



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRUDUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACION DE LA FIMBRIA LPF (LONG POLAR FIMBIRAE) EN LA ADHESION DE SALMONELLA ENTERTIDIS DE ORIGEN AVIAR

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JIMENA BALLI GARCIA

TUTOR:
DRA. YOLANDA LOPEZ VIDAL

COMITÉ TUTORAL:
DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ
DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO

MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto fue financiado por el proyecto de investigación IN222907-3 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT/UNAM).

Mi unicornio azul ayer se me perdió
No sé si se me fue, no sé si se extravió.....
Si lo ven.. me lo cuidan!
Silvio Rodríguez

Todo el mundo trata de realizar algo grande, sin darse cuenta de que la vida se compone
de cosas pequeñas.
Frank Clark

La vida es muy peligrosa. No por las personas que hacen el mal, sino por las que se
sientan a ver lo que pasa.
Albert Einstein

Todo el conocimiento, la totalidad de preguntas y respuestas se encuentran en el perro.
Franz Kafka

Todos los animales son iguales, pero algunos son más iguales que otros.
George Orwell

You only live once, but if you do it right, once is enough.
Mae West

Some people hear voices.. Some see invisible people.. Others have no imagination
whatsoever.
S.So.

We never really grow up, we only learn how to act in public.
S.So.

Dedicatorias

A mi papá, por ser un gran ejemplo a seguir

A mis hermanos, Helena por su apoyo eterno y Federico por enseñarme a no detenerme nunca.

A mi compañero, amigo, confidente, a veces juglar, vigilante de los barcos de papel... Alejandro Xocopa, por creer y confiar tanto en mí. No olvides... tienes toda mi admiración, siempre adelante!

A mis amigos que de una u otra forma siempre han estado a mi lado y no me han dejado caer.

A mis compañeros mas leales y desinteresados que siempre han estado a mi lado, mis felponios de cuerpo peludo (Kali y Kusa)

En memoria a Soré y Pincel

Agradecimientos

A mi papá por apoyarme en los momentos difíciles, por nunca dejar de creer en mi, por confiar en mis decisiones y apoyarme en la búsqueda de mi propio camino, por el apoyo incondicional y a veces complicado. Eres un ejemplo a seguir, gracias por ayudarme a salir adelante. Este sólo es uno mas de muchos.... Y va por ti.

A Mari Carmen por todos los momentos felices de los que me has hecho parte, por confiar en mi.

A la familia Ballí por estar conmigo, por alentarme a seguir siempre adelante y sobre todo por preocuparse por mi, por las reuniones que han pasado y las que vienen.

A la familia Mora García por estar a mi lado y por todo el apoyo que me dieron, por las cenas y pasteles que compartimos (Dr. Mora, gracias por la confianza y el eterno apoyo).

A Helena Ballí por estar a mi lado siempre que he requerido ayuda, por apoyarme y confiar en mi, por preocuparse por alentarme a seguir y salir adelante, por que pese a todas las malas jugadas que nos ha hecho la vida, aquí seguimos, por que pese a todas las adversidades seguimos en pie, gracias por tomar tiempo a mi lado cuando he querido sentarme debido al cansancio de esta larga caminata, gracias por querer escuchar siempre que he tenido algo que decir, por los recuerdos, por los cafés, por defenderme ante el mundo, por pararte frente a mi, para que nadie me toque, eres un ejemplo de lealtad y cariño, ahora sigues tu, espero que esto sea un buen ejemplo para ti, de que a pesar de todo, por mas miserable que se vea el panorama, por mas desierto que parezca o lejano que se vea, aún en la oscuridad, siempre hay por donde salir, siempre hay para donde ir, nunca olvides eso, el mejor camino es aquel que nadie ha descubierto, los mejores descubrimientos son esos, en los que cambiaron el camino hacia algo desconocido, el chiste es no temer.

A Federico, por que me enseñaste a defender lo que creo, a decidir que quiero y a luchar por ello, sin importar que digan los demás, me enseñaste a saber elegir mis batallas y a hacerme a un lado cuando no son para mi. Me enseñaste lo que pasa cuando uno deserta por miedo o pena, me enseñaste lo duro que es y que si uno quiere algo, no importa lo que implique, siempre hay que buscarlo.

A mis GRANDES apoyos y compañeras de cuatro patas y cuerpo peludo (Kali, Kusa) por todas las noches de desvelo que pasamos juntas, por los enojos que tuvieron que aguantar, por los días de paseo en CU, las colitas peludas y sobre todo... por patosear.

A mi comité tutorial, por todas las críticas que ayudaron a mejorar este trabajo, por impulsarme a ser mejor y nunca detenerme. Por el apoyo recibido a lo largo de la realización de este proyecto.

A Antonio Verdugo, por que en todas las formas me has hecho mejor persona, por darme un espacio en el laboratorio, por estar presionando con el proyecto. Hoy soy mejor profesionalista por todo eso.

A Daniel Martínez, que aun que oficialmente no fuiste parte de mi comité tutorial, gran parte del logro de este trabajo es gracias a ti, por ser parte autor intelectual de este trabajo. Amigo y asesor, gracias por creer en que lograríamos esto. Por que más allá de todo, sé que siempre puedo contar contigo.

A mi jurado, por sus atinadas y prontas correcciones y el interés en hacer este trabajo mejor.

A Francisco Basurto por escucharme en los momentos de frustración, gracias por ayudarme y apoyarme cuando lo he necesitado.

Al ingeniero José Luis Pablos por todo el apoyo (emocional, profesional, espiritual) a lo largo del desarrollo de este trabajo, por la ayuda con los análisis estadísticos y por su preocupación por el éxito y conclusión de este trabajo.

A todos mis amigos del departamento de Microbiología e Inmunología, Daniel Atilano (por apoyarme y escucharme, por confiar en que las cosas saldrían), Rosalba, Lupita, Dra. Cristina R. A todos por compartir esos muy buenos momentos. A Raúl y Fabiola, por enseñarme que a pesar de todo, me encanta la microbiología, por apoyarme siempre y sobre todo, gracias por todo lo que me han enseñado en el ámbito profesional como personal. Gracias por estar siempre a mi lado, mis queridos amigos.

A todos mis amigos del LMM que siempre estuvieron a mi lado, Edith, Mauricio A, Emilio, Julio, Luis Quijano, Gaby, Ilane (por escucharme, apoyarme y no permitir que nunca me rindiera), Adolfo (por la porra de seminarios), Karla, Zulema, Diana, Marcela (por cuidarme tanto), Juan (aún que estuviste poco tiempo en nuestro lab, sabes que te considero un muy buen amigo) y sobre todo Alfredo que pese a los prejuicios iniciales, logramos superarlos, gracias por toda la confianza que me has tenido y por todo el apoyo que me has dado, sabes que siempre cuentas conmigo. A Mauricio C. por el apoyo en la realización de este trabajo, por materiales y reactivos que me prestaste y por preocuparte en que mi proyecto saliera en tiempo y forma, MCGPLPYV.

Al Señor Román por el apoyo durante los ensayos de invasión en embriones de pollo. A Raymundo Iturbe por todo el apoyo y preocupación por la realización de este proyecto.

A mis amigos Juan José (Chaquillo) por ser parte de la familia, que aunque lejos sabes que te llevo siempre en el corazón, gracias por todo tu apoyo, por toda tu preocupación, cariño y cuidado, gracias por compartir todos estos años y logros... y los que aún nos faltan! Carlos Macías por apoyarme en todo lo que he necesitado, por nunca dejar de creer y confiar en mi, amigo, esta es sólo una más de muchas. Laura (Aluche), mi guía espiritual, gracias por cuidarme, por preocuparte por mi, por orientarme y ayudarme siempre, por ser parte de la familia, gracias por todo lo que hemos compartido y vivido todos estos años y todos los años que nos faltan, parte de este logro es para y por ti, mi siempre guía que nunca me abandona y a la que nunca abandonaré, mi alma gemela que sabemos tenemos mucho mas que sólo eso. A Mao por su apoyo eterno y su preocupación, Ivonne (Yorkie) por ser como mi hermana, amiga te quiero mucho, gracias por compartir tantas cosas conmigo, Edgar Mena por escribir acerca de los campos, los cuervos y espantapájaros, por estar ahí si un día el embotellamiento me atrapa y no puedo salir, por hacer que llueva en las cosechas, por los textos que hemos escrito y por lo que aún no tienen tinta, Karla por que pese a la distancia y tiempo, sé que sigo contando contigo. María Cristina (Bruja) por ser amiga, compañera y apoyo, por ser

parte de mi familia (sabes a lo que me refiero), siempre cuentas conmigo, siempre estoy ahí contigo.

A Jorge Akle y David Akle por todo el apoyo y sobre todo por la comprensión en las últimas etapas de este proyecto, por toda la tolerancia, apoyo y ayuda que me han dado para continuar adelante. Al Doctor Carmona por todo el apoyo y confianza.

Y como dicen que lo mejor siempre viene al último, a Alejandro Xocopa, por llegar en el momento justo, por estar siempre a mi lado, por todo el apoyo, que pese a la distancia marcada y a las posibles negativas, nunca te diste por vencido, nunca me dejaste sola, gracias por siempre confiar y creer en mí, gracias por agarrar mi mano aún cuando estuve ausente, gracias por no soltarla jamás, por ser un motor y un motivo. Mi guardián de barcos de papel, hilo de cometas que hablan con las nubes, marca de crayolas que pintan en las ventas de cada casa. Eres un gran ejemplo a seguir... Gracias por las noches de chocos en bancos de metal, por los panes y elotes, por los dardos de luz que brillan en la noche y por la media gota de agua que sabemos lo que es. Esto también es por ti y para ti. TABDMC, X-CH.

You can do anything, but not everything.
David Allen

CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades	3
1.2 Características microscópicas, morfología y fisiología	4
1.3 Especies del género <i>Salmonella</i>	5
1.4 Epidemiología	5
1.5 Factores de virulencia	9
1.6 Estructura molecular de la fimbria Pap y fimbrias tipo 1	16
1.7 Secuencia del Operón Long Polar Fimbriae (LPF)	20
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL	25
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Esquema general de estrategia de mutación	26
6.2 Cepas	26
6.3 Cinéticas de crecimiento bacteriano	27
6.4 Extracción de ADN	28
6.5 Iniciadores	28
6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	30
6.7 Extracción y electroporación del plásmido pKD46	31
6.8 Electroporación del producto de amplificación de los iniciadores <i>lpfA-kan</i>	35

6.9 Inoculación en embrión de pollo	36
7. RESULTADOS	37
7.1 Identificación de las cepas y cinéticas de crecimiento bacteriano	37
7.2 Extracción de ADN	40
7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
7.4 Extracción y electroporación del plásmido pKD46	42
7.5 Electroporación de la construcción <i>lpfA</i>-km en <i>S. enteritidis</i> pKD46 y cultivo para eliminar el plásmido	43
7.6 Secuencia de la cepa mutante	45
7.7 Ensayos de patogenicidad en embrión de pollo	45
8. DISCUSIÓN	50
9. CONCLUSIONES	54
10. REFERENCIAS	55

RESUMEN

El género *Salmonella* sp. es considerado actualmente como el agente causal más común de las gastroenteritis.

La colonización e internación de *Salmonella* en el tracto gastrointestinal es considerado como el primer paso para el establecimiento de la enfermedad. Evidencia reciente sugiere que las adhesinas fimbriales de *Salmonella* desempeñan un papel importante en la adhesión e invasión de la mucosa gastrintestinal, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Mutaciones dirigidas en el genoma de *Salmonella* sp. han permitido identificar factores de colonización intestinal específicos para su hospedero, entre los que destacan las fimbrias. En *S. typhimurium* se han descrito 13 operones fimbriales, 11 en el genoma y uno en el plásmido de virulencia, los cuales se ensamblan mediante el sistema-chaperón acomodador y uno ubicado también en el genoma pero cuyo sistema de ensamblaje es el de nucleación precipitación.

En el genoma de *S. enteritidis* recientemente descrito, además de poseer los mismos 12 operones fimbriales, presenta un operón mas (*peg*), el cual también se ensambla mediante el sistema chaperón-acomodador. Este operón presenta entre un 60% a un 70% de homología con el operón *stc* de *S. typhimurium* y al ser mutado causa una disminución significativa en la virulencia en gallinas. *S. gallinarum* y *S. pullorum* también presentan la fimbria *peg*, lo cual podría indicar que esta fimbria es necesaria para la colonización en aves. En el caso de la fimbria Lpf, se sabe que participa en la adhesión a Placas de Peyer y su mutación disminuye la virulencia en un 20% en ratones, por lo que esta fimbria resulta importante para la patogenicidad de *Salmonella* sp., sin embargo, existen relativamente pocos estudios donde se muestre el rol de las fimbrias en la colonización en aves de producción.

En este experimento en los ensayos en embrión de pollo, no se observa diferencia entre la cepa de campo de *S. enteritidis* y la cepa de *S. enteritidis*Δ. Sin embargo, sería necesaria una evaluación mas extensa ya que el efecto en la persistencia a largo plazo de la bacteria no pudo ser evaluada, por lo que no se puede asumir que no existe diferencia alguna entre estas dos cepas.

La fabricación de la mutante se logró mediante recombinación homóloga, usando productos de PCR, se utilizó el plásmido pKD46, el cual utiliza el sistema del fago λ Rojo (γ , θ y *exo*) y permite la recombinación de DNA lineal en el genoma de la bacteria evitando la degradación de este. Estudios previos en *S. typhimurium* han demostrado que este plásmido es eficiente en la fabricación de mutantes.

SUMMARY

Salmonella remains the most common causal agent in human gastroenteritis.

Colonizations and penetration of the intestinal mucosa is commonly accepted as a first step in the establishment of infection. Recent evidence suggests that fimbrial adhesins of *Salmonella* play an important role during bacterial attachment to and invasion of the intestinal mucosa *in vivo* and *in vitro*.

Directed mutations in the *Salmonella* genome has aluded the identification of host-specific intestine colonization factors. Among the factors that influence intestinal colonizations are fimbriae. *S. typhimurium* has 12 fimbrial operones that assembly via chaperone-usher, 11 of this operones are located at the genome (*stc, bcf, fim, lpf, saf, stb, std, stf, sth, sti, stj*), and one is encoded by the plasmid (*pef*), it also has one operon form the nucleator-dependient assembly pathway (*csg*).

The recent sequence of *S. enteritidis* genome shows that it also possesses the same 12 fimbrial operones, fimbrial operon *peg* has been identified as unique and it also assemblies via chaperon-usher pathway, it has been shown that when is mutated there is a significative difference in chicken virulence, *peg* fimbriae is also present in *S. gallinarum* y *S. pullorum* indicating that it might be necessary for avian colonization. Lpf fimbriae is involved in Peyer Patches adhesion, where by mutating it, *Salmonella* virulence decreases in mice 20%, this fimbriae is considered to be important in the pathogenicity of *Salmonella*. Although, there are few studies which is shown the roll in fimbrial mediated colonization in poultly.

In this experiment is shown that there are not any differences between the wild strain of *S. enteritidis* and *S. enteritidis* Δ in chicken embryo infections. Eventhoug, longer experiments will be required since long term persistence of bacteria was not evaluated, and it cannot be preclude the possibility that there is no difference between the two strains.

The plasmid pKD46, which uses λ Red system ($\gamma, \theta, \psi, \text{exo}$) was used in this experiment, the mutant was accomplished by using PCR products, since the plasmid allows recombination of lineal DNA and avoids degradations.

Previous studies had shown that this plasmid is highly efficient in the fabrications of mutants.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Las bacterias del género *Salmonella* sp. pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son el agente causal de aproximadamente mil trescientos millones de muertes anuales en el mundo debido a complicaciones gastroentéricas [1].

El género *Salmonella* fue descrito por primera vez en 1880 por Eberth y aislada en 1884 por Gaffky. Inicialmente la diferenciación de las cepas se realizaba mediante reacciones en suero y por muchos años, a cada nuevo serotipo se le designaba como una nueva especie. En la actualidad, el género *Salmonella* sp. consta únicamente de dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, sin embargo, por costumbre, se sigue escribiendo *S. typhimurium* en vez de *S. enterica* serovariedad Typhimurium [2-5].

Anteriormente *S. typhimurium* era el agente causal más común de la gastroenteritis en humanos, sin embargo, desde 1950 comenzaron a cobrar importancia las infecciones por salmonellas de serovariedades diferentes a Typhimurium (NTS por sus siglas en inglés *Nontyphoidal Salmonella*) [6] y para 1990 esta serovariedad había sido desplazada por *S. enteritidis*, convirtiéndose este en el principal agente causal de la salmonelosis a nivel mundial [4, 7-9]

Se ha planteado que desde 1980 *S. enteritidis* emergió como el serotipo de mayor importancia en la salud humana a nivel mundial. En Inglaterra, desde 1969-1970 hubo un aumento en los casos de salmonelosis humana, de 151 casos por año aumentó hasta 913 casos por año, los cuales se correlacionaron con salmonelosis en pavos. Más tarde se observó un aumento en la incidencia de 6,858 casos a 15,427 casos por cada 100,000 habitantes, representando este un aumento del 81% [9-11].

En Estados Unidos, durante 1980 *S. enteritidis* emergió como una causa importante de enfermedad en humanos. En 1976 la incidencia de casos por *S. enteritidis* era de 0.55 por cada 100,000 habitantes, lo cual representaba únicamente el 5% del total de su población. De 1988 a 1996 el porcentaje de casos por *S. enteritidis* a nivel mundial aumentó de un 47% a un 55%, aumentando de igual manera las infecciones por *Salmonella* sp. hasta un 24.3% [6, 10].

El incremento de NTS fue similar en la avicultura , vinculándose de esta forma a la salud pública [9, 12, 13]. Estudios epidemiológicos demostraron que existía una asociación entre el aumento en la gente enferma y el consumo de huevo, esto debido a que *S. enteritidis* es el único patógeno de humanos que puede contaminar el huevo de forma rutinaria [8]. Pese a que se conoce la forma de transmisión de *S. enteritidis*, no esta claro como este patógeno se convirtió en un problema asociado al consumo de alimento y recientemente, al consumo de huevo [13].

En distintas ocasiones se ha planteado la teoría de que en algunos países la erradicación de *S. gallinarum* [7, 9, 13, 14] y *S. pullorum* abrió un nicho en las explotaciones avícolas que permitió a *S. enteritidis* colonizar más frecuentemente al ser transmitido por medio de roedores que son sus reservorios naturales y permiten la diseminación de la bacteria en las casetas avícolas[7, 8, 15].

En México, en el 2009, se reportaron 129, 459 casos de salmonelosis (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem48/pdf/cua4.1.pdf>). Los fagotipos mas comunes de aves son el 4 y el 8, en humanos el fagotipo mas comúnmente aislado es el 4 [16].

1.2 Características microscópicas, morfología y fisiología de *Salmonella* sp.

Las bacterias del género *Salmonella* sp. son móviles, excepto *S. pullorum* y *S. gallinarum*, son Gram negativas, de forma cocobacilar; el género *Salmonella* sp. se encuentran íntimamente relacionada con *Escherichia coli*. Miden de 0.7 a 1.5 X 2.0 a 5.0 µm. Son anaerobias facultativas y crecen bajo condiciones tanto de aerobiosis como de anaerobiosis. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, sin embargo, pueden llegar a crecer a temperaturas de hasta 45°C. El rango de pH en el cual puede crecer *Salmonella* sp. varía entre 4.0 y 9.0 donde el óptimo es de 7.0, aunque algunas características tales como fimbrias o flagelos pueden no expresarse en condiciones extremas de pH. No son nutricionalmente exigentes y pueden crecer en agares básicos, tales como agar peptona o agar nutritivo. Las colonias de *Salmonella* sp. miden típicamente de 2 a 4 mm de diámetro, son redondas y con bordes suaves [5, 8].

1.3 Especies del género *Salmonella sp.*

Como se mencionó anteriormente, el género *Salmonella sp.* comprende dos especies: *S. enterica* la cual tiene más de 2 500 serovariedades y *S. bongori* [3].

En el caso de *S. enterica* se subdivide en seis subespecies:

- *S. enterica* subespecie *enterica*
- *S. enterica* subespecie *salamae*
- *S. enterica* subespecie *arizonae*
- *S. enterica* subespecie *diarizonae*
- *S. enterica* subespecie *houtenae*
- *S. enterica* subespecie *indica*

Actualmente se conocen más de 2,400 serovariedades dependiendo del antígeno O y del flagelar (H) [1, 5]. Las serovariedades que han sido aisladas a partir de casos clínicos humanos o en la práctica veterinaria, de forma histórica les han asignado nombres que denoten el síndrome que ocasiona como en el caso de *S. typhi* que produce fiebre tifoidea, por especificidad de huésped como *S. choleraesuis* que infecta cerdos, o por el origen geográfico de donde se aisló por primera vez dicha serovariedad como en el caso de *S. dublin* [1, 4, 6].

1.4 Epidemiología

La salmonelosis es considerada una infección oral/fecal, sin embargo, *Salmonella sp.* puede ser inoculada directamente al alimento, como en el caso del huevo o leche [4]. Por otro lado, se ha observado que los animales de producción pueden ser considerados como los mayores reservorios de bacterias enteropatógenas, las cuales se estima ocasionan 1, 412, 498 infecciones en humanos, 16,430 hospitalizaciones y 582 muertes anuales en Estados Unidos [17, 18]. Los animales se pueden infectar por 2 vías: a) el consumo de alimento contaminado, lo cual la FDA ha demostrado en numerosas ocasiones en diferentes especies animales como cerdos, gallinas, pollos, ganado, pavos y ratones; y b) mediante la entrada del patógeno a causa de escasas medidas de bioseguridad o higiene en las explotaciones animales (**Figura 1**) [8, 17]. Cabe mencionar que los

vegetales regados con aguas contaminadas pueden infectar al humanos si estos son consumidos de forma cruda o no son desinfectados de manera apropiada [17].

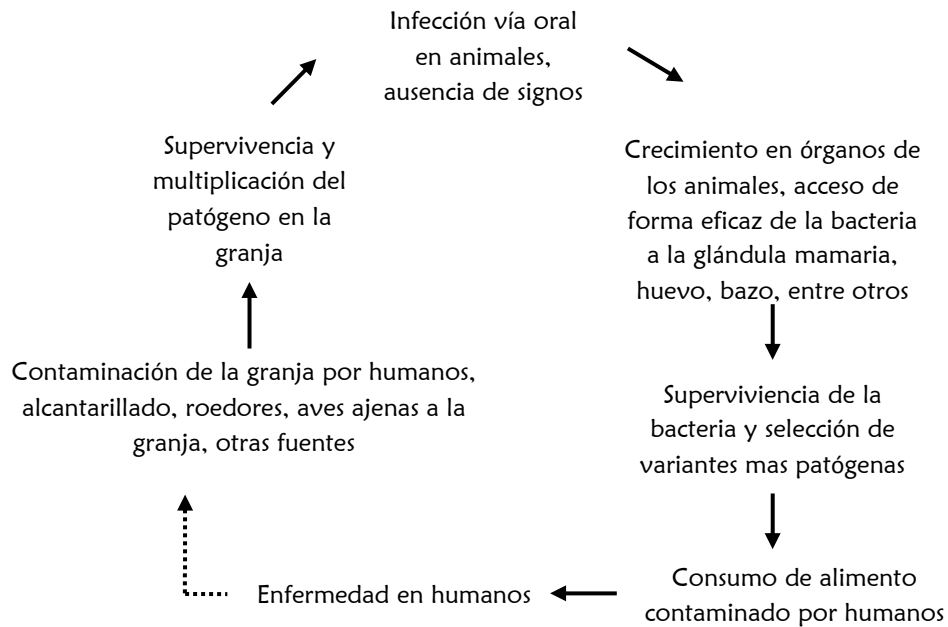


Figura 1. Ruta de infección de humanos por *S. enteritidis*. Aunque se muestra un cuadro donde la ruta primaria de infección parece ser lineal, esta también puede ser cíclica [8].

Los vehículos más comunes de transmisión son:

- Carne cruda y algunos productos cárnicos que suelen consumirse semicrudos
- Productos y subproductos de ave crudos o mal cocidos
- Huevo o productos que contengan huevo crudo
- Leche y productos que contengan leche no pasteurizada
- En algunos casos, jugos de frutas no pasteurizados y mayonesa casera.

Otras formas de contagio son mediante el contacto directo con animales vivos infectados, con tejido infectado o directamente con el microorganismo [4, 6, 8].

Los humanos son susceptibles a *S. entérica*, principalmente a las serovariedades Enteritidis y Typhimurium [4], [19]. En Estados Unidos la CDC reportó que aproximadamente el 60% de los casos de salmonelosis en humanos son causados por: *S. enteritidis* 24.7%, *S. typhimurium* 23.5%, *S. newport* 6.2% y *S. heidelberg* 5.1% [13].

Para que *Salmonella* sp. pueda ocasionar enfermedad en nuevos hospederos requiere de adaptarse al nuevo entorno, por ejemplo, *S. typhi* es capaz de ocasionar únicamente enfermedad en humanos y primates superiores, *S. dublin* produce enfermedad en el ganado y *S. choleraesuis* causa enfermedad en cerdos, a diferencia de *S. typhimurium*, la cual es capaz de ocasionar enfermedad en diferentes especies animales como: bovinos, cerdos, borregos, caballos, aves y roedores [20, 21].

Las distintas especies de *Salmonella* sp. son causantes de sintomatologías que van desde la fiebre tifoidea, diarrea/enterocolitis y bacteriemia hasta los portadores asintomáticos. La manifestación de la enfermedad depende de la susceptibilidad del hospedero y de la serovariedad con la que se infectó el hospedero [1].

La fiebre entérica es causada principalmente por *S. typhi* y *S. paratyphi* y ocasionalmente por otros serotipos, mientras que, aproximadamente 2000 serotipos han sido asociados a enterocolitis, aunque sólo 10 serotipos son los causantes de la mayoría de las infecciones, siendo los más frecuentemente aislados *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. heidelberg* [5, 22].

El período de incubación por lo general es de 6 a 48 horas y es seguido por dolor de cabeza, dolor abdominal, diarrea y vómito. La diarrea puede contener sangre, leucocitos y moco. También es común la fiebre, malasia y dolor muscular. Los síntomas se resuelven en una semana, en los adultos *Salmonella* sp. se sigue eliminando en heces hasta por 8 semanas pero en el caso de niños menores de 5 años se puede seguir eliminando hasta por 20 semanas, [5].

Por estudios en voluntarios se ha estimado que la dosis necesaria para iniciar la infección es de 10^5 a 10^{10} UFC, sin embargo, esto puede variar dependiendo de la cepa, el alimento consumido junto con la bacteria y el estado fisiológico del hospedero. Se ha propuesto que es necesario consumir grandes inóculos para poder superar la acidez del estómago, debido a que la dosis infectante disminuye cuando *Salmonella* sp. es consumida con alimento que atraviesa rápidamente el estómago (como líquidos), o cuando es consumida con alimentos que neutralizan el pH ácido como los quesos o leche [5, 23-25].

Se ha observado que únicamente las serovariedades *S. typhimurium* y *S. enteritidis* pueden infectar los órganos reproductores de las aves, contaminando los huevos durante su formación. Sin embargo, sólo *S. enteritidis* puede persistir en el huevo aun después de haber sido puesto [26,

27], siendo esta la forma de transmisión de la bacteria al humano al consumirlo mal cocido y en sus subproductos [21].

Bajo condiciones normales, las aves infectadas con *S. enteritidis* no presentan signos perceptibles de la enfermedad. Por el contrario, las aves que están infectadas con *S. pullorum* o con *S. gallinarum* muestran una disminución drástica en la producción de huevo, así como, mortalidad y pérdida de peso. Por lo general, *S. enteritidis* no es patógena para las gallinas, excepto las cepas adaptadas a las aves, las cuales causan un granuloma ovárico localizado, considerado como lesión patognomónica, que es muy poco frecuente y se le conoce como “*lesión de Pullorum*”: [8].

En pollitos recién nacidos y en aves bajo condiciones de estrés extremo *Salmonella sp.* puede llegar a ocasionar severas enfermedades sistémicas [19, 28]. En pollos jóvenes la infección con *Salmonella sp.* ocasiona diarrea y lesiones intestinales, infiltrado leucocitario en el sitio de infección, inflamación y daño a las vellosidades [19, 29].

En aves la infección por *Salmonella sp.* inicia por la ingestión de la bacteria, seguido de la colonización intestinal, posteriormente penetra la mucosa del epitelio intestinal resultando en una infección sistémica, la cual conlleva a la colonización del hígado y bazo [19].

Suecia, Finlandia y Noruega son países que han logrado eliminar completamente la salmonelosis en los animales de producción; esto ha sido gracias a una política implementada hace varios años, donde se propuso una “cero tolerancia” para *Salmonella sp.* [4].

Se sabe que los animales de producción son reservorios de varias enfermedades que pueden ser transmitidas al humano. La alimentación es el principio de la cadena de seguridad alimentaria en el modelo “*de la granja a la mesa*”. Otros estudios han demostrado que el alimento que se utiliza para los animales en explotación suele estar contaminado con serotipos de *S. enterica* no tifoidea y esto puede conllevar a la infección o colonización de dichos animales. En más de una ocasión se ha observado que el consumo de animales colonizados por *Salmonella sp.* ha provocado enfermedad en humanos. En 1958, en Israel se observaron varios casos de salmonelosis humana, los cuales estuvieron asociados al consumo de hígado de pollo. El serotipo causante de la enfermedad fue *S. hadar* y al rastrear el origen de la contaminación se descubrió que este serotipo se encontraba presente en el alimento que se les proporcionaba a las aves de dicha granja [17].

Otro caso similar se observó en Inglaterra en 1963, donde 77 personas resultaron enfermas. Al rastrear el origen de la enfermedad se descubrió que fue por el consumo de leche procedente de una vaca con mastitis debida a *S. heidelberg* [17, 30]. Debido a lo anterior, se ha sugerido un sistema de vigilancia para el alimento animal, así como, la integración de un sistema de vigilancia de enfermedades humanas de origen alimentario, donde una política de cero tolerancia a *Salmonella* sp. en el alimento deberá ser implementada mundialmente [17].

1.5 Factores de virulencia

Esta bien establecido que *Salmonella enteritidis* es capaz de persistir en el tracto gastrointestinal y en el tracto reproductivo de las aves sin que haya signos clínicos; sin embargo, los mecanismos moleculares que median la colonización para estos lugares siguen siendo poco claros [31-33]. Se desconoce por que algunas serovariedades de *S. enterica* se asocian a enfermedades entéricas en un amplio rango de hospederos (Enteritidis y Typhimurium), mientras que otras están restringidas a hospederos específicos (Gallinarum en aves de corral y Typhi en humanos). Mutaciones en el genoma de *S. typhimurium* ha demostrado que usa tanto factores especie-específicos como conservados durante la colonización del intestino en diferentes especies [31, 34-36]. Entre los factores que promueven la colonización intestinal, se encuentran las fimbrias, las cuales median la interacción entre la bacteria y el hospedero [31].

El genoma de *S. typhimurium* LT2, mide aproximadamente 4.8 Mb y tiene un plásmido de virulencia que mide 94 Kb. Con base en la secuencia de *S. typhimurium* se sabe que su cromosoma contiene de 11 operones fimbriales que se ensamblan por la vía chaperón-acomodador: *stc*, *bcf*, *fim*, *lpf*, *saf*, *stb*, *std*, *stf*, *sth*, *sti* y *stj*, (**Figura 2-A**). El operón *pef*, que también se ensambla vía chaperón-acomodador, se encuentra localizado en el plásmido. *S. typhimurium* tiene otro operón que codifica para una fimbria que se ensambla mediante el sistema de nucleación precipitación, llamada *agf* (anteriormente conocida como *csg*) (**Figura 2-C**).

Recientemente se describió el genoma de *S. enteritidis* observandose que presenta los mismos operones que *S. typhimurium* excepto por dos, el genoma de *S. enteritidis* no presenta los operones *stc* y *stj*, en lugar de ellos están los operones *ste* y *sef*, de igual forma, presenta un operón mas: *peg*, el cual también se encuentra en *S. gallinarum* y *S. paratyphi* y el cual presenta un 60-70% de homología con el operón *stc* de *S. typhimurium* y el cual se encuentra localizado

prácticamente en la misma región génica. Este operón también es ensamblado mediante el sistema chaperón acomodador [31].

El pili tipo IV se ensambla mediante el sistema general de secreción, este sistema es independiente de chaperonas ya que la plataforma de anclaje del pili se ubica en la membrana interna, por lo que no es necesario transportar a través del periplasma las subunidades fimbriales o pilinas. En *Salmonella sp.* no se han encontrado genes que codifiquen para este tipo de fimbrias (**Figura 2-B**) [3].

En *Salmonella sp.* también se encuentran fibras ensambladas por el sistema alternativo chaperón-acomodador, estas fimbrias se encuentran en la superficie de *E. coli* enteropatógena (EPEC) y se asocian a la colonización del intestino del hospedero. Por microscopía electrónica se observa que tiene un gran similitud con las fibra P de *E. coli* (**Figura 2-D**).

El estudio de estos operones ha resultado difícil, ya que únicamente las fimbrias tipo 1 y *agf* se han logrado expresar de forma adecuada *in vitro*, no existe información acerca de la especificidad de ensamblaje de estas fimbrias, por lo que únicamente se pueden hacer hipótesis acerca del funcionamiento y ensamblaje de los 11 operones restantes [37, 38] .

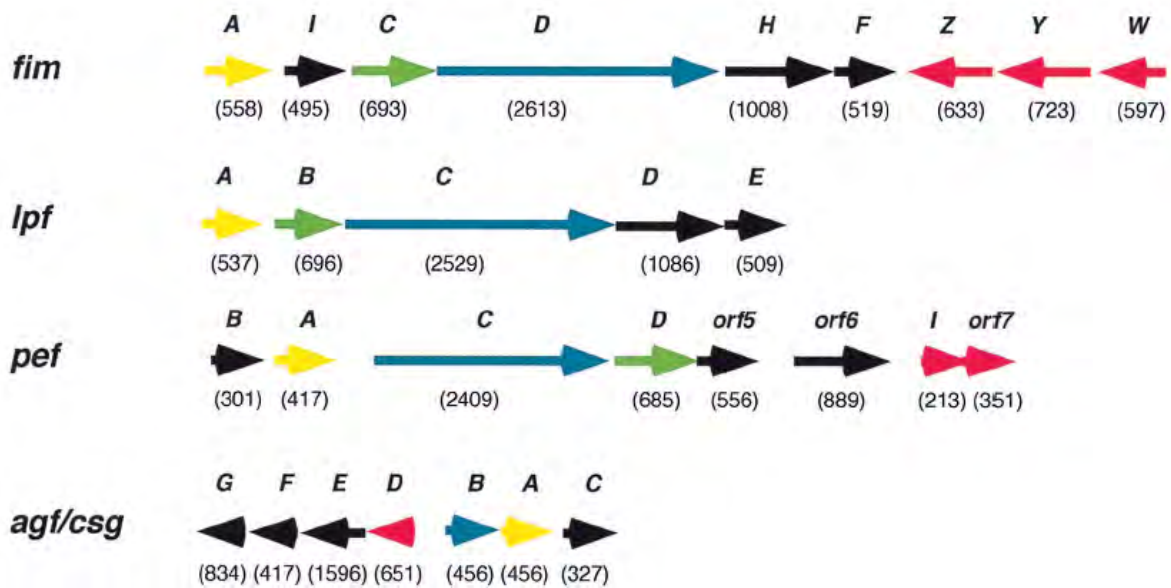


Figura 3. Organización de cuatro operones fimbriales de *Salmonella sp.* Las subunidades mayoritarias están indicadas con el color amarillo, las chaperonas están indicadas en verde, los acomodadores en azul, las subunidades minoritarias en negro y los genes que codifican para proteínas reguladoras en rojo. Debajo de cada gen se indican las pares de bases que lo conforman [5].

La fimbria Long Polar Fimbriae (*lpf*) está implicada en la adhesión a las placas de Peyer en ratones [40-42]; *in vitro* se ha observado que la fimbria *fimH* media la adhesión de *Salmonella sp.* a células HEp-2 [43]; la fimbria codificada por el operón *pef* es necesaria para que *Salmonella sp.* pueda adherirse a las vellosidades del intestino delgado de los ratones [44, 45].

Se ha demostrado que *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 tiene tropismo por las placas de Peyer, el cual puede estar asociado a genes con gran homología a la fimbria LPF, que es considerada la responsable de la adhesión de *S. typhimurium* a las placas de Peyer. En experimentos con bacterias deficientes en uno de los genes que codifican para LPF, el tropismo bacteriano cambia, adhiriéndose a la región proximal del íleon en vez de a la región distal, confirmando el tropismo que confiere esta fimbria por células de una región anatómica específica [39, 41]. Sin embargo, en *Citrobacter rodentium* las mutaciones en el operón LPF no le confiere tropismo a tejidos o células específicas, ni media la adhesión, al menos en el modelo murino [39]. Se ha demostrado que aparte del operón *lpf*, los operones *fim*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, *sth* y *csg* se encuentran involucrados en la virulencia de *S. typhimurium* en ratones [36].

En *S. enteritidis*, la mutación de la subunidad mayoritaria de *lpf* no produce diferencias en la colonización cecal, no observándose diferencias significativas en la cantidad de *S. enteritidis* cepa de campo y *S. enteritidis* Δ lpfA recuperadas a partir de heces, bazo e hígado. Esto confirma que la mutación de este operón no se traduce en una disminución de la virulencia en aves, respecto a las cepas de campo, inclusive, cuando se evalúan mutaciones combinadas de los operones Lpf, Sef y Csg no se observan diferencias significativas en la colonización de intestinos de aves, a diferencia de mutantes en los genes *stbC*, *csgD* y *sthB*, los cuales si han demostrado estar implicados en la colonización del intestino de las aves. En el modelo murino, la delección o mutación de los operones Lpf, Pef, Fim o Csg muestra una disminución de la patogenicidad. Sin embargo, muchos de los experimentos reportados fueron realizados por periodos de tiempo cortos, por lo que no se puede excluir la posibilidad de que alguna de estas fimbrias tengan un papel en la persistencia a largo plazo en los intestinos de las aves o que inclusive estén involucradas en el tropismo de el tracto reproductivo o en el huevo [31].

Se considera la adhesión como un primer paso para que se pueda llevar a cabo la infección y posteriormente la colonización; para esto es necesario que la bacteria entre a la célula del hospedero y esto lo logra mediante una serie de moléculas efectoras que inducen el rearrreglo del citoesqueleto de la célula eucarionte. *Salmonella sp.* ha adquirido un sistema especializado de secreción de proteínas denominado "Sistema de Secreción Tipo III" o SSTT, el cual es capaz de inyectar en la célula blanco del hospedero diversas proteínas efectoras [46, 47]. Se sabe que *Salmonella sp.* posee dos Sistemas de Secreción Tipo III, codificados por dos islas de patogenicidad (SPI1 y SPI2) [48]. Estos rearrreglos del citoesqueleto inducidos por *Salmonella sp.* le permiten a la bacteria penetrar a la célula (**Figura 4**), evitar la fagocitosis y de esta forma diseminarse por el torrente sanguíneo, colonizar distintos órganos como el bazo o hígado y provocar septicemia [49, 50].

La isla de patogenicidad 1 (SPI1) es una región de aproximadamente 40 Kb ubicada en el centisoma 63. El sistema de secreción para el que codifica es necesario para la secreción de las proteínas que ocasionan la formación de los lamelopodios en la célula del hospedero y permiten la internalización de la bacteria, dos de las proteínas efectoras son *SopE* y *SptP*, que interactúan con GTPasas de la familia Rho [47, 48, 50].

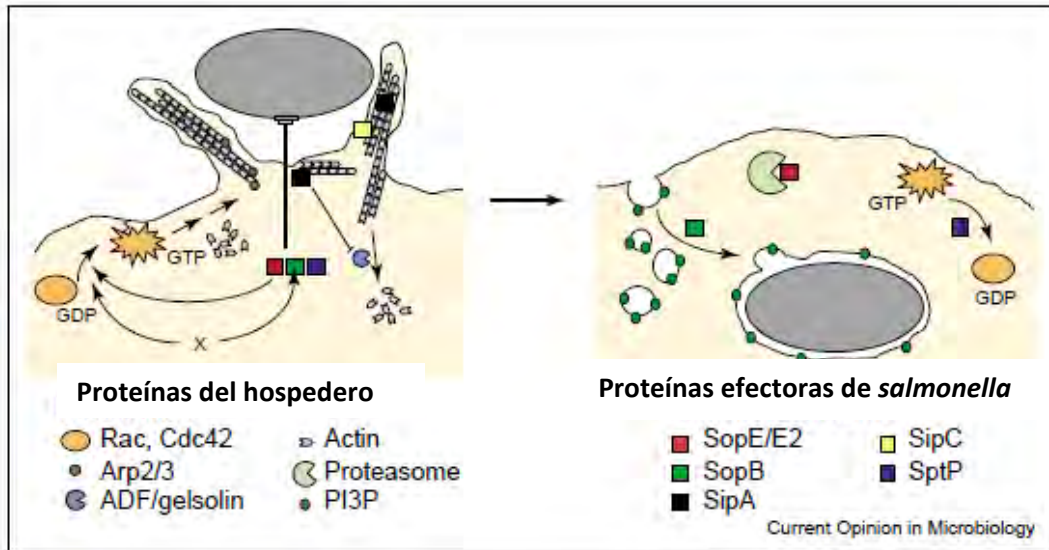


Figura 4. Internación de *Salmonella sp.* Representación de *Salmonella sp.* la cual se esta internando en una célula eucarionte, donde se pueden observar algunas de las proteínas efectoras de la SPI1, las cuales son necesarias para la formación de los lamelopodios [47].

La segunda isla de patogenicidad (SPI2) se localiza en el centisoma 31, mide aproximadamente 40 Kb, codifica para un segundo sistema de secreción tipo III y es necesaria para ocasionar infecciones sistémicas (**Figura 5**) [50].

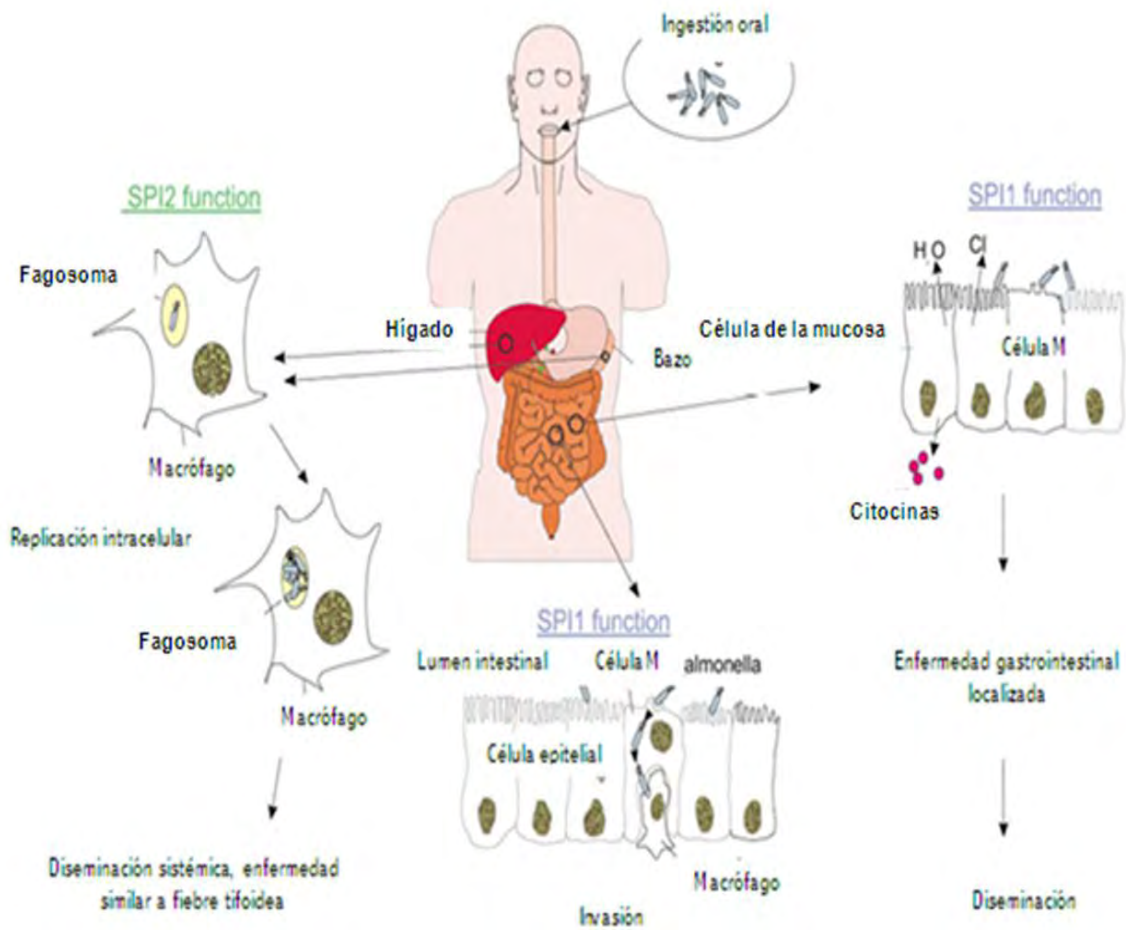


Figura 5. Participación de las islas de patogenicidad en la patogenia de Salmonella sp. En el esquema se muestra las funciones de las dos distintas islas de patogenicidad, donde se observa que la SPI1 es necesaria en las etapas tempranas de invasión, para permitir la entrada a las células del hospedero, evitar la fagocitosis y la diseminación y colonización en organismo. En cambio, la SPI2, es necesaria para la diseminación sistémica y la replicación en macrófagos, evita la fusión fago-lisosoma [48].

1.6 Estructura molecular de la fimbria Pap y las fimbrias tipo 1

Hasta la fecha se han identificado por lo menos 37 filamentos adhesivos en la superficie de microorganismos Gram negativos [51], a su vez, se encuentran mas de 30 chaperonas similares a PapD [52]. Las fimbrias mayormente estudiadas del sistema chaperón-acomodador son las fimbrias tipo 1 y las fimbrias Pap, ambas pertenecientes a *E. coli*. La fimbria Lpf utiliza el sistema chaperón-acomodador para su ensamblaje, se han encontrado secuencias homólogas a esta fimbria en otras especies del género *Salmonella* e inclusive en otros microorganismos Debido a la alta homología que existe entre Lpf y la fimbria Pap, se ha sugerido que esta fimbria se ensambla mediante un sistema chaperón-acomodador [3, 31, 53-56].

La fimbria tipo 1, está en una adhesina pequeña formada por FimH [53]. La estructura principal de las fimbrias consiste de 500 a 3000 copias de la subunidad mayoritaria, teniendo 3.28 subunidades por vuelta, mide aproximadamente 2 μ m y tiene un grosor de 7nm, estas se ensamblan en sentido de las manecillas del reloj [51, 52, 57]. En el caso de la fimbria Pap, la subunidad mayoritaria la forma PapA, PapE se encuentra formando la fibrilla mientras que PapK es un adaptador que liga estas dos estructuras. PapG es la adhesina que se encuentra unida a todo el complejo mediante el adaptador PapF [53, 58, 59].

Durante la biogénesis de la fimbria, todas las subunidades son transportadas por la chaperona, y mediante estas pueden ser transportadas sin ser degradadas gracias al mecanismo llamado complementación de la hebra donadora (DSC por sus siglas en inglés Donor Strand Complementation) (**Figuras 6 y 7**) [53, 54, 59, 60]. Las chaperonas tienen un ensamblaje similar al de las inmunoglobulinas (Ig), consistiendo de dos dominios que asemejan a la figura de un boomerang [53, 58]. De igual forma, las subunidades consisten de dos dominios, el dominio de la pilina y el dominio de unión con el receptor, estas también tienen un ensamblaje similar al de las inmunoglobulinas, pero en el caso de las subunidades fimbriales carecen de la séptima β -plegada carboxy-terminal (o región G1 G1), lo cual produce una hendidura hidrofóbica en el núcleo de la proteína. Esto produce una inestabilidad en las subunidades, la cual desaparece al complementarse con las chaperonas, evitando de esta forma, la agregación de subunidades protéicas en el periplasma bacteriano que pudieran resultar en agregados tóxicos [53, 55, 58]. La hebra G₁ de la chaperona provee la hebra faltante en el domino de la subunidad Ig, interactuando residuos de Arginina y Lisina que se encuentran en la bisagra de la chaperona con la región

carboxilo-terminal de la subunidad. El ensamblaje producido es el de una Ig atípica, ya que la hebra G₁ corre de forma paralela en la chaperona (**Figura 8**) [53].

Las subunidades fimbriales, al ser transportadas por las chaperonas dejan libre su extremo N-terminal, el cual contiene un motivo altamente hidrofóbico que únicamente interactúa con otras subunidades, para de esta manera realizar la extensión fimbrial. Se ha propuesto que durante la biogénesis fimbrial, el extremo N-terminal de una subunidad desplaza la hebra G1 de la chaperona mediante un mecanismo llamado intercambio de la hebra donadora (DSE por sus siglas en inglés Donor Strand Exchange) (**Figura 7 y 9**) [53, 61-63].

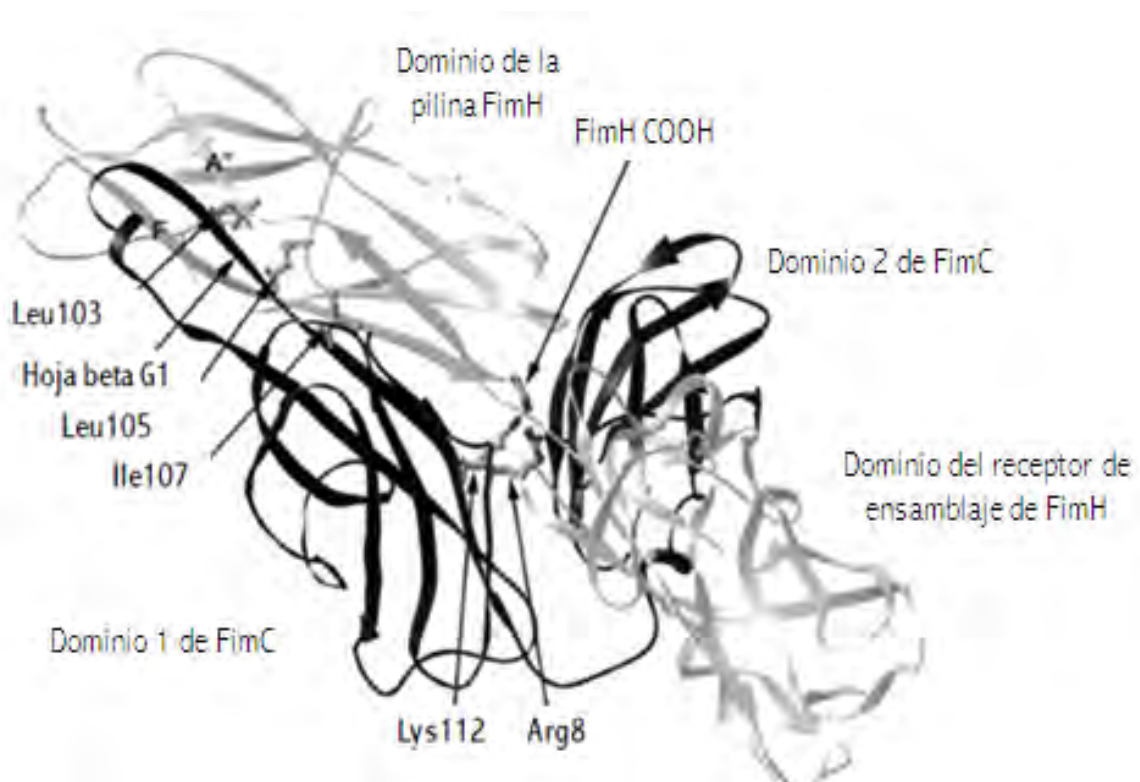


Figura 6. Interacción DSC entre FimC-FimH. El complejo chaperona-adhesina. FimC se muestra en negro, FimH en gris. Los aminoácidos Leucina e Isoleucina (Leu103, Leu105 e Ile107) forman parte del núcleo hidrofóbico de la pilina, permitiendo el plegamiento y la exposición del dominio hidrofílico y este a su vez, la interacción con la chaperona [53].

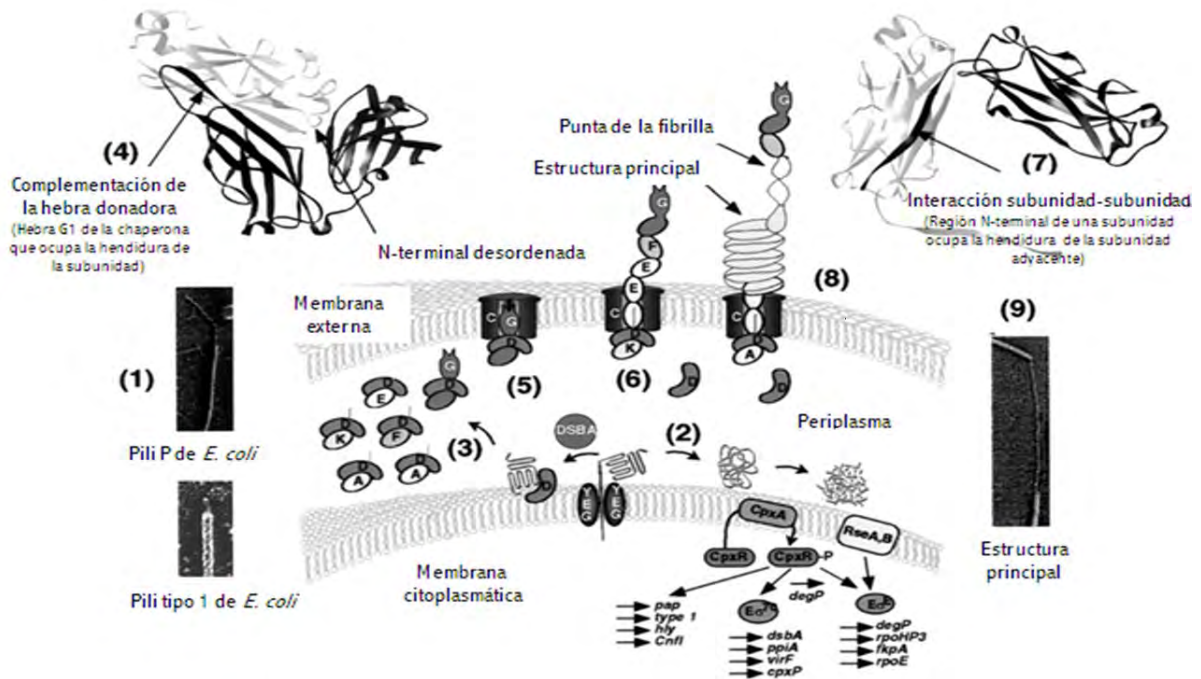


Figura 7. Biogénesis del pili P. Los pilis P forman parte de una gran familia de organelos que se ensamblan mediante chaperonas similares a PapD con sus respectivos acomodadores. En el apartado (1) se muestra una micrografía electrónica de un pili P y un pili tipo 1 de *E. coli*. El apartado (2) muestra como en la ausencia de la chaperona, las subunidades se segregan en el espacio periplásmico, las cuales posteriormente son degradadas. A través del mecanismo DSC la chaperona estabiliza las subunidades fimbriales tal como se muestra en los apartados (3 y 4). Este mecanismo previene la polimerización prematura de las subunidades, las cuales después de ser transportadas por la chaperona, son transportadas al espacio periplásmico para poder llevar a cabo en ensamblaje (5), el ensamblaje de la subunidad adyacente se denomina DSE (7 y 8). El pili maduro continua su crecimiento hacia el exterior de la célula al espacio extracelular (8 y 9) [53].

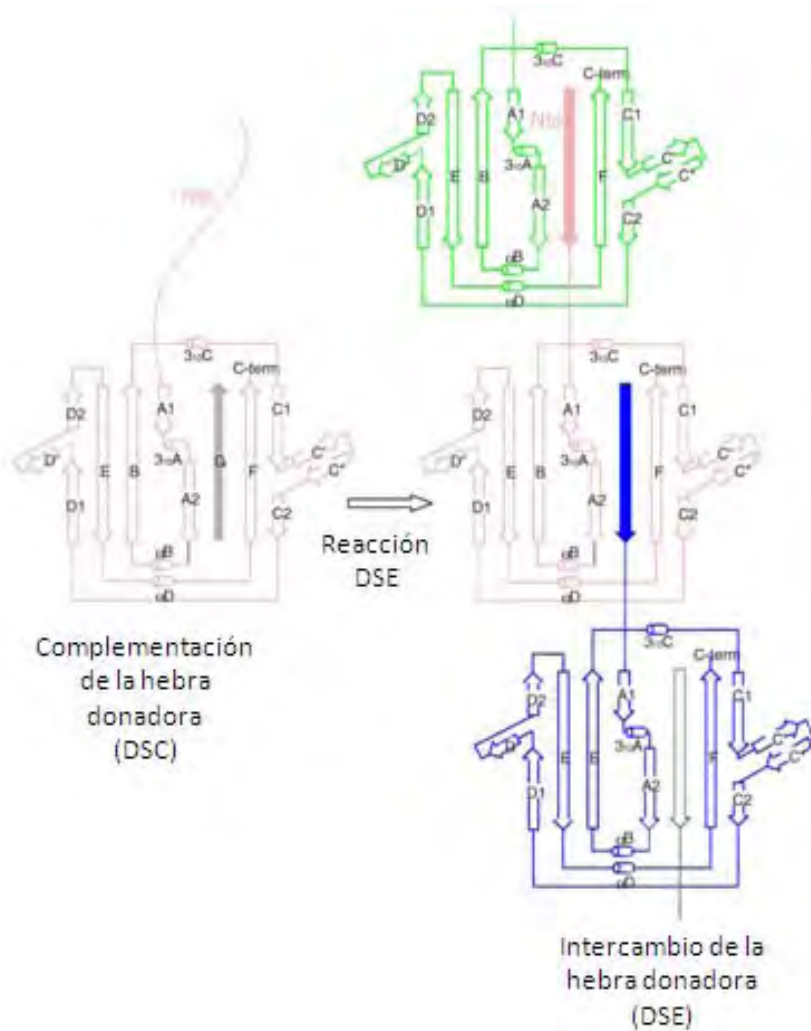


Figura 8. Diagrama esquemático de DSC y DSE. Las hojas β y las hélices son representadas como flechas y cilindros respectivamente. A la izquierda el diagrama de la unión de una subunidad y la chaperona en color rosa. La región N-terminal se muestra como una región desordenada en la hoja A1. En la chaperona, sólo la hoja G1 se muestra en gris, la cual complementa el plegamiento de la subunidad insertándose entre las hojas A2 y F, por lo que forma un plegamiento de Ig atípico. La complementación de la hebra donadora es designada como DSC, por sus siglas en inglés. A la derecha, la misma subunidad se muestra en rosa. La región N-terminal esta insertada entre las hojas A2 y la F de otra subunidad mostrada en verde. Su hendidura esta ahora ocupada con la región N-terminal por la subunidad subsecuente la cual se muestra en azul oscuro. Esto es referido en la literatura como DSE o intercambio de la hebra donadora [59].

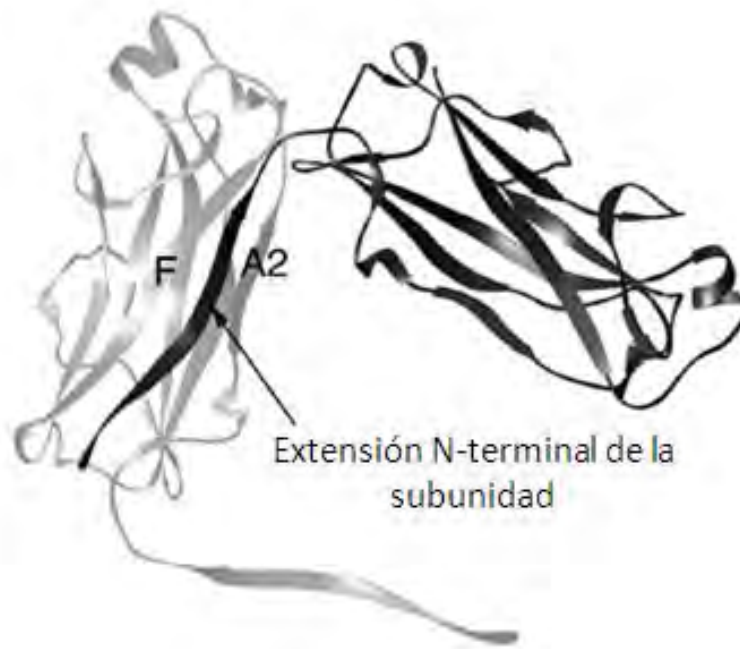


Figura 9. Interacciones subunidad-subunidad. El extremo N-terminal de una subunidad reemplaza la hebra G₁ de la chaperona la cual completa la forma de Ig de la subunidad precedente [53, 59].

1.7 Secuencia del Operón Long Polar Fimbriae (LPF) de *Salmonella typhimurium* LT2

TTATTCGTAGGACAGGTTGAAGTCCACTTCTGCGTTACCGTAACCAAGTGGTTACAGTATCTTTTGTTGCAACG
 TAGTTAGCGGTGTAGTACAGCACGGTCTGACCAGCAGCCAACGTAGTGGTGGATTTACCGGTGTTCAATTC
 AACAAGCTTGTTAGCGTTGTCGTAGATACCGATGCCACGCCAGTTGCCGCACCTGCTTCAGTGTTAACAGA
 AACCAGTGTCGCATCGTCTGTATCACCAACGCCATTGAAGCTTACGTTAACTTTGGTATTAGAGGTGATGTC
 ACAGTCTTCCAGTTTGATCTGGAAAGGCTTAGAAGAAGACTTGTCGCAATGGCTTTGAAGATATTTTTCTT
 AACCTGACCCAGCACAACTTCTGTTCTGGGAGTCAGTAGAAACGACGCATGGCGCGTCAACGATTTTAC
 CGGTGAATTTAATGGTGCCGTCACCAGATTCAGCAGCGAAAGCAGAAGTGGAACACTACAGCGAGAGCAGA
 CAGAGCAAAAACAACCTTTTTTCATTA AAAACTCCATTAGTTAACGCGCTGTGTCAACATGTCGCCAGCAGTG
 CCAAAGTCATTAATAATGTTGTATTTAACTTCGTTACCTTGCCGGTGCCGGCTGGCAGTTCAATATTCAATG
 AGCCTTTTGCCGGAACCATTCCCGTTTTTTCAATATCACGGCCGTTGGCATAAAAATTTATTAACGTCAGGTT
 AAAGGCAGATGGGTTTTTCACTTTGATCTGGTTAGCCCCTGCGCTGGTGAAGTGCAGTTTGTTCAGCCGTC
 CATGCTATTGCCTTTCAGGCCCGCCGGGCGATAGAACAGTTTTAAGCGGGTACGTACGGCGATCTGCAGTA

CGTTTTAGCTTCCGCGTCTTCACTTTTGGCAGGAATAGCTTTTACGTTAATCCAATAAACGGACTCGCGATC
CTGCGGTAACGTGTTTCGTCGTATTAACAATACGTAACGTTATTTTTAGTCGGGCTTAATTTAAATAACGGT
GGAGTGATGATAAAGGGCGTCTTTTTATTACCGTTAGCATCATCAATCCATGACTGAATGAGAAATTCATCC
GTGGTGCTTTTATTATTTACCGTAAGAGAAGCTTCTTTTACTACCGTCATAAATAACACGCGTGCTGCTTA
ATGCCACGCCTCCGGCAAACGTTTGGAGCAATCAACGCCAGCACCAAGTGCTGTGCAAGATATCAAACGT
GAGCGGTTCAATTTACCGGCAGACGGCATTGCCATCACACGCCGGTATTATCCTGTTGTTCCGGCAGCGTA
AACGCCACGCGGCATTGCTGTGCCTGGTCTTTACCCAGTTCACCTGAAGGGCACCTTTCTCCGGCATCCCG
CTGATATAAAGCTGACCGTCTTACCCACAATGCTGCTGGACTCTTTTGTGGTATCCAGCAGCGTGGCGGTA
GCACCAAACGGCACCGCTTTGCCATTGGCCTGCGTCAGATTCATCAGCACACGATAGCCACTCGGGTATCG
AAGCGGGCACGAACAATCGCGCCGCGTGTGGCACTACGTTGACGGAGGCGGTATCCAGGTCAACCTGGT
TGTTACAGGCTGTCGCTTCGCAGTGAGACTTCCGTTTACGGTACGGAGTAAGGTAAGGTACGACCGCATT
CCCATCCAGTCCACTTCCACACCACCGTTGTTGATCACGTGCGCGCCGCGCGCGCCCGGCGCGGAGATAAT
GGCCATGGATTACCCAGCGGTTGAGAAAGAGTGATACCTTCGCTATGGGCTATCACACCGCCGCGCAAAC
CGTAGTTCACCTGCTGGCCGTCACGGTTGTAGTTGTAACCCAGGCTGGCGCTACCCACGCCGCCCTGGTAAT
CCAGGTTACGCTGCCGCTGTTACCCACGCCGTTGCTGCCGTAGCCTTCTGCACACTATAGTTCAGGTTGT
GGTCTTCCAGCGCGGTGCCGCTACCCCTAACTGCTGGTTGGTTCCGGCCATGCTGATCGGTCGTGAGGTGG
TAGTTACTCCACACGCGTCCCAGTGGAATCGACATGGAGAATGACAGTAAACGATCGCTCTCATCCACTCC
GGGCTTTTCGTCCAGGTGTAAGCAACGCTGTAGTTCACGCGGCCAATACGGCCGTTATAACCGGCATTAG
CGAACGCTGTTTACCTTCATCGTTCAGTAGTCTGCTGCGTGACGTTAAAATAGACCGAGCCCCAGGCGCC
CAGTTGCTGCGTCACGTTGCCCTGAATCTGACTACGTTTGTGGTACTGGCTATAAGAGCTGTCCGCATCGCT
GCGCACATCCGTCGCTTCTGGAAGGTGTAATAGCCGCTGGTGAATACTTGTAAACCCAGCAGACGGAAAT
CTGTACCGCTGTTAAAGCTCTTGGAGTAGAGGAAACGATAAGACTGACCTTCCGAATTCTCCTCATTTGCCA
GCTTGCTTTTTGCCTGGGTTACATCGATGGAGATCGCGCCGATATAACCGAAGTTTTTACCTAATCTCCCGC
CAGCGAGTAATAGTCGTCAGAGAAGATCGCACACCAGTAAACGGTAAAGCCATACGGCAGGCCGTACATG
GCATCAAGCTGCCC GAATTTCCGGCTCGGCGCTGTTATAGTTCCCGGCACGGTATTCCCCGGCGGAAAGGCT
GTATTTGAGATGGCCTTACGCTGGAGGAGCGCCACCGAGGAGAACGGCTGAACGAATTCTGCTCACTGC
CGTCCGATTCTTTAATGGTGACCGTCAGGTCGCCGCTGTTGAGGTTGGATACAGGTCGTTAATTTCAAACG
CACCCGGCTGAACAAACGTACGGTAAATAACGTAGTTGTTCTGCTCAACGGTAACTTCGGCGTACTTTTGG
CAATACCCCGGATGACGGGCGCAAACCCGCGCTGGCTGTCAGGCAGCATCTTTCGTCGGAAGTTAACTGC
ACACCGCGCATCTGAACGCTGTCAAAAATATCACCGGCAGTGGAGGTATCCCCAACGTCAGCTGTGATTT
AGCGGTACAATGGCACGGCTTAAGGATGTGCCAATGTTATCCCATGTGTTGTTACCGTCGTTTCGCGTCCAG
GTGCTATAGTTACGTAACCGCCATGCCCCAGGTTACATACCGCTGCGCAGATTAGATAGTAGCTGTCGCTG

TTGTAGCTGGTTTCACTGTCGTGTGCGTCATAGCTGGCGTTGCTGCCGAAAAGTTATAATCCACCAGCAGG
GCATTCACCCCTTCGTCCCCTGCGATTCTGGCACCGTACCGCGCGCTGTCTGCTTCATCGCAGCCTGCGGG
AAGCTCATGATCAGGGTCTGGTCTGCAAAGTCGAAATGGCTGGCGGCCTGGGGAATAATGTCGTCAAAG
CAACACAGGCTTCAGGCGGGGCCATTTTCAGCGCCGGAAGCTATCAATACGCACGCCATATCTTCAAGC
TGCACGCGGCTTAAGCACGGCACCAGGGATTACCCATTTTTGCGCGCTGCGCCTCTGTCGCTGCCTTAAAC
TCCAGGGTGCAGACTCCATTTTTTTTTCGTTGACCACCACCGAGACGCGGTATTTACCTGGCAGGTGTTCA
GCTTTATTGGATTACATATTGAAAGGTCAACGTGCTGATCAATACCCGGCACATCTCCAGAAAGCGCGG
GTTAAATGTTCCCGCATACGCGGGGAGCGTACCCGCTATCATCAGCGCAAGCGCAGACTGCGTGAAACGCG
AGGTCTTATTGCCAGAGGAAGATGCGTCCATGTCAATTTACTCCACATCAATACGCATGGTGGCAATTCCT
CGAAATCCCCGGCGGCCGCAATTTGCCGGTGGTACTGATAGGGTAAGCCGAAATGGTCTGTGAGGCGGT
ACGGTGCCTGTCGTCAACAAGACCCGATACGCTCAGCTCCTGATTAACACTGGCGTCATTTGGCACCAAAT
TTTACCGTTAGCGCCCTCAATGACGGCACCGATATCCGGGTTGCCATGTCGATGGCATTGAATCATTAGC
GTTTGGCATTCCCTCAATACGCAGGAAGATCTTTACGCCATCGGAAATATTGGTGCATTTAACTGCAGCTC
TTTGGTGAATTTGTCGGCTTCTTTGCAACTTGTCTTTGCGATCTTTAAAATCAGTGGCCTTAAATCCCA
AACGGAATTTCCAGCGTGTGCCGCTGGAGAGTTCACAGCCCTGAGGTACCGTAATTGAACCACTGATATA
TACAGACGACGCAGGTATACTGCCATATACTGGGTTTCTTTGTCACAAAAGGTCCATTATTTGGTGT
AGGTATAAATACTTTACCCACAAACGGATGGAGAATATAGAGCGATAAGTGACCTTTGCCACCGGATGTCC
ATATTGCATCTTTACTACTTGCATTTTGCGAACACTGAGAGCGGTTGTTTGTGAGGTTACCTACATTCTCAA
CGGTGTGTTAACGTATTCTCCTCGTCCCCCGAAATCAGTACATCGCTCGCAATGGCAATATTATTATTGATC
TGGAATAGGAGCGACTCTCTATATTCGTAACAAAGGCCAGAGGAACCACAGCCTTAAATAAGGTGTCATT
TATAAGAGAGGTATCATCAGGGCATTACAGGACATCGCATAGGTTCCACCTAAATTCCAGCTATCGAAATC
TACGAAGGTCGCACCCGTTGTGTTCTTTGACGTATCTGAAACTGTTTTATTTATGGTGGCACTGAAGATATGT
GTTCCACCTTCAGGAGTACATGGTCCAAAATCTGCCGCTGCCAGCGCCTGCCCCGAAAACAGCACCGACCC
GCCAACAGGCCCGTAAACATTATCAACTTTTTCAACATTTATTTCGTATGTGACGCTAAAATTCACCGTCGCA
TTCGCTGTGCCAACGGTGGCATCCGGCTTAACAGGCACATAGCTGGCGATATAGTTCAGCTTGTTTCGTACCA
TCAAACCAGACAGTGTGTTTCGACAGGCGTAGAGTCGGTACTGGAGGGGTATTGTTGCTCCCCACCAGATGT
TTAATTTTTAACGCCACGCCGTCGCGCCGCGCTATCCAGGGCAAAAAGCGAGGGGTGAGTCGGGTCCG
GAGAACCCTCCATCGTAACGCTGGCCTTTGTGGCATAACGCGCAATCTTTAAGCCGATGCTAAAGTTTTCT
GGTTCAGCTCTTTACCCACTTTTACCGGGCGCTGAAGCACACGGTCTCCATATTGACGTCGATACTGTCGTT
TTCCAGTTCACAGGTAGCCGCCTTAATAGTAATGGTAAAGTGGATATCACCAGCAGAACCAGATATTCGACG
GTGCCGCCATCGCGGAAGCGGTAAGCAGTAAACACGCTGGCATCAAAGCATGAAGGTTTTTCAT

lpfA, lpfB, lpfC, lpfD, lpfE. *Salmonella typhimurium* LT2 [AE006468](#)

2. JUSTIFICACIÓN

Existen pocos datos acerca de los mecanismos moleculares mediante los cuales *S. enteritidis* coloniza el intestino de las aves, la habilidad que presenta el microorganismo para sobrevivir y persistir en el organismo esta pobremente descrito, lo cual también es debido a la baja expresión de algunas fimbrias *in vitro*.

Las adhesinas promueven la colonización bacteriana en tracto gastrointestinal, incrementando la proximidad de la bacteria con las células de hospedero. Las fimbrias han demostrado contribuir en el tropismo de *S. enteritidis* por las velocidades del intestino delgado en el ratón, así, mutaciones en algunas fimbrias pueden disminuir la patogenicidad.

Cepas de *S. enteritidis* mutantes en la fimbria Stb, han demostrado ser deficientes en la colonización cecal en aves, por lo que la patogenicidad de dichas cepas disminuye. Se ha demostrado que la fimbria Lpf esta involucrada en la adhesión de *S. typhimurium* en ratones.

Al no conocerse bien el papel de la fimbria Lpf en la infección de *S. enteritidis* en aves, es importante evaluar su participación en la patogenia, con el fin de conocer si desempeña un papel importante en la salmonelosis.

3. HIPÓTESIS

La fimbria Lpf participa activamente en la infección por *S. enteritidis* en aves, facilitando el desarrollo de la enfermedad.

4. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la participación de la fimbria Lpf en la patogenia de *S. enteritidis*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

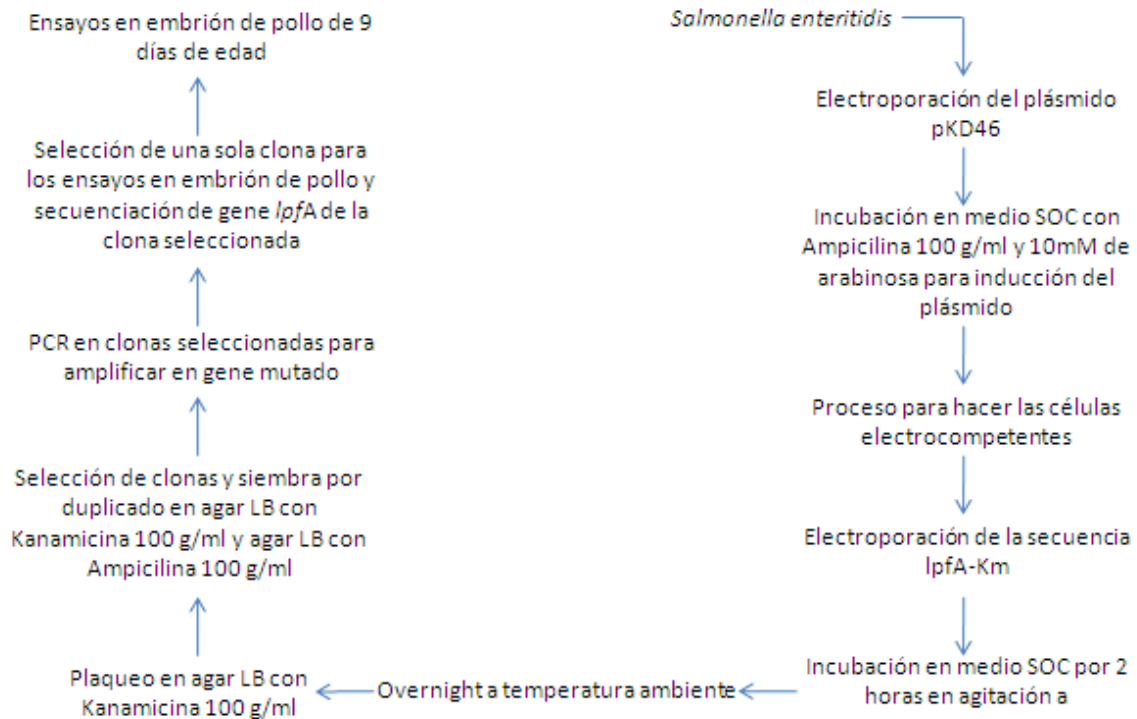
1) Conocer las distintas fases del ciclo de crecimiento *in vitro* de *S. enteritidis* a distintas temperaturas, ya que los ensayos de invasión se llevarán a cabo en la fase logarítmica. De igual forma, se harán cinéticas de crecimiento a distintas temperaturas y en presencia de dos diferentes concentraciones de arabinosa: 10 μ M y 100 μ M.

2) Construir una mutante de *S. enteritidis* en el operón *lpf*.

3) Evaluar la virulencia de la cepa *S. enteritidis* Δ *lpfA* en embrión de pollo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Esquema general de estrategia de mutación



6.2 Cepas

Se obtuvieron 5 aislados clínicos de *S. enteritidis* fagotipo 13, cuya identidad fue utilizando las pruebas microbiológicas estándar. Los aislados fueron sembrados en agar LB, agar Mac Conkey y agar Verde Brillante y posteriormente se utilizó la bioquímica corta para identificar positivamente a *Salmonella sp.*, todas las cepas de campo mostraron sensibilidad a kanamicina y ampicilina. El listado de las cepas se muestra a continuación:

C-6925-06, T06-3804, 6674-06, C-7704-06, C-7739-06

Par los ensayos posteriores y la generación de la mutante se decidió trabajar con el aislado T06-3804. En las pruebas de identificación se utilizó como control la cepa tipo *E. coli* ATCC (*American Type Culture Collection*) 25052.

Las siguientes cepas fueron utilizadas como cepas control en los experimentos posteriores una vez obtenida la mutante:

S. enteritidis T06-3804

S. enteritidis T06-3804 con el plásmido pKD46 (S.E. pKD46)

Para su evaluación:

S. enteritidis Δ *lpfA* (S.E-kan)

6.3 Cinéticas de crecimiento bacteriano

Para determinar las fases de la curva de crecimiento de la cepa T06-3804 de *S. enteritidis* fagotipo 13, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento bajo distintas condiciones como se indica a continuación

1) Cultivo Primario

Se utilizó un cultivo de *Salmonella sp.* con un crecimiento previo de 12hrs, el cual se diluyó 1:10 en caldo LB y se incubó a 37°C toda la noche (16hrs).

2) Cultivo secundario

Al día siguiente se tomaron 100 μ l del cultivo primario y se agregaron a 100 ml de medio LB. La cinética de crecimiento se determinó por 18 h a 37°C, cada hora se tomó una muestra de 1 ml del cultivo en incubación para su lectura en un espectrofotómetro¹ a una longitud de onda de 600 nm. Al mismo tiempo se hicieron diluciones dobles seriadas de cada muestra, las cuales se plaquearon en agar LB para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) a las 12hr de cultivo a 37°C. De igual forma se realizó una cinética de crecimiento a 30°C, debido a que el plásmido para la

¹ Espectrofotómetro, Amersham Pharmacia Biotech. Ultrospec 3000, Cambridge, Inglaterra

recombinación homóloga pKD46 se pierde a más de 35°C, ya que este es un plásmido termosensible. Cada cinética se realizó por duplicado.

Se realizaron cinéticas de crecimiento con 10mM y 100mM de arabinosa² Para determinar si la arabinosa interfería con el crecimiento de *S. enteritidis*, ya que estudios anteriores han demostrado inhibe el crecimiento de algunas especies. Se siguió el mismo protocolo antes descrito, haciendo el experimento por duplicado.

6.4 Extracción de ADN

La cepa de *S. enteritidis* T06-3804 fue cultivada en caldo LB hasta alcanzar la fase logarítmica tardía (DO₆₀₀). Posteriormente, el cultivo se cosechó por centrifugación a 5000g por 10 min y se realizó la extracción de ADN mediante la técnica de CTAB [64]. El ADN extraído fue tratado con RNAsa³ para eliminar todo el ARN y posteriormente purificado a partir de un gel de bajo punto de fusión y cuantificado en un espectrofotómetro, este ADN fue guardado a -20°C hasta su uso.

6.5 Iniciadores

A partir de la secuencia de nucleótidos del gene *lpfA* (GenBank [AE006468](#) REGION: 3827449..3827985), el cual codifica para la subunidad mayoritaria de la fimbria Lpf y basándonos en trabajos anteriores, se diseñó un juego de iniciadores a que amplifican un fragmento de 512pb del gene *lpfA* a los cuales se les llamó *lpfA F* y *lpfAR*. De igual forma se diseñaron un juego de iniciadores que flanquean el gene de *lpfA* (*lpfA-MF* y *lpfA-MR*), con los cuales se obtiene un fragmento de 540pb a partir del cepa T06-3804. Estos mismos iniciadores se utilizaron para corroborar la presencia de kanamicina dentro del gene *lpfA* en las cepas mutantes, de esta forma, si se encuentra la mutación se obtiene un fragmento de 1440pb, por el contrario, si la mutación se encuentra ausente, se obtiene el mismo fragmento de 540pb. Las especificaciones de estos iniciadores son siguientes:

² Arabinosa, Cat No. A3256-100G, SIGMA

³ RNAsa de pancreas bovino, Cat. No. 109134, Boehringer Mannheim, Alemania

Gene	Secuencia	Longitud	Tm	Contenido de GC
<i>LpfA</i> reverse	ATGGAGTTTTTAATGAAAAAGGTTGTTTTGCT	33 bases	68	27%
<i>LpfA</i> forward	TAAAAGCTTATTCGTAGGACAGGTTGAAGTCC	32 bases	68	41%
<i>lpfA-M</i> reverse	TTATTCGTAGGACAGGTTGAAGTCCACTTCTGCGTTACCG	40 bases	78	43%
<i>lpfA-M</i> forward	TTATTCGTAGGACAGGTTGAAGTCCACTTCTGCGTTACCG	46 bases	78	45%

Se diseñó un tercer juego de iniciadores para amplificar el gene de resistencia a kanamicina y en cuyos extremos se añadieron las secuencias utilizadas en los iniciadores *lpfA-M*, a estos iniciadores se les llamó *lpfA-kan* y amplifican un fragmento de 1440pb. En verde se muestra la secuencia de *lpfA-M* que flanquea la secuencia que amplifica el gene de resistencia a kanamicina, la cual esta señalada en azul. La longitud de *lpfA-kan* forward es de 58 nucleótidos, la Tm es de 85 y tiene un 47% de contenido de GC. La longitud de *lpfA-kan* reverse es de 66 nucleótidos, la Tm es de 83 y tiene un 36% de contenido de GC. Se utilizaron iniciadores de esta longitud por que se ha reportado que en el caso de *S. enteritidis* para que el plásmido pKD46 pueda llevar a cabo la recombinación homóloga de forma exitosa, los fragmentos homólogos deben de tener un tamaño de entre 50pb hasta de 1kb, sin embargo, debido a los problemas para amplificar fragmentos tan grandes se decidió que la longitud fuera de 40 nucleótidos en promedio [65]. Las secuencias de los iniciadores se muestran a continuación:

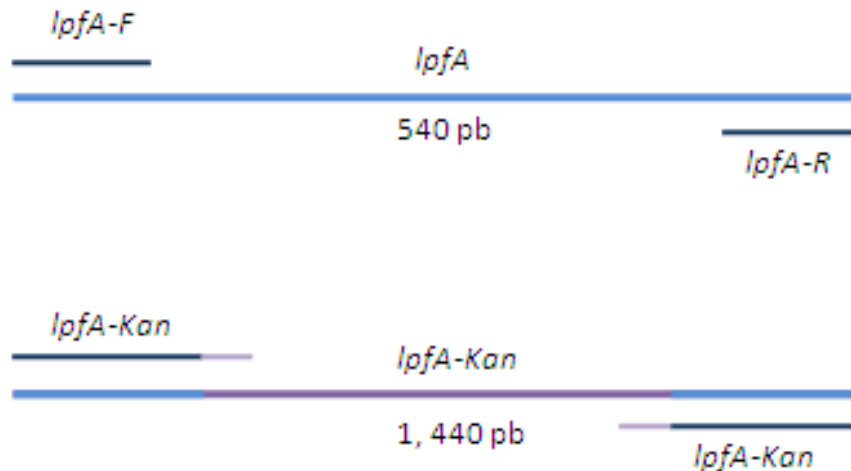
lpfA-kan

***lpfA-kan* forward**

TTATTCGTAGGACAGGTTGAAGTCCACTTCTGCGTTACCGATGAGCCATATTCAACGG

***lpfA-kan* reverse**

ATGGAGTTTTTAATGAAAAAGGTTGTTTTGCTCTGTCTGCTCTCGTTAGAAAACTCATCGAGCA



6. 6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Como templado para la amplificación del gene *lpfA*, usando los iniciadores *lpfA* y *lpfA-M* se utilizó DNA genómico de *S. enteritidis* T06-3804. Como templado para la amplificación de kanamicina usando los iniciadores *lpfA-kan* se utilizó el gene de resistencia a kanamicina del plásmido pUK4K. Las PCRs para *lpfA*, *lpfA-M* y *lpfA-kan* se realizaron de la siguiente manera: la reacción fue realizada en un volumen final de 50 μ l el cual contenía 5 μ l de solución amortiguadora para PCR 1X⁴, cada nucleótido trifosfatado⁵ a una concentración final de 1 mM, cada oligonucleótido a una concentración final de 0.2 mM, 100 ng de ADN genómico, sulfato de magnesio a una concentración final de 1 mM y 2.5 unidades de TAQ polimerasa⁴.

Para la amplificación del gene *lpfA*, los ciclos fueron los siguientes: un ciclo a 94°C por 5min (desnaturalización inicial) y 30 ciclos a 94°C por 45seg (desnaturalización), 68°C por 1min (alineamiento) y 72°C por 1min 30seg (extensión), haciendo una extensión final a 70°C por 5min.

Para la amplificación del gene *lpfA-M*, los ciclos fueron los siguientes: un ciclo a 94°C por 5min (desnaturalización inicial) y 30 ciclos a 94°C por 45seg (desnaturalización), 78°C por 1min (alineamiento) y 72°C por 1min 30seg (extensión), haciendo una extensión final a 70°C por 5min.

Para los iniciadores *lpfA-kan* los ciclos fueron los siguientes: un ciclo a 94°C por 5min (desnaturalización inicial), 5 ciclos a 94°C por 45seg (desnaturalización), 56°C por 1min (alineamiento) y 72°C por 1min 30seg (extensión), 30 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 2min y 72°C por 2min 30seg, haciendo una extensión final a 70°C por 5min.

⁴ Platinum[®] Taq DNA Polymerase, Cat No. 10966-010, Invitrogen

⁵ 100mM dNTP Set PCR Grade, Cat No. 10297-018, GIBCO, USA

Para no poner tan repetitivo lo de las condiciones podrías poner una grafica como las que marcan los termocicladores para cada una de las amplificaciones, en las que pongas las temperaturas y el número de ciclos.

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio, observados en un transiluminador de luz UV.

6.7 Extracción y electroporación del plásmido pKD46

El método utilizado fue anteriormente descrito por Datsenko *et al.* Brevemente, para realizar las mutaciones dirigidas se utilizó el plásmido pKD46 (**Figura 10**), el cual primero se extrajo de la cepa de *E. coli* K-12 mediante el método de lisis alcalina descrita por Sambrook. Al ADN plasmídico obtenido se le agregó RNAsa y posteriormente se visualizó la integridad de este en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. De igual manera, se realizó un mapa de restricción utilizando la enzima *EcoRI*. La cepa T06-3804 fue preparada para poder transformar el plásmido por electroporación ⁶ siguiendo el protocolo antes descrito por Sambrook.

Las constantes utilizadas en el electroporador fueron: 2.5 KVolts por 4.5 milisegundos

Las células fueron recuperadas en 800µl de medio SOC (el cual contiene extracto de levadura, triptona, cloruro de sodio, cloruro de potasio y agra cpb), e incubadas por 1hr a 30°C en agitación, donde posteriormente se plaquearon 100µl en agar LB con 100µg/ml de ampicilina, el medio restante fue conservado en refrigeración hasta obtener el crecimiento en las placas de agar LB y después de verificar la presencia del plásmido (Datsenko *et al* 2000).

A partir de las cajas plaqueadas se seleccionaron 10 colonias al azar, las cuales se sembraron mediante el método de aislamiento en cultivo puro en agar LB con 100µg/ml de ampicilina, una vez obtenido el crecimiento, se tomó una colonia de cada caja y se crecieron nuevamente en 3ml de caldo LB con 100µg/ml de ampicilina a 30°C en agitación por 12hrs. Se separaron 1.5ml de cada caldo y se realizó nuevamente extracción de plásmido mediante la técnica de lisis alcalina. A las cepas obtenidas se les llamó S.E. pKD46.

⁶ Electroporador 1550 Gene pulser. Bio-Rad

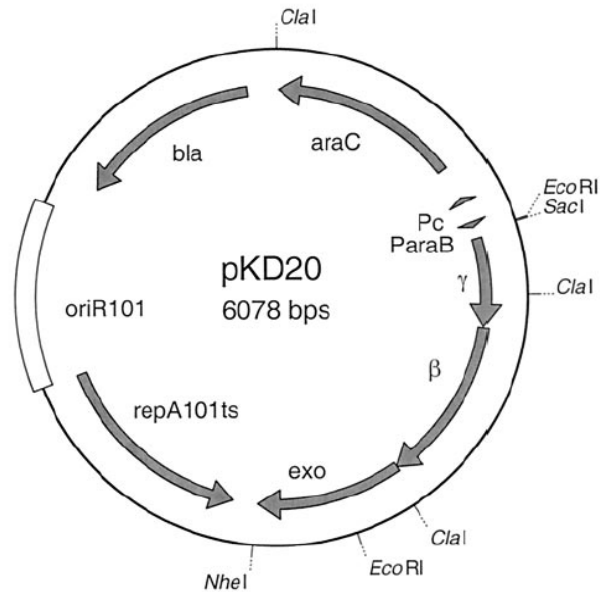


Figura 10. Mapa genético del plásmido pKD20, precursor del plásmido pKD46 (Datsenko *et al* 2000).

Secuencia de el plásmido pKD46

```

CATCGATTTATTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCTTCACAACCGGCACGGAACCTCGCTCGG
GCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACATTGCGACCGAC
GGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAGCAGCTTCGCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCAGCT
TAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGT
GCGACGCTGGCGATATCAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGTGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCG
ATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATT
TATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGCCCGGCGTTAATGATTTGCCAAACAGGTCGCTGAA
ATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATT
CATGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATAACATTCGCGAGCCTCCGGATGACGACC
GTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGGTCGGCAAACAAATTCTCGTCCCTGATT
TTTACCACCCCCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTTATTCCCAGCGGTGCGTGCATAAA
AAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTATCCCG
GCAGCAGGGGATCATTTTTCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTCAGAGAAGAAACCAATTGTC
CATATTGCATCAGACATTGCCGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCT
TATTAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATC

```

ACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAG
ATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGG**GAATTCG**
AGCTCTAAGGAGGTTATAAAAAATGGATATTAATACTGAAACTGAGATCAAGCAAAGCATTCACTAACCC
CCTTTCCTGTTTTCTAATCAGCCCGCATTTCGCGGGCGATATTTTACAGCTATTTAGGAGTTCAGCCAT
GAACGCTTATTACATTCAGGATCGTCTTGAGGCTCAGAGCTGGGCGCGTCACTACCAGCAGCTCGCCCGTG
AAGAGAAAGAGGCAGAACTGGCAGACGACATGGAAAAAGGCCTGCCCCAGCACCTGTTTGAATCGCTATG
CATCGATCATTTGCAACGCCACGGGGCCAGCAAAAAATCCATTACCCGTGCGTTTGATGACGATGTTGAGTT
TCAGGAGCGCATGGCAGAACACATCCGGTACATGGTTGAAACCATTGCTCACCACCAGGTTGATATTGATT
CAGAGGTATAAACGAATGAGTACTGCACTCGCAACGCTGGCTGGGAAGCTGGCTGAACGTGTCGGCATG
GATTCTGTGACCCACAGGAACTGATCACCCTCTCGCCAGACGGCATTAAAGGTGATGCCAGCGATGC
GCAGTTCATCGCATTACTGATCGTTGCCAACAGTACGGCCTTAATCCGTGGACGAAAGAAATTTACGCCTT
TCCTGATAAGCAGAATGGCATCGTTCGGTGGTGGGCGTTGATGGCTGGTCCCGCATCATCAATGAAAACC
AGCAGTTTGATGGCATGGACTTTGAGCAGGACAATGAATCCTGTACATGCCGGATTTACCGCAAGGACCGT
AATCATCCGATCTGCGTTACCGAATGGATGGATGAATGCCGCCGGAACCATTCAAACCTCGCGAAGGCAG
AGAAATCACGGGGCCGTGGCAGTCGCATCCCAAACGGATGTTACGTCATAAAGCCATGATTCAGTGTGCC
GTCTGGCCTTCGGATTTGCTGGTATCTATGACAAGGATGAAGCCGAGCGCATTGTGAAAATACTGCATAC
ACTGCAGAACGTCAGCCGGAACGCGACATCACTCCGTTAACGATGAAACCATGCAGGAGATTAACACTCT
GCTGATCGCCCTGGATAAAACATGGGATGACGACTTATTGCCGCTCTGTTCCAGATATTTGCGCCGACAT
TCGTGCATCGTCAGAACTGACACAGGCCGAAGCAGTAAAAGCTCTTGGATTCTGAAACAGAAAGCCGCAG
AGCAGAAGGTGGCAGCATGACACCGGACATTATCCTGCAGCGTACCGGGATCGATGTGAGAGCTGTGAA
CAGGGGGATGATGCGTGGCACAAATTACGGCTCGGCGTCATCACCGCTTCAGAAGTTCACAACGTGATAGC
AAAACCCCGCTCCGGAAGAAGTGGCCTGACATGAAAATGTCTACTTCCACACCCTGCTTGCTGAGGTTTG
CACCGGTGTGGCTCCGGAAGTTAACGCTAAAGCACTGGCCTGGGGAAAACAGTACGAGAACGACGCCAGA
ACCTGTTTGAATCACTTCCGGCGTGAATGTTACTGAATCCCCGATCATCTATCGCGACGAAAGTATGCGT
ACCGCTGCTCTCCCGATGGTTTATGCAGTGACGGCAACGGCCTTGAACGAAATGCCCGTTTACCTCCCGG
GATTTTATGAAGTCCGGCTCGGTGGTTTCGAGGCCATAAAGTCAGCTTACATGGCCAGGTGCAGTACAG
CATGTGGGTGACGCGAAAAAATGCCTGGTACTTTGCCAACTATGACCCGCGTATGAAGCGTGAAGGCCTGC
ATTATGTCGTGATTGAGCGGGATGAAAAGTACATGGCGAGTTTTGACGAGATCGTGCCGGAGTTCATCGAA
AAAATGGACGAGGCACTGGCTGAAATTGGTTTTGATTTGGGGAGCAATGGCGATGACGCATCCTCACGAT
AATATCCGGGTAGGCGCAATCACTTTCGTCTACTCCGTTACAAAGCGAGGCTGGGTATTTCCCGCCTTTCT
GTTATCCGAAATCCACTGAAAGCACAGCGGCTGGCTGAGGAGATAAATAATAAACGAGGGGGCTGTATGCA
CAAAGCATCTTCTGTTGAGTTAAGAACGAGTATCGAGATGGCACATAGCCTTGCTCAAATTGGAATCAGGTT

TGTGCCAATACCAGTAGAAACAGACGAAGAATCCATGGGTATGGACAGTTTTCCCTTTGATATGTAACGGT
GAACAGTTGTTCTACTTTTGTGGTTAGTCTTGATGCTTCACTGATAGATACAAGAGCCATAAGAACCCTCAGA
TCCTCCGTATTTAGCCAGTATGTTCTCTAGTGTGGTTCGTTGTTTTGCGTGAGCCATGAGAACGAACCATT
GAGATCATACTTACTTTGCATGTCACTCAAAAATTTGCCTCAAACTGGTGAGCTGAATTTTTGCAGTTAAA
GCATCGTGTAGTGTTTTTCTTAGTCCGTTACGTAGGTAGGAATCTGATGTAATGGTTGTTGGTATTTTGTAC
CATTCATTTTATCTGGTTGTTCTCAAGTTCGGTTACGAGATCCATTTGTCTATCTAGTTCAACTTGGAAAATC
AACGTATCAGTCGGGCGCCTCGCTTATCAACCACCAATTCATATTGCTGTAAGTGTAAATCTTTACTTA
TTGGTTTCAAACCCATTGGTTAAGCCTTTAAACTCATGGTAGTTATTTTCAAGCATTAAACATGAACTTAAA
TTCATCAAGGCTAATCTCTATATTTGCCTTGTGAGTTTTCTTTGTGTTAGTTCTTTAATAACCACTCATAAAT
CCTCATAGAGTATTTGTTTTCAAAGACTTAAACATGTTCCAGATTATTTTTATGAATTTTTTAACTGGAAAA
GATAAGGCAATATCTCTTCACTAAAACTAATTCTAATTTTTCGCTTGAGAACTTGGCATAGTTTGTCCACTG
GAAAATCTCAAAGCCTTAAACCAAAGGATTCTGATTCCACAGTTCTCGTCATCAGCTCTCTGGTTGCTTTA
GCTAATACACCATAAGCATTTCCTACTGATGTTTCATCATCTGAGCGTATTGGTTATAAGTGAACGATACCG
TCCGTTCTTCCTTGTAGGGTTTTCAATCGTGGGGTTGAGTAGTCCACACAGCATAAAATTAGCTTGGTTTC
ATGCTCCGTTAAGTCATAGCGACTAATCGCTAGTTCATTTGCTTTGAAAACAATAATTAGACATACATCTC
AATTGGTCTAGGTGATTTAATCACTATAACCAATTGAGATGGGCTAGTCAATGATAATTACTAGTCTTTTTCC
TTTGAGTTGTGGGTATCTGTAAATTCTGCTAGACCTTTGCTGGAAACTTGTAATTTCTGCTAGACCCTCTGT
AAATTCGCTAGACCTTTGGTGTTTTTTTTGTTTATATTCAAGTGGTTATAATTTATAGAATAAAGAAAGAAT
AAAAAAGATAAAAAGAATAGATCCCAGCCCTGTGTATAACTCACTACTTTAGTCAGTTCCGCAGTATTACA
AAAGGATGTCGAAACGCTGTTTGTCTCTACAAAACAGACCTTAAACCCCTAAAGGCTTAAGTAGCACCC
TCGCAAGCTCGTTGCGGCCGCAATCGGGCAAATCGCTGAATATTCCTTTTGTCTCCGACCATCAGGCACCT
GAGTCGCTGTCTTTTTCGTGACATTCAGTTCGCTGCGCTCACGGCTCTGGCAGTGAATGGGGGTAAATGGC
ACTACAGGCGCCTTTTATGGATTCATGCAAGGAAACTACCCATAATACAAGAAAAGCCCGTCACGGGCTTCT
CAGGGCGTTTTATGGCGGGTCTGCTATGTGGTGCTATCTGACTTTTTGCTGTTTCAGCAGTTCCTGCCCTCTGA
TTTTCCAGTCTGACCACTTCGGATTATCCCGTGACAGGTCATTGAGACTGGCTAATGCACCCAGTAAGGCAG
CGGTATCATCAACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTA
TCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATC
CATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGC
AATGATACCGGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCG
AGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAA
GTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGT

TTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAA
AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTA
TGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAAC
CAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCG
CGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCT
TACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTAC
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAA
ATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT
ACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG

GenBank AY048746.1 El tamaño del plásmido es de 6327pb, las letras en rojo muestran el sitio de restricción de la enzima *EcoRI*.

6.8 Electroporación del producto de amplificación de los iniciadores *lpfA*-kan

Las cepas S.E. pKD46 se sembraron en 500 ml de caldo LB con ampicilina 100µg/ml, agregando 2 diferentes concentraciones de arabinosa: 10mM y 100mM para inducir la expresión de los genes *exo*, β y γ .

Se incubaron a 30°C en agitación hasta llegar a una $DO_{600nm} = 0.6$. Una vez obtenida la OD deseada, se siguió el protocolo descrito por Sambrook para preparar dichas células para introducirles mediante electroporación los productos de la PCR *lpfA*-kan.

Una vez preparadas las células electrocompetentes, se electroporó el fragmento de *lpfA*-kan usando las constantes antes descritas. Las células se recuperaron en un volumen de 800µl de medio SOC, se incubaron a 30°C por 3 horas y finalmente se dejaron a temperatura ambiente 16 horas. Pasadas las 16hrs se separaron 500µl de cada cultivo y se plaquearon en agar LB con kanamicina (100µg/ml), estas se incubaron a 43°C por 12 horas, el medio restante se guardó en refrigeración hasta obtener crecimiento en las placas.

Ya obtenido el crecimiento, se seleccionaron clonas al azar, las cuales se sembraron por duplicado en agar LB con kanamicina 100µg/ml y en agar LB con ampicilina 100µg/ml, se incubaron 12 horas a 37°C. Si las cajas con ampicilina mostraban crecimiento, se hizo una resiembra en caldo LB en

agitación a 43°C por 12 horas. Transcurrido el tiempo, se tomó una azada de cada caldo y por duplicado se sembró mediante la técnica de aislamiento en cultivo puro, en agar LB con kanamicina 100µg/ml y en agar LB con ampicilina 100µg/ml. En el caso de que las cajas con ampicilina siguieran presentando desarrollo, las cepas fueron resembradas en caldo LB con concentraciones crecientes de SDS iniciando en 2%, aumentando 1.5% en cada tubo para llegar a una concentración final de 6.5%, dichos caldos fueron incubados a 43°C por 12 horas.

Cuando las cepas mostraron resistencia a ampicilina aún después del crecimiento previo en caldo LB con SDS, se realizó extracción de plásmido por lisis alcalina, corroborando la presencia de este. La extracción de ADN se realizó por el método de CTAB y se realizaron las PCRs con los iniciadores *lpfA* y *lpfA-M*, lo cual confirma la presencia o ausencia de la mutación. Las cepas mutantes en el gene *lpfA* obtenidas fueron llamadas S.E-kan.

6.9 Inoculación en embrión de pollo

Todas las cepas fueron inoculadas en embrión de pollo para evaluar su patogenicidad. Se usaron 100 embriones pollo Libres de Patógenos Específicos ⁷ de siete días de edad. Se incubaron 20 embriones de pollo por cada cepa por la vía del Saco Vitelino con 0.1ml del inóculo bacteriano (1×10^4 bacterias/ml), de igual forma se inocularon 20 embiones con 0.1ml de SSF estéril como control, dejando como controles negativos 10 embriones sin inocular. Una vez inoculados se incubaron a 37°C y se examinaron 2 veces al día cada 24 horas en un ovoscopio, descartando los muertos siguiendo los siguientes criterios: ausencia de movimiento del embrión, ausencia de venas marginales, licuefacción de la yema. Transcurridas 48hrs se sacrificaron el resto de los embriones.

Todos los embriones se abrieron y se evaluó su integridad física. Se tomaron 100µl del líquido amniótico, los cuales se agregaron a 900µl de SSF estéril, se realizaron diluciones décuples seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) para el conteo de UFC, dependiendo de la cepa, fue el medio en el que se sembraron, siendo los siguientes:

⁷ Embrión de pollo (Huevo Fértil Alpes-II), Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A.

Cepa	Medio
T06-3804	Agar LB
<i>E. coli</i> ATCC25052	Agar LB
S.E. pKD46	Agar LB con ampicilina
S.E-kan	Agar LB con kanamicina
SSF	Agar LB
Control negativo	Agar LB

Una vez obtenido el aislamiento, se sembraron en agar Mac Conkey por la técnica de aislamiento en cultivo puro y se realizaron pruebas bioquímicas para verificar la autenticidad de la cepa. Este ensayo fue realizado por triplicado.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de las cepas y Cinéticas de crecimiento bacteriano

Se obtuvo crecimiento tanto en agar LB como en Mac Conkey de todas las cepas de campo de *S. enteritidis*, identificando a todas como lactosa negativas. Los resultados de las pruebas bioquímicas elaboradas en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM y se compararon en la tabla de identificación del manual Bergeys (**Tabla 1**).

Tabla 1. Identificación de las cepas de *S. enteritidis* por crecimiento en Mac Conkey y pruebas bioquímicas. En la primera fila con las iniciales ID se muestra la identificación reportada por

CEPA	McC	VB	Oxidasa	TSI	Urea	SIM	Citrato	Lisina	Arabinosa	ONPG
ID	L (-)	L (-)	-	2,3,4	-	+/-/+	-	+	+	-
C-6925-06	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	+	+	-
T06-3804	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	+	+	-
6674-06	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	+	+	-
C-7884-06	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	+	+	-
C-7704-06	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	+	+	-
C-7739-06	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	+	+	+

Cowan para *Salmonella*. En las siguientes filas se muestran las diferentes cepas de campo.

McC = Mac Conkey, VB = Verde Brillante, L = lactosa, - = negativo, + = positivo

Los resultados de las pruebas bioquímicas corresponden con los resultados previamente descritos para *Salmonella sp*, con excepción de la cepa C-7739-06, lo cual indica que posiblemente se trate del género *Arizona hundi* ya que anteriormente estaba considerado dentro del género *Salmonella*, pero, debido a algunas discrepancias en los resultados de las pruebas bioquímicas, se decidió separarlas de estas y formar un nuevo género.

Se realizaron cinéticas de crecimiento de la cepa de campo T06-3804 de *S. enteritidis* la cual se usó a lo largo de este estudio. Con los datos obtenidos se puede observar que a 37°C la bacteria entra en fase logarítmica temprana a las 4hrs, una fase logarítmica tardía de las 7 a las 10hrs. Y una fase estacionaria a las 11hrs (**Figura 11**).

Cuando *Salmonella* crece a 30°C se observa que la fase logarítmica temprana inicia a las 5 hrs, la logarítmica tardía de las 8 a las 10 hrs y la fase estacionaria comienza a las 11 hrs (**Figura 11**). En la **figura 12** la curva muestra la media geométrica de los conteos de UFC.

De igual manera, se realizaron cinéticas de crecimiento con arabinosa usando concentraciones de 10 mM y 100 mM, utilizando una temperatura de 30°C. Con los datos obtenidos se puede observar la la arabinosa no inhibe el crecimiento de *S. enteritidis*, y que se comporta de forma muy similar cuando crece con las 2 diferentes concentraciones de arabinosa. En ambos casos la fase logarítmica temprana se presenta a las 5 hrs, la fase logarítmica tardía de 8 a 10 hrs la fase estacionaria a las 11 hrs (**Figura 11**).

En la cinética de crecimiento con arabinosa también se realizaron mediciones de OD600 y conteos de UFC, en cada hora de crecimiento. En la **figura 12** se observa la curva la cual muestra la media geométrica de los conteos de UFC, este ensayo se realizó por duplicado.

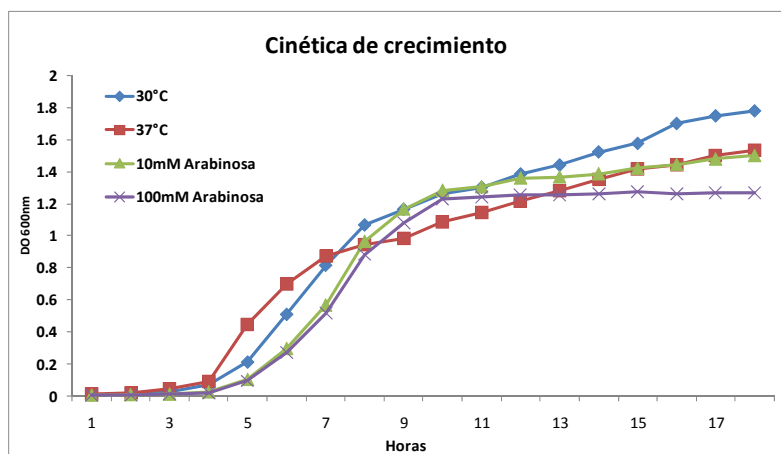


Figura 11. Cinética de crecimiento de la cepa de *S. enteritidis* T06-3804. Los cultivos se siguieron durante 18 horas en caldo de cultivo LB y LB adicionado con arabinosa a una concentración de 10mM y 100mM. Los datos muestran la media geométrica. Estos experimentos se realizaron por duplicado.

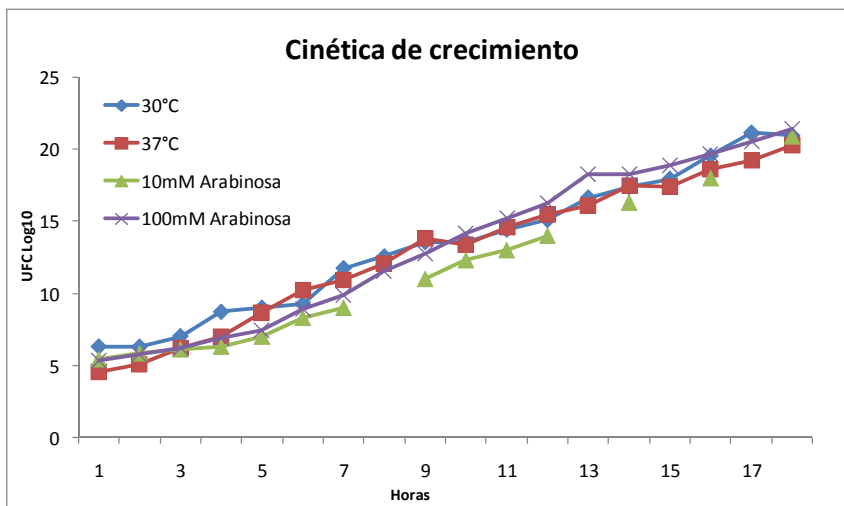


Figura 12. Cinética de crecimiento de la cepa de *S. enteritidis* T06-3804. Cada punto representa la media geométrica de las UFC en cada lectura. Estos experimentos se realizaron por duplicado.

7.2 Extracción de ADN

A la cepa de campo T06-3804, identificada previamente como *S. enteritidis*, se le realizó la extracción de ADN mediante el método de CTAB. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (**Figura 13**). Asimismo, se cuantificó la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro, obteniendo en promedio la cantidad de 36 500 ng/ml por vial obtenido.

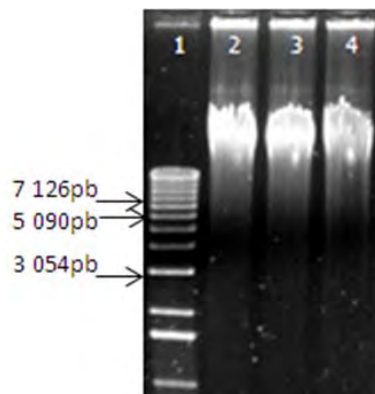


Figura 13. ADN de *S. enteritidis*. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los productos de extracción de ADN de la cepa T06-3804 de *S. enteritidis*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb Extensión Ladder, carriles 2 a 4: ADN de *S. enteritidis*.

7.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la PCR se utilizaron los iniciadores previamente descritos en este trabajo que amplifica el gene *lpfA* y el cassette de resistencia a kanamicina flanqueado por aproximadamente 40pb del gene *lpfA*. Una vez que se obtuvieron las reacciones de PCR, estas se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. El producto de amplificación observado en la cepa de campo de *S. enteritidis* usando los iniciadores *lpfA*, fue de aproximadamente 512pb (**Figura 14**). En el caso de los iniciadores *lpfA*-km amplifican un fragmento de 1440pb, mientras que, los iniciadores *lpfA*-M en el caso de que se encuentra la mutación amplifican de igual manera un fragmento de 1440pb. (**Figura 15**).

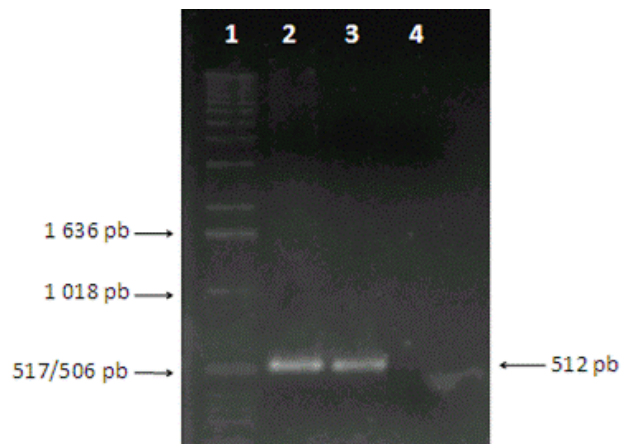


Figura 14. Amplificación de *lpfA* por PCR. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los productos de amplificación obtenido a partir de ADN de la cepa T06-3804. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb Extensión Ladder, carriles 2 y 3: producto de 512pb que corresponde a *lpfA*, carril 4 control negativo.

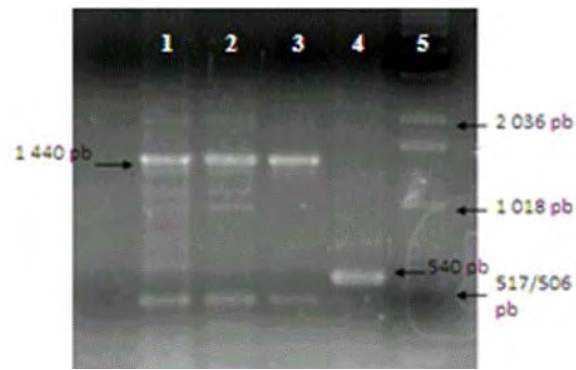


Figura 15. Amplificación del gene de resistencia a Kanamicina. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los productos de amplificación del cassette de resistencia a kanamicina, el gene *lpfA* con la inserción de kanamicina y el gene *lpfA* no mutado. Carriles 1 y2: amplificación del gene de resistencia a kanamicina flanqueado por *lpfA*; Carril 3: amplificación del gene *lpfA* mutante; Carril 4: amplificación del gene *lpfA* no mutante con los iniciadores *lpfA*-M a partir de la cepa T06-3804, donde se observa un producto de 540pb; Carril 5: marcador de peso molecular de 1 kb Extensión Ladder.

7.4 Extracción y electroporación del plásmido pKD46

A las cepas de *E. coli* K-12 se les realizó extracción de plásmido mediante el método de lisis alcalina. Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 1% (**Figura 16**). Una vez obtenido el plásmido pKD46, para corroborar la integridad de este se realizó un mapa de restricción utilizando la enzima *EcoRI*, obteniendo 2 fragmentos, el primero de 4578pb y un segundo de 1500pb (**Figura 17**).

Después de haber obtenido el plásmido y de haber transformado la cepa T06-3840 con este, se obtuvieron aproximadamente 150 clonas por caja, las cuales todas mostraron resistencia a ampicilina y a todas se les observó la presencia del plásmido pKD46. A la cepa se le llamó S.E. pKD46.

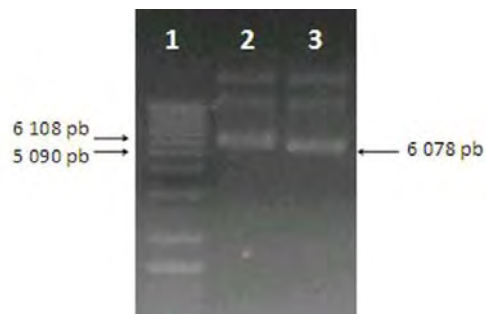


Figura 16. Plásmido pKD46. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los productos de extracción del plásmido pKD46. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb Extensión Ladder; Carriles 2 y 3: plásmido pKD46, el cual tiene un peso molecular aproximado de 6078pb.

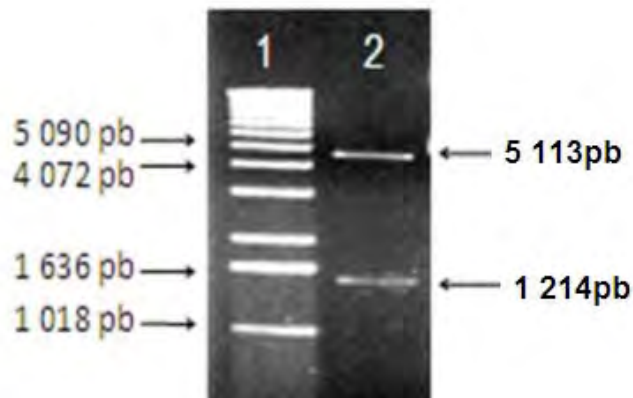


Figura 17. Perfil de restricción del plásmido pKD46. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb Extensión Ladder; Carril 2: plásmido pKD46 digerido con *EcoRI*, donde se observa una banda de 5113pb y una de 1214pb, lo cual en conjunto corresponden al plásmido pKD46 el cual tiene un tamaño de de 6329pb.

7.5 Electroporación del la construcción *lpfA*-kam en *S. enteritidis* pKD46 y cultivo para eliminar el plásmido

La cepa S.E. pKD46 transformada con los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores *lpfA*-kan fue sembrada en agar LB, donde se obtuvieron aproximadamente 100 clonas por caja, todas mostraron resistencia a kanamicina y siguieron mostrando resistencia a ampicilina, aún después de ser crecidas a 42°C en agitación en caldo LB a una concentración de SDS de 5%. Las cepas no mostraron desarrollo en caldo LB con SDS al 6.5%.

Al realizarles extracción de plásmido todas mostraron aún tenerlo, de igual forma, todas las cepas amplificaron un fragmento de 1440pb con los iniciadores *lpfA*-kan, sin embargo la utilizar los iniciadores *lpfA* no se obtuvo un amplicon en todas las colonias analizadas(**Figura 18**); solo las positivas fueron seleccionadas analizadas para identificar aquellas en las que se pudo amplificar un fragmento de 1440pb correspondiente al gene *lpfA* con el cassette de resistencia a kanamicina. (**Figura 19**), Se seleccionó una de las clonas que demostró ser la mutante y para fines de este proyecto, a esta cepa se le llamó S.E-kan (**Figura 20**).

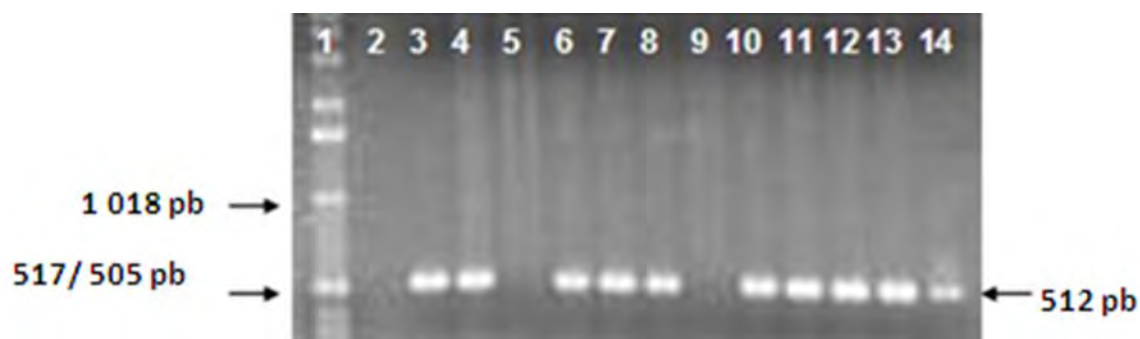


Figura 18. Selección de mutantes por PCR. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb Extensión Ladder; Carriles 2 al 13: productos de amplificación con los iniciadores *lpfA*-M, donde se observa amplificado un producto de 540pb, excepto las cepas 2, 5 y 9, en las cuales no se observa amplificación; Carril 14: control positivo de la cepa T06-3804, donde se observa de igual manera un producto amplificado de 512pb.

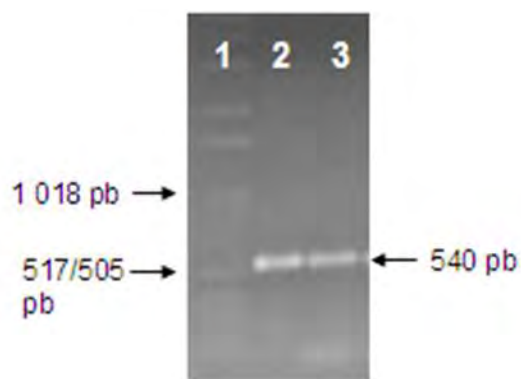


Figura 19. Selección de mutantes por PCR utilizando los iniciadores *lpfA*-M. Gel de agarosa al 1%. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb Extensión Ladder; Carriles 2 y 3: productos de amplificación con los iniciadores *lpfA*-M, donde se observa amplificado un producto de 540pb.

7.6 Secuencia de la cepa mutante y de la cepa silvestre

GTCATCATATAGGGCGATTGGGCCCTCTAGTGCATGCTCGAGCGGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGA
ATTCGCCCTTATGGAGTTTTTAATGAAAAAGGTTGTTTTTGTCTGTCTGCTCTCGTTAGAAAACTCATCGA
GCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAA
TGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCGGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTC
GTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAG
TGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCAT
TACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCTGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAA
ATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAG
CGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGG

La secuencia obtenida corresponde al cassette de Kanamicina el cual esta interrumpiendo el gene *lpfA*

ATCAACCTTGGTCCCGAGCTCGGTCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTTTATTTCGTA
GGACTGGTTGAAGTCCACTTCTGCGTTACCGATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAGGCCGC
GATTAAATCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGGGCAATCAGGT
GCCAACATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAATTGTTTCTGAAACATGGCAAAAGTAGCG
TTGCCATGAAGGTTAAATGAAAAGGTCCAACAAAAAGGGGGAAAGAATTTTTCTCCCCCCCCACCCAAC
ATTTTATCCCCCTCCCGCCGAGAATGGGACTCCCCCTGCCATCCCCCGGAAAAAAAATTCCCGTTAAAAA
AAAACTCTGATTCCGGGGGAAAAAATTGTTGTTGCGCTGGGGGGGTCCCTGCCCCCGGTGCATCCATTCT
GTTTGGTATTTGCCTTTTAAAAACCAATCGGTATTTTTTTTCCCCCTCCAGCCAATCCAAAAA
AGTTTTGGTTAATCCGAGGATTTTTTAAGAACAACGGTATGGGCGGGGGCTGTTAAACCAGTCCGGAAA
AAAAATGAAAAAC

La secuencia obtenida corresponde al gene *lpfA* de la cepa de campo *S. enteritidis* T06-3804.

7.7 Ensayos de patogenicidad en embrión de pollo

Para evaluar el efecto de la mutación de *lpfA* en la virulencia de *S. enteritidis*, fueron inoculados en embrión de pollo SPF. Basándonos en estudios anteriores así como en ensayos previos la dosis

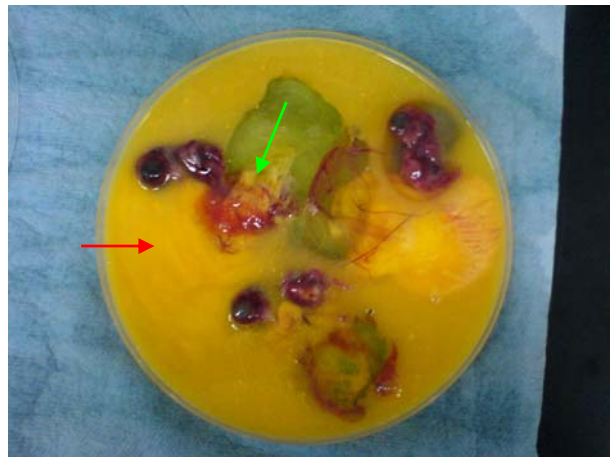
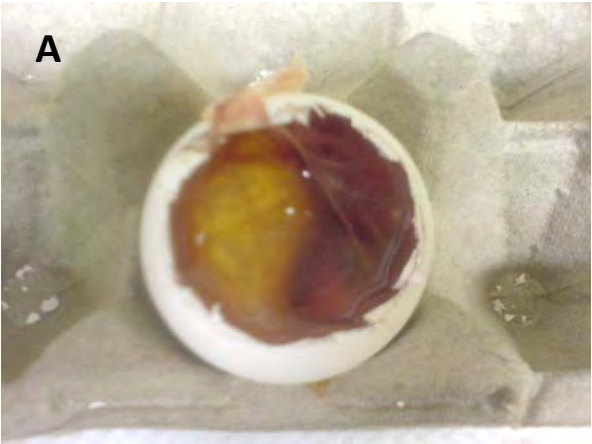
empleada la dosis empleada fue de 1×10^4 bacterias por embrión. Como controles se utilizaron las cepas S.E. pKD46, S.E-kan, así como la cepa tipo de *E. coli* ATCC 25025. Los embriones fueron examinados a las 24hrs retirando los muertos para su evaluación y cultivo de bacterias recuperadas en agar LB para los embriones inoculados con la cepa T06-3804 y *E. coli* ATCC 25052, LB con ampicilina 100µg/ml para la cepa S.E. pKD46 y LB con kanamicina 100µg/ml para la cepa S.E-kan. Y a las 48hrs para retirar y separar los embriones muertos y para sacrificar a los vivos para la evaluación de todos ellos sembrando líquido alantoideo en los medios antes descritos.

Los embriones de pollo mostraron las siguientes lesiones: hemorragias, líquido amniótico turbio y licuefacción de la yema.

Las cepas que produjeron más daño fueron la T06-3804, S.E. pKD46 y *E. coli* ATCC 52025, en el caso de S.E-kan se pudieron observar algunas lesiones como congestión en la yema y algunas hemorragias, sin embargo, estos embriones se mostraron muy similares a los inoculados con SSF (**Tabla 2 y Figura 20**). Los análisis estadísticos demostraron que no hay diferencia estadística en los tratamientos, es decir, la cepa mutante no muestra diferencia en la virulencia al ser comparada con la cepa de campo, lo cual es congruente con las publicaciones anteriores, donde se observa que al mutar una sola fimbria, son pocos los casos donde la virulencia se ve disminuída. En el caso de la fimbria LPF, es en el modelo murino donde se observan difecencias significativas. Sin embargo, la reciente descripción del genoma de *S. enteritidis* demuestra que tanto *S. enteritidis* como *S. gallinarum* y *S. pullorum* presentan un operón que se ve involucrado en la adhesión bacteriana en el tracto gastrointestinal de aves, por lo tanto, se podría suponer que este operón no es esencial en la virulencia ni adhesión de la bacteria en aves.

Tabla 2. Embriones muertos a las 24 y a las 48 horas

Cepa	24 horas	48 horas
<i>E.coli</i>	76.6%	93.3%
<i>S. enteritidis</i> T06-3804	85%	98%
S.E. pKD46	83.3%	96.6%
S.E-kan	41.6%	66.6%
SSF y sin inocluar	1%	1%



B

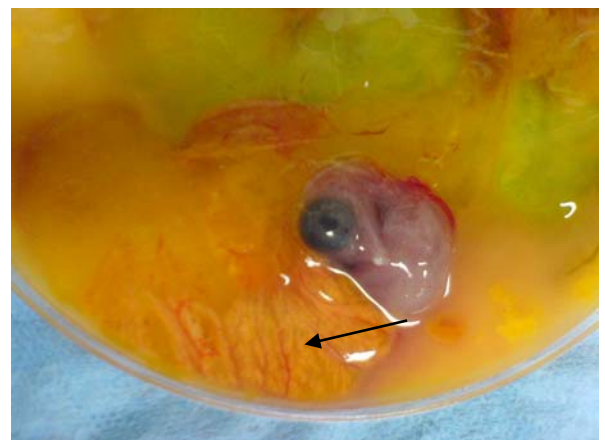
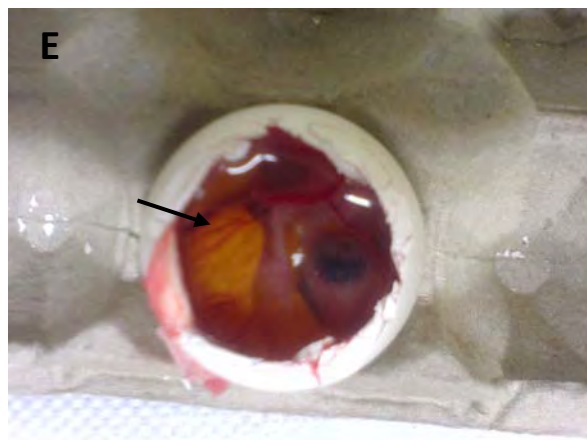
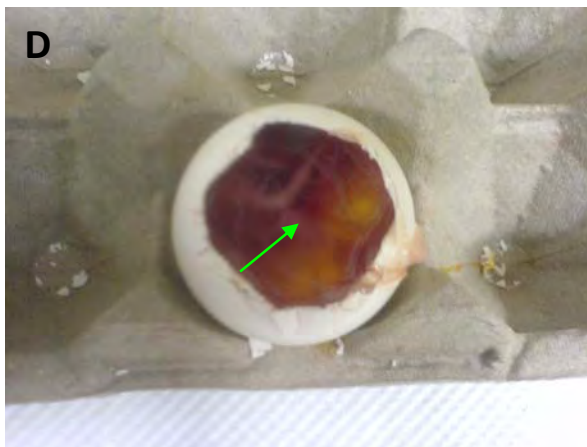


Figura 20. Evaluación de virulencia en embrión de pollo. Embriones de pollo inoculados con las distintas cepas. A) Embrión de pollo inoculado con la cepa de *S. enteritidis* T06-3804; B) Embrión de pollo inoculado con la cepa *E. coli* ATCC 25052; C) Embrión de pollo inoculado con la cepa S.E pKD46; D) Embrión de pollo inoculado con la cepa S.E-kan; E) Embrión de pollo viable. Las flechas rojas indican liquefacción de la yema, las flechas verdes indican hemorragias y las flechas negras indican la circulación normal de vasos sanguíneos.

El número de UFC's para todas las cepas inoculadas fue en promedio $1 \times 10^{3.5}$ UFC/ml, el número de UFC recuperadas para todas las cepas a partir del líquido amniótico de embriones muertos fue de $1 \times 10^{11.5}$ UFC/ml a las 24 horas y de $1 \times 10^{14.91}$ a las 48 horas, para todas las cepas las cantidades recuperadas fueron muy similares.

De todos los embriones se logró recuperar las cepas inoculadas, las cuales fueron sembradas en agar MacConkey, Verde Brillante y posteriormente identificadas mediante la Bioquímica corta. Los resultados de los embriones muertos en los distintos tiempos se muestran en la **tabla 3**.

Tabla 3. Identificación de las cepas de *S. enteritidis* inoculadas a los embriones de pollos.

McC = Mac Conkey, VB = Verde Brillante, L = lactosa, Amp = ampicilina,

Cepa	McC	VB	Oxidasa	TSI	Urea	SIM	Citrato	Amp	Km
T06-3804	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	S	S
S.E. pKD46	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	R	S
S.E-kan	L (-)	L (-)	-	2	-	+/-/+	-	R	R
<i>E. coli</i> ATCC 25052	L (+)	L (+)	-	3	-	-/+/+	-	S	S

Kan = kanamicina, S = sensible, R = resistente, - = negativo, + = positivo

Los Resultados obtenidos muestran que todas las cepas recuperadas de los embriones corresponden a las inicialmente inoculadas.

8. DISCUSIÓN

Salmonella enteritidis es uno de los serotipos más comunes a nivel mundial. A partir de la década de los 80 este serotipo emergió como una de las causas más comunes de infecciones gastrointestinales en humanos. La infección es mediante el consumo de alimento contaminado, incluyendo el huevo de mesa, el cual ha sido considerado como uno de los principales problemas en el control de la calidad de alimentos.

Las aves infectadas no presentan signos y esto permite que la bacteria pueda persistir en el hospedero, colonizando el tracto gastrointestinal así como, el reproductivo.

La infección sistémica por *S. enteritidis* es iniciada por la colonización y penetración del microorganismo a través de tejidos u órganos, esto es conocido como un primer paso en el establecimiento de una enfermedad. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que las adhesinas fimbriales juegan un papel importante en el contacto bacteriano con los órganos blanco, permitiendo la invasión de estos tanto *in vivo* como *in vitro*, de esta forma se puede considerar realmente a la adhesión bacteriana como el primer paso para la colonización e invasión.

Se ha demostrado que las fimbrias bacterianas tienen afinidad por tejidos o células específicas, las cuales se pueden encontrar en regiones anatómicas específicas, por lo que se puede asumir de esta forma, como es que ciertas fimbrias se pueden asociar a enfermedades específicas. En algunos casos, la mutación de una de ellas puede disminuir su patogenicidad, pero también pueden incrementarla, como en el caso de la fimbria Fim 1, que al mutarla la dosis letal disminuye en un 50%. En el modelo murino, deleciones individuales en los operones *lpf*, *pef*, *fim* y *csg* de *S. typhimurium* muestran únicamente una virulencia moderada, sin embargo, al mutar los 4 operones fimbriales, la dosis letal aumenta en un 26%. Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, al tener órganos blanco, ciertas fimbrias se pueden vincular a infecciones en sitios específicos o en algunos casos inclusive se puede observar cierta especificidad por especie, por ejemplo, recientemente se describió que las fimbrias *fim*, *csg*, *lpf* y *sef* en *S. enteritidis* no juegan ningún papel importante en la colonización del tracto gastrointestinal en gallinas, sin embargo, aún no está claro si estas fimbrias puedan estar involucradas en la persistencia de la bacteria en el huevo. Un paso importante es saber que fimbrias son expresadas en los diferentes órganos, o cuales se expresan en animales para la producción, para que, por medio de mutaciones dirigidas,

se puedan producir cepas atenuadas que permitan proteger a los animales para el consumo o animales para producción de infecciones por estos microorganismos ya que estos animales y sus subproductos pueden ser posibles factores de transmisión de la enfermedad al humano [31].

Anteriormente, el genoma de *S. typhimurium* había mostrado la presencia de 13 operones fimbriales, los cuales le ayudan a la bacteria a adherirse en distintos órganos, observándose así diferentes cuadros clínicos, dependiendo del sitio de colonización; de igual manera, diversos estudios han sugerido que estas fimbrias ayudan a la colonización de diferentes especies animales, observándose en estos una mayor cantidad de anticuerpos contra solo algunas fimbrias en específico. En cepas de *S. enteritidis* aisladas de diversas especies, se ha demostrado que estas sólo expresan unas cuantas fimbrias suponiendo que esto es debido a la especificidad y afinidad celular de estas. Por ejemplo, en el caso de *S. typhimurium* en ratones, los 13 operones fimbriales se encuentran involucrados en la virulencia. En el caso de los cerdos, la virulencia esta principalmente dada por la fimbria *saf*. Por otro lado, la fimbria tipo 1 así como el curli están involucrados en la contaminación del huevo. En el genoma de *S. enteritidis* también se encuentran 13 operones fimbriales, y un operón *peg*, el cual también se encuentra presente en *S. gallinarum* y *S. paratyphi*, este operón posee entre un 60% y un 70% de homología con el operón *stc* de *S. typhimurium*, encontrándose relativamente en la misma posición que este. Los genomas de las distintas serovariedades de *Salmonella sp.* han mostrado tener una gran homología, donde no únicamente se encuentran los mismos operones fimbriales, si no que prácticamente se encuentran en la misma región genética pudiendo concluir con esto que las funciones de las fimbrias son conservadas en diferentes especies [3, 31, 66].

La fimbria LPF esta formada por 5 subunidades, una subunidad mayoritaria, una subunidad minoritaria, una chaperona, un acomodador y una adhesina, esta última es la que se ha sugerido que le confiere la especificidad a la fimbria. En este trabajo se evaluó la patogenicidad de una cepa de *S. enteritidis* de campo aislada a partir de un caso clínico. Mediante recombinación homóloga se mutó *lpfA*, uno de los genes que se encuentra codificado en este operón. *LpfA* codifica para la subunidad mayoritaria, la cual funciona como una base para la formación del resto de la fimbria.

La amplificación de *lpfA* fue obtenida a partir de la cepa de campo T06-3804, la cual usamos como referencia y control en los experimentos a lo largo de este trabajo. Los iniciadores fueron diseñados a partir de la secuencia ya descrita de *S. typhimurium* LT2, diseñando los primeros para que amplificaran solo el interior del gene, los segundos fueron diseñados flanqueando el gene

lpfA, esto fue para que una vez obtenida la cepa mutante, estos iniciadores fueran completamente homólogos a la secuencia mutada, evitando así, cualquier error en amplificaciones futuras e inclusive en experimentos posteriores como la complementación de dicha cepa.

Debido a que en reportes anteriores se ha mencionado la dificultad para expresar la fimbria Lpf *in vitro*, se decidió utilizar animales para la experimentación para poder determinar de manera rápida si se ve disminuida la patogenia de la cepa mutante. Sin embargo, como se menciona anteriormente, algunos reportes mencionan que la expresión de Lpf se ve favorecida tanto en el modelo murino como en asas ligadas de intestino de bovino, no en el modelo aviar. En el caso de el modelo aviar, se ha reportado que Fim es la fimbria que se expresa mayormente.

Para llevar a cabo la recombinación homóloga, se requirió de una previa inducción de la cepa que contenía el plásmido pKD46 (S.E. pKD46) [67], se tuvieron que realizar cinéticas de crecimiento para la cepa conteniendo este plásmido para determinar que las concentraciones de arabinosa utilizadas para la inducción del sistema de recombinasa contenido en el plásmido no sean tóxicas para *S. enteritidis*. Luego de encontrar que la arabinosa no es tóxica para esta cepa concluimos que este plásmido podría ser utilizado para realizar mutaciones dirigidas en ésta para intentar atenuar aún más la cepa.

Sin embargo, nunca se logró perder el plásmido pDK46, aún después de la incubación en medio LB con SDS a un alto porcentaje (5%), por lo que es necesario hacer ensayos para determinar la manera de eliminarlo y así poder utilizarlo en posteriores mutaciones dirigidas a diferentes genes u operones.

Contrario a lo que describe Datsenko, en el caso de *S. enteritidis*, las mutaciones no son tan eficientes, obteniendo un total de aproximadamente 150 UFC's por electroporación y se tuvieron que analizar más de 50 clonas antes de encontrar alguna mutante, lo cual se repitió en diferentes ocasiones, encontrando que mientras más bases homólogas se tengan, la eficiencia de la recombinación será mayor, permitiendo la recuperación de mas clonas mutantes, lo que concuerda con lo previamente descrito por Shangwey [65], quien menciona que para que se lleve a cabo exitosamente una recombinación homóloga, son necesarias de 100 pb a 1kb, lo cual sería necesario evaluar para determinar la relación entre la longitud de la secuencia y la eficiencia del plásmido, así como la eficiencia de electroporación de fragmentos lineales tan grandes.

Esta técnica tiene la ventaja de permitir la recuperación de un alto número de cepas mutantes ya que tiene una eficiencia muy alta, de igual manera, las mutaciones son dirigidas, es poco probable que la recombinación se lleve a cabo en algún sitio no deseado, por lo que la mayoría de las clonas recuperadas son cepas mutantes en el gene deseado. La mayoría de los plásmidos utilizados para la recombinación homóloga requieren de una gran cantidad de nucleótidos para que no existan errores al integrarse al DNA blanco, esto tiene la desventaja de tener que generar productos de PCR muy grandes, así como, de tener que ligar fragmentos entre si, por lo que la cantidad de DNA requerido es elevada. Utilizando el plásmido pKD46, no se requiere gran cantidad de DNA, de igual forma, el DNA que hará la recombinación homóloga es lineal, evitando los pasos de ligar, ya que las proteínas Gam, Exo y Bet protegen el DNA lineal de la degradación y permite la recombinación homóloga.

Los ensayos en embriones de pollo permitieron observar que la patogenicidad de la cepa mutante S.E-kan se ve disminuida, sin embargo, es necesario realizar estudios en cultivo celular y en aves adultas para poder determinar que esta reducción en la patogenicidad también está presente en animales adultos. De igual forma, el cultivo celular permitirá conocer la capacidad de adhesión de esta cepa mutante y compararla con la cepa silvestre, para experimentos de persistencia y así poder evaluar a largo plazo el papel de esta fimbria, es necesario el uso de animales de laboratorio, mediante los cuales, se podrá evaluar la capacidad de colonización en distintos órganos, así como, la capacidad de diseminación por heces.

9. CONCLUSIONES

1. Se identificó el gene *lpfA* en *S. enteritidis* el cual codifica para la subunidad mayoritaria de la fimbria Lpf.
2. Con el plásmido pKD46 se pudo llevar a cabo una recombinación homóloga de forma exitosa, pese a no ser tan eficiente, este plásmido podría ser utilizado para futuras mutaciones dirigidas en esta especie bacteriana.
3. Se obtuvo exitosamente una cepa de *S. enteritidis* mutante en *lpfA*
4. Con base a los datos obtenidos en los ensayos de patogenicidad en embrión de pollo, se puede sugerir que la mutación de *lpfA* disminuye la patogenicidad de *S. enteritidis* T06-3804.

1. REFERENCIAS

1. Coburn, B., G.A. Grassl, and B.B. Finlay, *Salmonella, the host and disease: a brief review*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(2): p. 112-8.
2. Baumler, A.J., et al., *Evolution of host adaptation in Salmonella enterica*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4579-87.
3. McClelland, M., et al., *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 852-6.
4. Forshell, L.P. and M. Wierup, *Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products*. Rev Sci Tech, 2006. **25**(2): p. 541-54.
5. Darwin, K.H. and V.L. Miller, *Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(3): p. 405-28.
6. Olsen, S.J., et al., *The changing epidemiology of salmonella: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997*. J Infect Dis, 2001. **183**(5): p. 753-61.
7. Baumler, A.J., B.M. Hargis, and R.M. Tsois, *Tracing the origins of Salmonella outbreaks*. Science, 2000. **287**(5450): p. 50-2.
8. Guard-Petter, J., *The chicken, the egg and Salmonella enteritidis*. Environ Microbiol, 2001. **3**(7): p. 421-30.
9. Ward, L.R., et al., *Salmonella enteritidis epidemic*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1753-4; author reply 1755-6.
10. Patrick, M.E., et al., *Salmonella enteritidis infections, United States, 1985-1999*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(1): p. 1-7.
11. Riemann, H., P. Kass, and D. Cliver, *Salmonella enteritidis epidemic*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1754-5; author reply 1755-6.
12. Mizumoto, N., et al., *Specific adhesion and invasion of Salmonella Enteritidis in the vagina of laying hens*. Vet Microbiol, 2005. **111**(1-2): p. 99-105.
13. Rabsch, W., H. Tschape, and A.J. Baumler, *Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems*. Microbes Infect, 2001. **3**(3): p. 237-47.
14. Guard-Petter, J., et al., *On-farm monitoring of mouse-invasive Salmonella enterica serovar enteritidis and a model for its association with the production of contaminated eggs*. Appl Environ Microbiol, 1997. **63**(4): p. 1588-93.

15. Rabsch, W., et al., *Competitive exclusion of Salmonella enteritidis by Salmonella gallinarum in poultry*. Emerg Infect Dis, 2000. **6**(5): p. 443-8.
16. Zaidi, M.B., et al., *Nontyphoidal Salmonella from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(1): p. 21-8.
17. Crump, J.A., P.M. Griffin, and F.J. Angulo, *Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(7): p. 859-65.
18. Mead, P.S., et al., *Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg*. Emerg Infect Dis, 1999. **5**(6): p. 841-2.
19. Van Hemert, S., et al., *Immunological and gene expression responses to a Salmonella infection in the chicken intestine*. Vet Res, 2007. **38**(1): p. 51-63.
20. Kingsley, R.A. and A.J. Baumler, *Host adaptation and the emergence of infectious disease: the Salmonella paradigm*. Mol Microbiol, 2000. **36**(5): p. 1006-14.
21. Clavijo, R.I., et al., *Identification of genes associated with survival of Salmonella enterica serovar Enteritidis in chicken egg albumen*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(2): p. 1055-64.
22. *Salmonella surveillance*. CDR (Lond Engl Wkly), 1991. **1**(28): p. 123.
23. Riley, L.W., et al., *Importance of host factors in human salmonellosis caused by multiresistant strains of Salmonella*. J Infect Dis, 1984. **149**(6): p. 878-83.
24. Turnbull, P.C., *Food poisoning with special reference to Salmonella -- its epidemiology, pathogenesis and control*. Clin Gastroenterol, 1979. **8**(3): p. 663-714.
25. Giannella, R.A., S.A. Broitman, and N. Zamcheck, *Salmonella enteritis. I. Role of reduced gastric secretion in pathogenesis*. Am J Dig Dis, 1971. **16**(11): p. 1000-6.
26. Keller, L.H., et al., *Salmonella enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens*. Infect Immun, 1995. **63**(7): p. 2443-9.
27. Keller, L.H., et al., *Invasion of chicken reproductive tissues and forming eggs is not unique to Salmonella enteritidis*. Avian Dis, 1997. **41**(3): p. 535-9.
28. Suzuki, S., *Pathogenicity of Salmonella enteritidis in poultry*. Int J Food Microbiol, 1994. **21**(1-2): p. 89-105.
29. Henderson, S.C., D.I. Bounous, and M.D. Lee, *Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis*. Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3580-6.
30. Knox, W.A., et al., *A milk-borne outbreak of food poisoning due to Salmonella heidelberg*. J Hyg (Lond), 1963. **61**: p. 175-85.

31. Clayton, D.J., et al., *Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by Salmonella enterica serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus.* BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 228.
32. Jepson, M.A. and M.A. Clark, *The role of M cells in Salmonella infection.* Microbes Infect, 2001. **3**(14-15): p. 1183-90.
33. Guo, A., et al., *Adhesin-dependent binding and uptake of Salmonella enterica serovar Typhimurium by dendritic cells.* Microbiology, 2007. **153**(Pt 4): p. 1059-69.
34. Shea, J.E., et al., *Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2593-7.
35. Tsolis, R.M., et al., *Identification of a putative Salmonella enterica serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis.* Infect Immun, 1999. **67**(12): p. 6385-93.
36. Morgan, E., et al., *Identification of host-specific colonization factors of Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Mol Microbiol, 2004. **54**(4): p. 994-1010.
37. Weening, E.H., et al., *The Salmonella enterica serotype Typhimurium lpf, bcf, stb, stc, std, and sth fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice.* Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3358-66.
38. Soto, G.E. and S.J. Hultgren, *Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly.* J Bacteriol, 1999. **181**(4): p. 1059-71.
39. Tatsuno, I., et al., *The lpf gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic Escherichia coli or virulence of Citrobacter rodentium.* Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 265-72.
40. Baumler, A.J., R.M. Tsolis, and F. Heffron, *The lpf fimbrial operon mediates adhesion of Salmonella typhimurium to murine Peyer's patches.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 279-83.
41. Fitzhenry, R., et al., *Long polar fimbriae and tissue tropism in Escherichia coli O157:H7.* Microbes Infect, 2006. **8**(7): p. 1741-9.
42. Baumler, A.J., et al., *Synergistic effect of mutations in invA and lpfC on the ability of Salmonella typhimurium to cause murine typhoid.* Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2254-9.
43. Esteves, C.L., B.D. Jones, and S. Clegg, *Biofilm formation by Salmonella enterica serovar Typhimurium and Escherichia coli on epithelial cells following mixed inoculations.* Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 5198-203.

44. van der Velden, A.W., et al., *Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of Salmonella typhimurium in mice*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2803-8.
45. Baumbler, A.J., et al., *The pef fimbrial operon of Salmonella typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 61-8.
46. Galan, J.E., *Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 53-86.
47. Patel, J.C. and J.E. Galan, *Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella--all in the name of entry*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(1): p. 10-5.
48. Hansen-Wester, I. and M. Hensel, *Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems*. Microbes Infect, 2001. **3**(7): p. 549-59.
49. Galan, J.E. and P. Cossart, *Host-pathogen interactions: a diversity of themes, a variety of molecular machines*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(1): p. 1-3.
50. Groisman, E.A. and H. Ochman, *How Salmonella became a pathogen*. Trends Microbiol, 1997. **5**(9): p. 343-9.
51. Gossert, A.D., et al., *NMR assignment of the E. coli type 1 pilus protein FimF*. J Biomol NMR, 2007. **38**(2): p. 195.
52. Sauer, F.G., et al., *Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(5): p. 548-56.
53. Sauer, F.G., et al., *PapD-like chaperones and pilus biogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(1): p. 27-34.
54. Sauer, F.G., et al., *Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation*. Cell, 2002. **111**(4): p. 543-51.
55. Barnhart, M.M., et al., *PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7709-14.
56. Jones, C.H., et al., *FimC is a periplasmic PapD-like chaperone that directs assembly of type 1 pili in bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8397-401.
57. Vetsch, M., P. Sebbel, and R. Glockshuber, *Chaperone-independent folding of type 1 pilus domains*. J Mol Biol, 2002. **322**(4): p. 827-40.
58. Sauer, F.G., et al., *Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis*. Science, 1999. **285**(5430): p. 1058-61.

59. Verger, D., et al., *Crystal structure of the P pilus rod subunit PapA*. PLoS Pathog, 2007. **3**(5): p. e73.
60. Remaut, H., et al., *Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted beta strand displacement mechanism*. Mol Cell, 2006. **22**(6): p. 831-42.
61. Verger, D., et al., *Molecular mechanism of P pilus termination in uropathogenic Escherichia coli*. EMBO Rep, 2006. **7**(12): p. 1228-32.
62. Vetsch, M., et al., *Mechanism of fibre assembly through the chaperone-usher pathway*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 734-8.
63. Rose, R.J., et al., *Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly revealed in atomic detail by molecular dynamics*. J Mol Biol, 2008. **375**(4): p. 908-19.
64. Baumler, A.J., et al., *Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of Salmonella serotypes*. J Bacteriol, 1997. **179**(2): p. 317-22.
65. Lu, S., P.B. Killoran, and L.W. Riley, *Association of Salmonella enterica serovar enteritidis yafD with resistance to chicken egg albumen*. Infect Immun, 2003. **71**(12): p. 6734-41.
66. Parkhill, J., et al., *Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 848-52.
67. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.