Chakraborty, T. and Sanyal, S.: Genetics of toxin synthesis in pathogenic gram-negative enteric bacteria. In: Bacterial Proteins Toxins. J.E. Alont, editors. 12-27. London, (1984).
- 76.-Tsuji, T., Inone, T., Miyama, A., Okamoto, K., Honda, T. and Miwatani, T.: A single aminoacid substitution in the A subunit of *Escherichia coli* enterotoxin results in a loss of its toxic activity. *J. Biol. Chem.*, 256:22520-22525 (1990).
- 77.-Urquiza, B.O.: Paratifoidea aviar. III Jornada Médico, Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1992. 235-239. México, D.F. (1992).
- 78.-Urquiza, B.O.: Causas de diarreas en aves domésticas. VI Jornada Médico Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 245-249. México, D.F. (1993).
- 79.-Verdugo-Rodríguez, A., Balcazar, J., Urquiza, B. O., Suarez, F., Quintana, L. A., Calva, E., Lopez-Vidal, Y.: Partial characterization of a *Salmonella gallinarum* *elt* A-like gene. Bangkok, Thailand. 1994. 65th°. Second Asia-Pacific Symposium on Typhoid Fever and other Salmonellosis. Bangkok, Thailand, 1994.
- 80.-Walker, I. R., Cadwel, M. B., Lee, C. E., Guerry, P., Trust, J. T. and Ruiz-Palacios, M. G.: Pathophysiology of *Campylobacter enteritis*, *Microbiol. Rev.*, 50: 81-94 (1986)
- 81.-Whiteman, E.C. and Bickford, A.A.: Manual de Enfermedades de las Aves. 2a ed. Asociación Americana de Patólogos Aviares, Kennett Square, Pennsylvania, (1983).

Cuadro 1.- Cuantificación de proteínas y valores de absorbancia (D.O. 660 nm) de la cinética de crecimiento de *S.gallinarum* FVA-1

Tiempo (horas)	Crecimiento Bacteriano (D.O. 660 nm)	PSNC mg/ml	PP mg/ml
0.5	0.354	2.52	< 0.010
1.0	0.482	2.16	0.012
1.5	0.77	< 0.010	< 0.010
2.0	1.104	2.67	2.48
2.5	1.141	< 0.010	1.076
3.0	1.203	1.83	1.36
3.5	1.21	1.2	0.868
4.0	1.243	2.14	1.4
4.5	1.185	2.34	0.236
5.0	1.224	2.2	0.332
6	1.254	2.28	0.618
8.0	1.382	2.6	0.243
10	1.385	1.42	0.391
12	1.242	1.81	0.81
14	1.26	2.38	0.755
16	1.505	2.36	0.38
18	1.521	1.75	0.375
20	1.586	1.97	0.565
22	1.58	2.18	0.523
24	1.03	0.052	0.0745

D.O.- Densidad Óptica.

PSNC.-Proteínas del Sobrenadante del Cultivo de *S. gallinarum* FVA-1.

PP.-Proteínas Periplasmáticas del Cultivo de *S. gallinarum* FVA-1.

Cuadro 2.- Cinética de crecimiento bacteriano en valores de absorbancia (D.O. 660 nm) de las cepas utilizadas como controles y concentración de las proteínas del sobrenadante del cultivo (PSNC) y proteínas periplasmáticas (PP).

	<i>E. coli</i> HS*		<i>ETEC</i> *		<i>V. cholerae</i>		
Tiempo (Horas)	D.O. 660 nm	mg/ml de PP	D.O. 660 nm	mg/ml de PP	D.O. 660 nm	mg/ml de PSNC	mg/ml de PP
2	0.698	0.787	0.445	0.40	0.254	< 0.020	0.35
4	0.804	0.979	0.644	0.763	0.440	< 0.020	0.810
6	0.948	0.332	0.741	0.952	0.549	0.033	1.84
8	1.097	0.947	0.893	1.79	0.568	0.245	2.94
10	0.992	0.621	0.869	0.717	0.609	0.36	3.38
12	1.037	< 0.020	0.814	0.804	0.636	< 0.020	0.730
14	0.603	< 0.020	0.929	1.066	0.630	< 0.020	1.8
16	1.103	< 0.020	1.029	0.596	0.559	< 0.020	8.5
18	1.021	0.620	1.027	2.021	0.363	< 0.020	< 0.020
20	1.065	0.907	0.981	2.345	0.884	< 0.020	3.04
22	1.073	1.579	0.918	3.40	0.941	< 0.020	2.39
24	1.034	1.770	1.062	3.904	0.879	1.990	8.87

D.O. - Densidad Óptica

*Las PSNC.(mg/ml) de *E. coli* HS y *ETEC* fueron < 0.020

Cuadro 3.- Efecto de las proteínas de los sobrenadantes y de las proteínas periplasmáticas de las diferentes cepas bacterianas en células CHO.

Control positivo		Control Negativo		
<i>V.cholerae</i>		<i>ETEC</i>	<i>E. coli</i> HS	<i>S. gallinarum</i> FVA-1
Respuesta post-exposición	Elongación ----- > 50%*	Elongación ----- > 50%*	Elongación ----- < 50 %*	Elongación ----- > 50%*
Tiempo en que se observó el efecto.	24 horas	24 horas	72 horas	48 horas

*Elongación mayor al 50 % se considera positiva, elongación menor al 50 % se considera negativa (1)

Cuadro 4.- Cantidad necesaria de proteínas del sobrenadante del cultivo y de proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum* FVA-1 para producir una Unidad de Actividad Biológica en células CHO.

Tiempo (horas)	Crecimiento D.O.	PSNC (μg)	PP (μg)
0.5	0.354	18.9	SAB
2.0	1.104	12.5 \pm 10.62	37.2
4.0	1.243	8.025 \pm 11.3	78.2 \pm 3.71
8.0	1.382	14.37 \pm 6.61	0.9 \pm 1.27
12.0	1.242	14.59 \pm 18.25	0.75 \pm 1.06
18.0	1.521	8.23 \pm 6.9	1.4 \pm 1.97
24.0	1.03	1.08 \pm 0.66	0.81 \pm 0.060

D.O.- Densidad Óptica a 660 nm
 PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo
 PP.- Proteínas Periplasmáticas
 SAB.- Sin Actividad Biológica

Cuadro 5.- Relación entre la cinética de crecimiento (D.O. 660 nm) y actividad específica de las proteínas del sobrenadante del cultivo de *S.gallinarum* FVA-1.

TIEMPO (HORAS)	CRECIMIENTO D.O.	ACTIVIDAD ESPECIFICA EN (UNIDADES/ mg DE PROTEINA)
0.5	0.354	52.9
2	1.104	24.69 ± 106
4	1.243	31.15 ± 44.05
8	1.382	77.74 ± 35.71
12	1.242	313.668 ± 39.38
18	1.525	187.8 ± 157.82
24	1.030	1128 ± 688

D.O. :- Densidad Óptica

Cuadro 6.- Relación entre la cinética de crecimiento en absorbancia (D.O. 660 nm) y la actividad específica de las proteínas periplasmáticas de *S.gallinarum* FVA-1.

TIEMPO (HORAS)	CRECIMIENTO D.O.	ACTIVIDAD ESPECIFICA EN UNIDADES/mg DE PROTEINA
0.5	0.354	26.88
2	1.104	95.23
4	1.243	95 ± 134.3
8	1.382	416.625 ± 196.39
12	1.242	331.125 ± 468.28
18	1.525	178.57 ± 252.5
24	1.030	1685 ± 1243.3

D.O. :- Densidad Óptica

Cuadro 7.- Pesos Moleculares aproximados obtenidos mediante *Immunoblot* de las proteínas de los sobrenadantes y las proteínas periplasmáticas de las cepas de *V. cholerae*, *ETEC*, *E. coli* HS y *Salmonella gallinarum* FVA-1.

	<i>V. cholerae</i>	<i>ETEC</i>	<i>E. coli</i> HS	<i>S. gallinarum</i> FVA-1			
Anticuerpo	PSNC	PSNC	PP	PSNC	PP	PSNC	PP
α CT-A	66	60	60	60	60	66	66
			89	80			
			97				

PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo

PP.- Proteínas Periplasmáticas

Cuadro 8.- Actividad específica de las proteínas de los sobrenadantes de los cultivos y de las proteínas periplasmáticas de *S. gallinarum* FVA-1 y de los controles, a partir de cultivos de 24 horas.

Cepas	PSNC	PP
<i>E. coli</i> HS	0	0
ETEC	0	68.35
<i>V. cholerae</i>	4166	934
<i>S. gallinarum</i> FVA-1	1128 ± 688	1685 ± 1243.3

PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo

PP.- Proteínas Periplasmáticas

Figura 1.-Diagrama de flujo para la extracción y purificación de la enterotoxina de *Salmonella gallinarum* FVA-1.

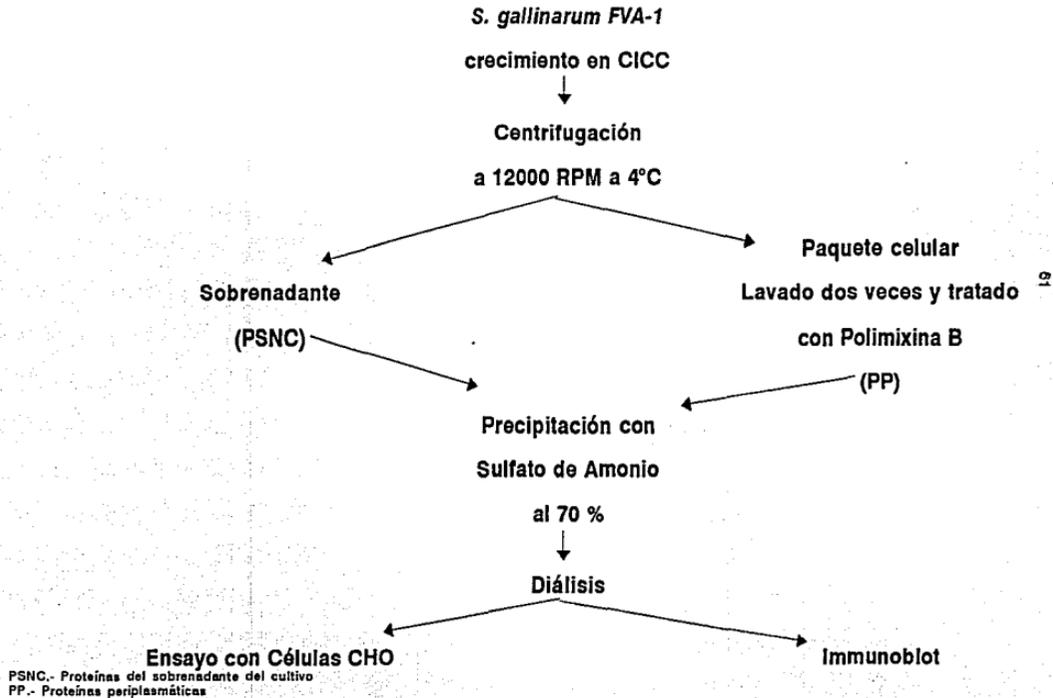


Figura 2.- Diagrama de flujo para la elaboración de *Immunoblot*.

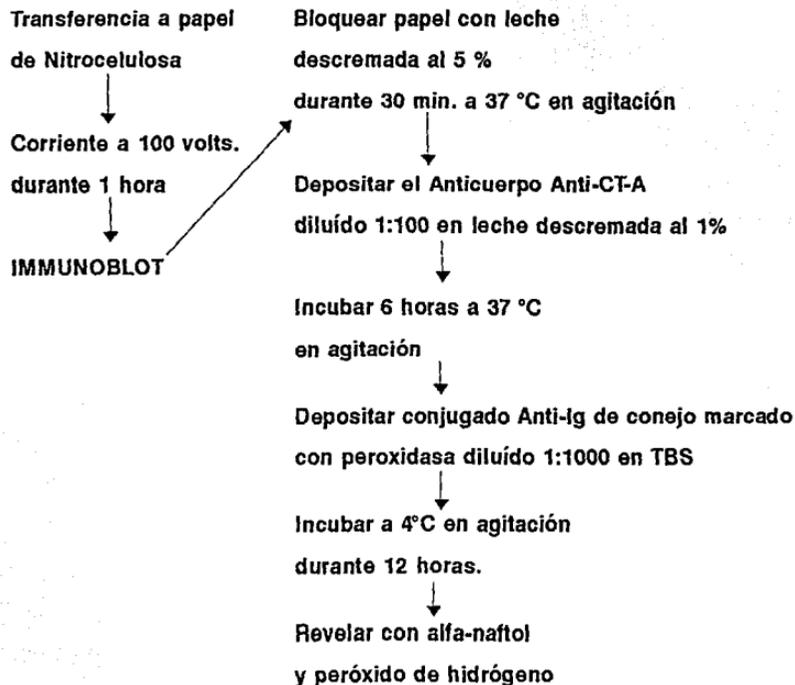
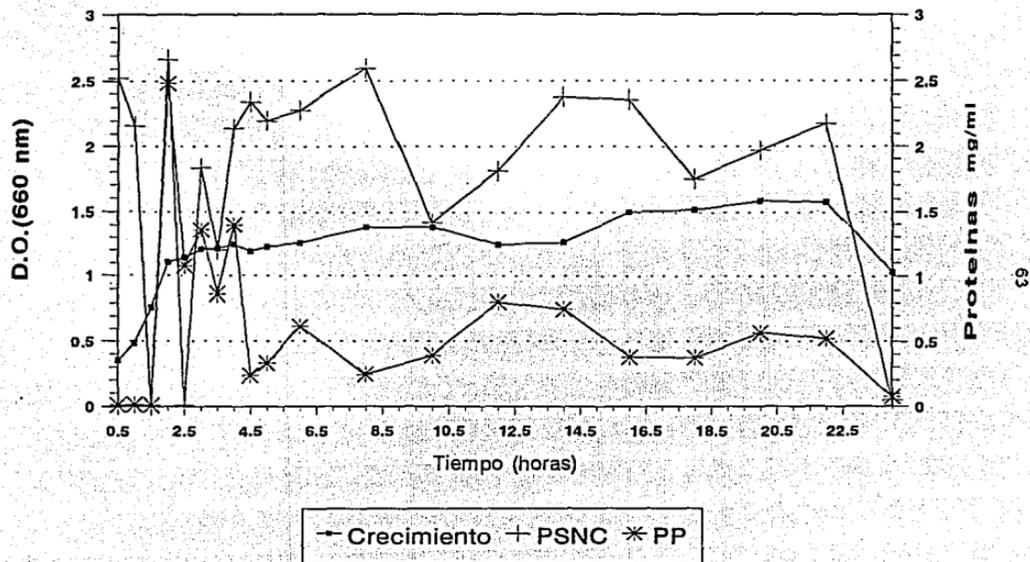
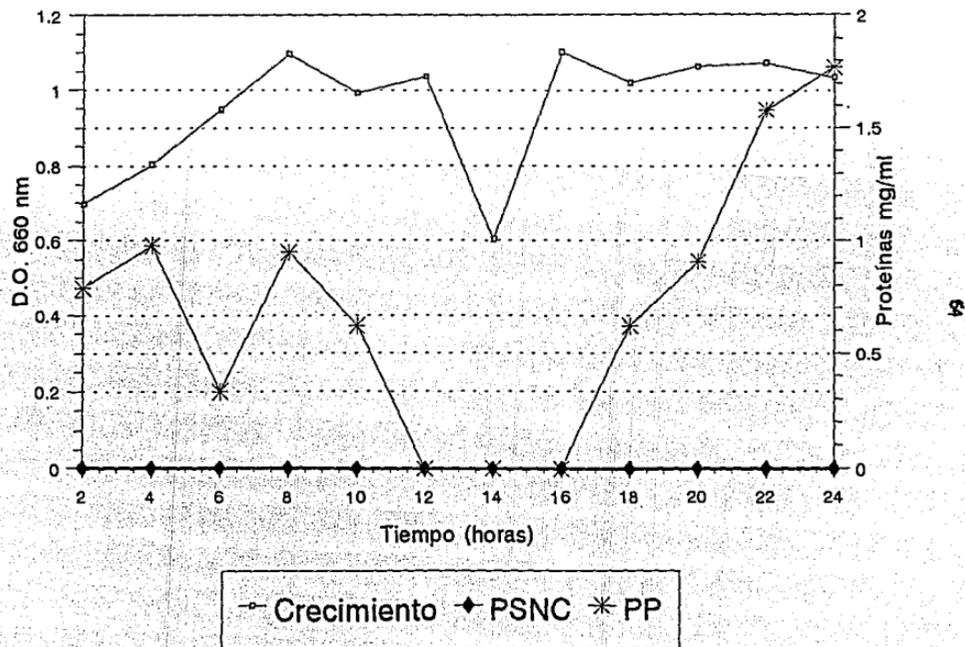


Figura 3.- Concentración de proteínas de *Salmonella gallinarum* FVA-1 en relación a su cinética de crecimiento (D.O).



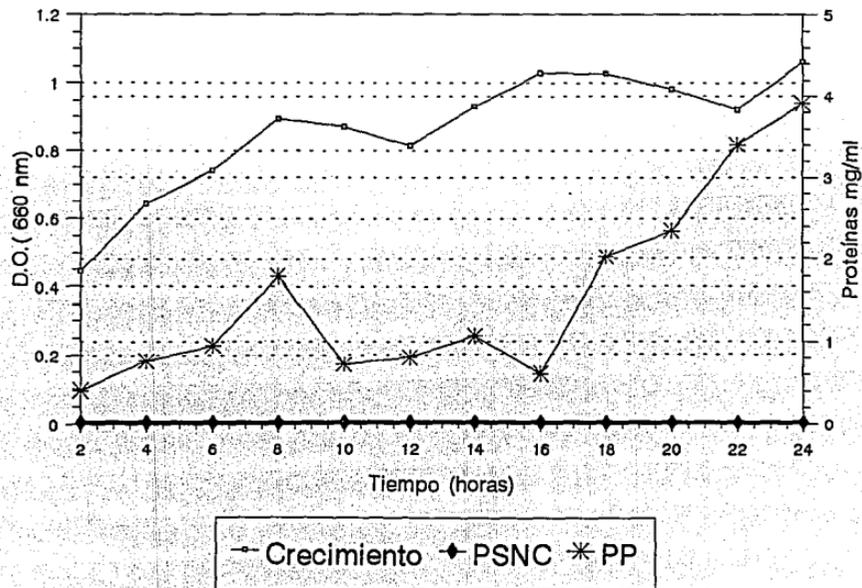
PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo
 PP.- Proteínas Periplasmáticas
 D.O.- Densidad Óptica

Figura 4.- Concentración de Proteínas de *Escherichia coli* HS en relación a su cinética de crecimiento (D.O.).



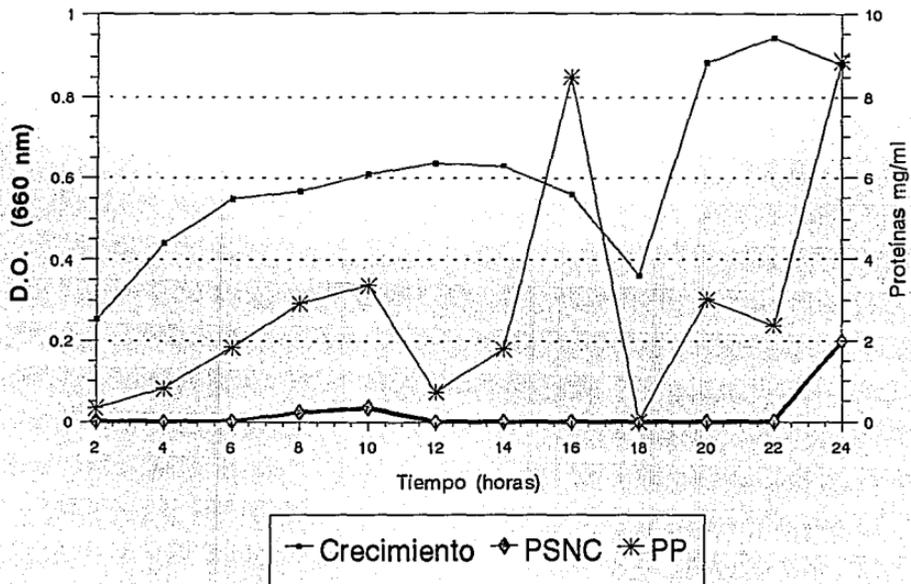
PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del cultivo
 PP.- Proteínas Periplasmáticas
 D.O.- Densidad Óptica

Figura 5.- Concentración de proteínas de *ETEC* en relación a su cinética de crecimiento (D.O.).



PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo
 PP.- Proteínas Periplasmáticas
 D.O.- Densidad Óptica

Figura 6.- Concentración de proteínas de *Vibrio cholerae* en relación a su cinética de crecimiento (D.O.).

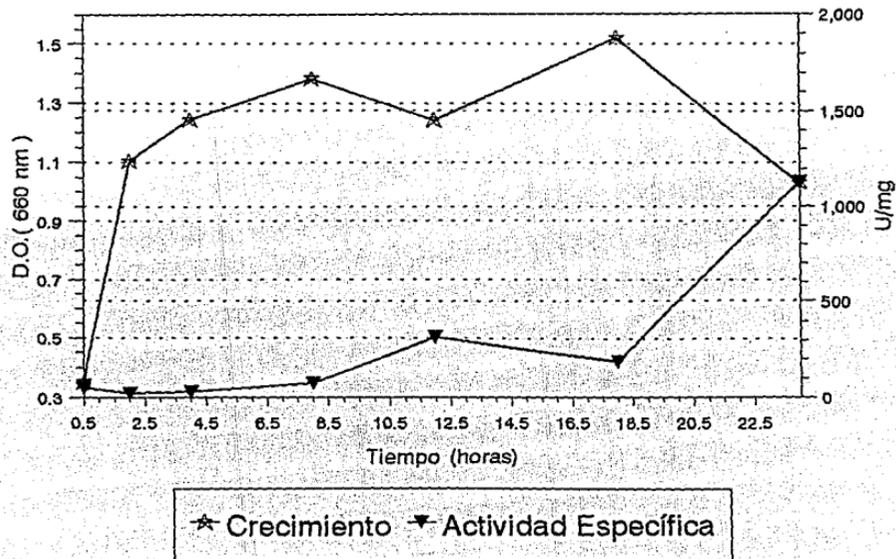


PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo

PP.- Proteínas Periplasmáticas

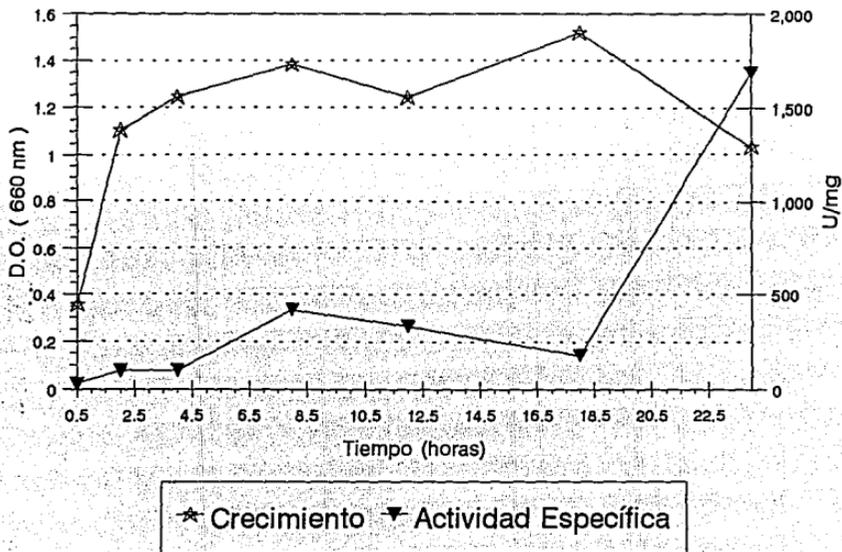
D.O.- Densidad Óptica

Figura 7.- Cinética de crecimiento y actividad específica en células CHO de las proteínas del sobrenadante del cultivo de *Salmonella gallinarum* FVA-1.



D.O.- Densidad Óptica

Figura 8.- Cinética de crecimiento y actividad específica en células CHO de las proteínas periplasmáticas de *Salmonella gallinarum* FVA-1.



D.O.: Densidad Óptica

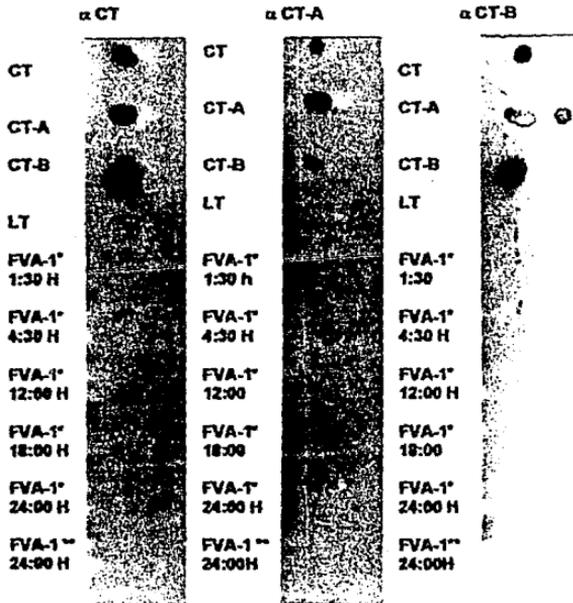


Figura Núm. 9.- Ensayo de *Immunodot* con las PSNC* y con las PP** de *Salmonella gallinarum* FVA-1 empleando anticuerpos anti CT, anti CT-A y anti CT-B producidos en conejo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

* PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo

** PP.- Proteínas Periplasmáticas

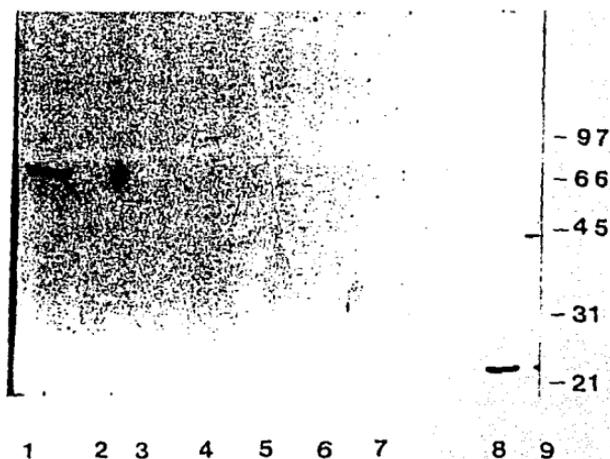
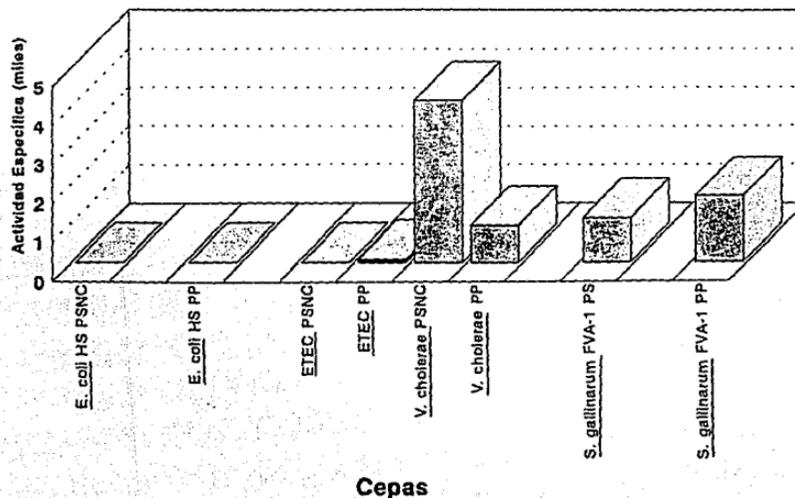
α CT - A

Figura 10.- *Immunoblot* utilizando anticuerpos de conejo anti CT-A. En el carril número 1, se muestran las Proteínas Periplasmáticas de *Salmonella gallinarum* FVA-1, en los carriles números 8 y 9 se muestra CT-A comercial de *Vibrio cholerae*.

Figura 11.- Actividad específica en células CHO de las PSNC y de las PP de *Salmonella gallinarum* FVA-1 y de las cepas control a partir de los cultivos de 24 horas.



PSNC, PS.- Proteínas de los Sobrenadantes del Cultivo
 PP.- Proteínas Periplasmáticas

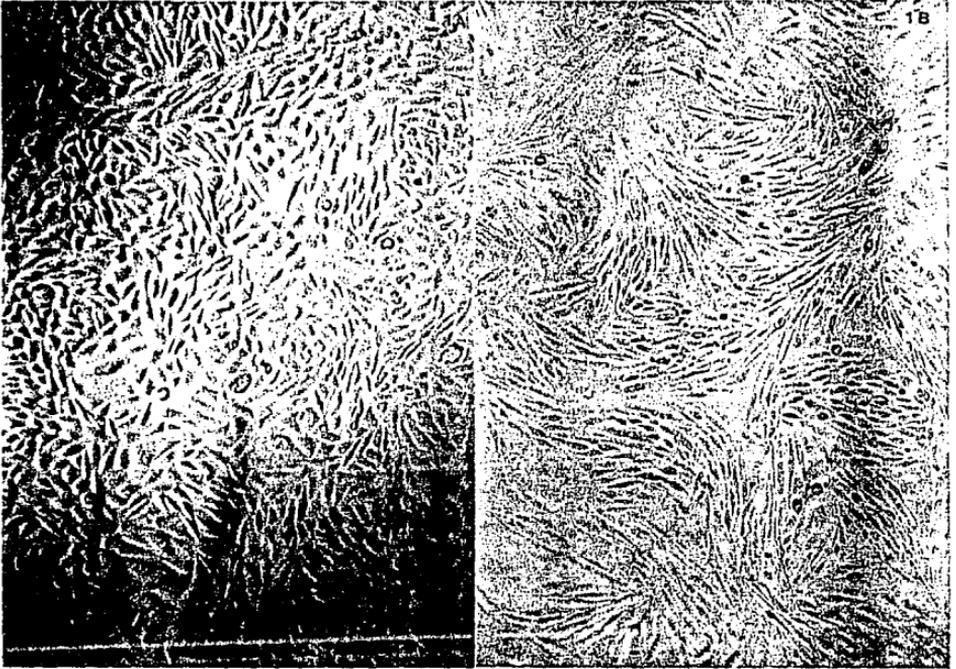


Figura 12.- Efecto de las proteínas de los controles sobre células CHO. 1A, muestra el control negativo con las PP¹ *Escherichia coli* HS. 1B, muestra el control positivo con las PSNC² de *Vibrio cholerae*.

¹ PP.- Proteínas Penplasmáticas

² PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo

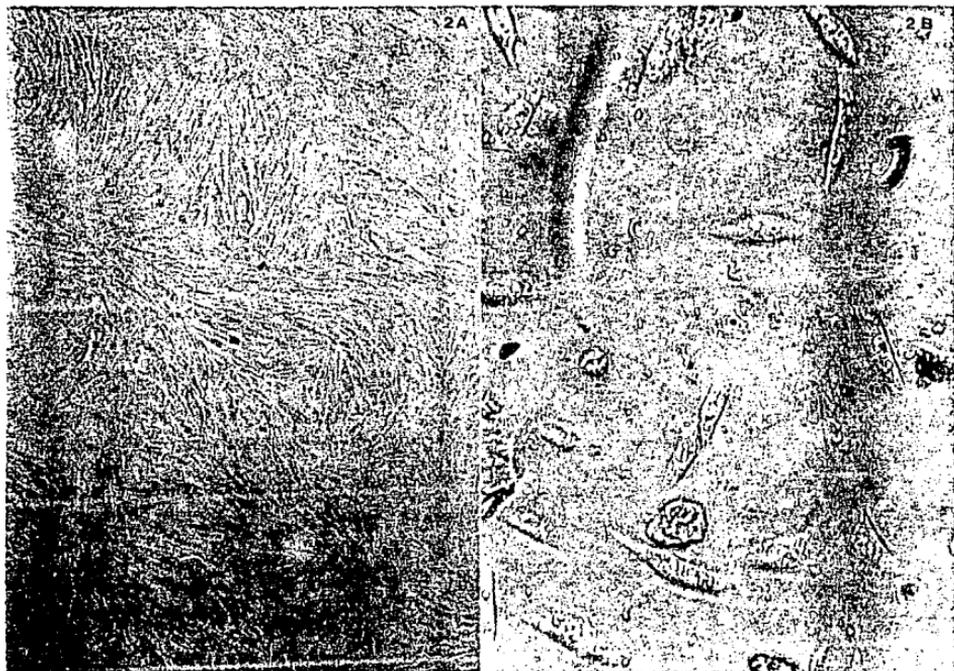


Figura 13.- Efecto de las PSNC¹ y PP² de *S. gallinarum* FVA-1 sobre células CHO. 2A. muestra el efecto de las proteínas diluidas. 2B. muestra de dichas proteínas sin diluir.

¹ PSNC.- Proteínas del Sobrenadante del Cultivo.

² PP.- Proteínas Penplasmáticas.



Huellas

Una noche un hombre soñó
que se paseaba por la playa
con nuestro señor

En el cielo aparecieron escenas de su vida
con dos series de huellas en la arena,
una de él y otra del señor.

Al aparecer la última escena
delante de él, tornó su mirada
hacia atrás y notó que muchas veces
en el camino de su vida
sólo había una serie de huellas
en sus momentos más tristes y deprimidos.

Esto le desconcertaba y preguntó; Señor,
Tú me dijiste que una vez que decidiera seguirte
caminarías siempre a mi lado ; pero he notado
que en los momentos más difíciles de mi vida
sólo hay una serie de huellas.
No comprendo por que cuando más
te necesitaba, Tú me dejabas sólo.

El señor le contestó:
"Hijo mío, te amo y nunca te he abandonado
en tus momentos de prueba y sufrimiento,
cuando tú sólo ves una serie de huellas;
era entonces que yo te llevaba en mis brazos".