



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE OmpA EN VESÍCULAS DE  
MEMBRANA EXTERNA DE *Salmonella* Enteritidis CULTIVADA  
BAJO DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**JONATHAN CHRISTOPHER LOZANO OLIVO**



Asesores:

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez  
M. en C. Ina Marcela Figueroa Ochoa

MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIAS**

A mi padre, Ramiro Lozano Nuevo, por todo el apoyo, paciencia, enseñanza y amor que me ha brindado durante toda mi existencia.

A mi madre, Rosa María Olivo Flores, por todo el apoyo, amor, comprensión de mis preocupaciones y hacerme ver que la vida es fácil.

A mis hermanos Fernando Omar Lozano Olivo y Evelyn Lozano Olivo quienes me han apoyado en todo momento y siempre han deseado lo mejor para mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM por la excelencia que tiene como universidad y que siempre he admirado.

A la FMVZ por ser parte mi identidad y por haberme concedido las herramientas para mi desarrollo profesional.

A la M. en C. Inda Marcela Figueroa Ochoa, por estar siempre al pendiente de mí durante el proceso de desarrollo de este trabajo. También por esa paciencia tan grande y por todos los conocimientos que me compartió. La admiro, respeto y quiero mucho.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, por haberme enseñado a trabajar de forma correcta y siempre a poner atención “en el detalle”.

A la MVZ María Antonieta Mojica Sánchez, por apoyarme y ayudarme en muchas circunstancias. Gracias a ella, comencé a conocer el área de bacteriología y biología molecular.

A Julio Manuel Méndez Alemán, por haberme incursionado en el aprendizaje de la biología molecular cuando ingresé al LMM.

A Julia Aidé Hernández Pineda, por haberme apoyado de forma importante cuando inicié mis experimentos de la tesis ya que me compartió muchos de sus conocimientos y siempre fue muy gentil y paciente.

A aquellos compañeros, académicos y doctores del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, quienes me aportaron una enseñanza, me dieron un consejo, un momento grato, su amistad o una sonrisa.

A la MVZ Claudia Angélica Olvera Rodríguez, por haberme apoyado siempre durante mi estancia en la FMVZ.

Al Dr. Juan Antonio Montaña Hirose, a quien admiro mucho, le tengo una gran estima, me apoyó en momentos difíciles y me enseñó a tomar decisiones para alcanzar mis sueños.

Al Ingeniero José Luis Pablos Hack, a quien admiro y me aportó muchísimo en la elaboración de Diseños Experimentales. Así puede realizar el análisis de los resultados de forma profesional.

A Florence Nathania Tjahjono, quien ha pasado a formar parte de mi existencia y me ha enseñado a vivir la vida intensamente. Así mismo, a la Embajada de Indonesia quien me ha abierto sus puertas y han hecho del proceso de esta tesis algo muy ameno.

# CONTENIDO

<i>RESUMEN</i>	1
<i>INTRODUCCIÓN</i>	2
1.1 Salmonelosis	2
1.2 Características del género <i>Salmonella</i>	2
1.2.1 Agente etiológico	2
1.2.2 Cultivo bacteriano	3
1.2.3 Metabolismo	3
1.2.4 Clasificación y nomenclatura	3
1.3 Epidemiología de la salmonelosis	5
1.3.1 Epidemiología de <i>Salmonella</i> Enteritidis	6
1.4 Importancia económica	6
1.5 Paratifoidea aviar	8
1.6 Patogénesis molecular	9
1.7 Contaminación del huevo con <i>Salmonella</i>	13
1.8 Medidas de control de la enfermedad	14
1.9 Antecedentes	15
1.10 OmpA	17
1.11 Vesículas de membrana externa	18
1.11.1 Composición de las vesículas de membrana externa	19
1.11.3 Liberación de vesículas de membrana externa	20
1.11.4 Condiciones de estrés en la liberación de vesículas	20
1.11.5 Funciones de las vesículas de membrana externa	21
1.11.6 Usos de las vesículas de membrana externa	22
<i>JUSTIFICACIÓN</i>	23
<i>HIPÓTESIS</i>	24
<i>OBJETIVOS</i>	24
4.1 OBJETIVO GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	25
5.1 Cultivos y cepas	26
5.2 Diseño experimental	26
5.3 Cinética de crecimiento bacteriano y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC)	28
5.4 Extracción de proteínas de membrana externa	29

5.5 Concentración de vesículas de membrana externa	30
5.6 Cuantificación de proteínas	30
5.7 Cuantificación de KDO	31
5.8 Electroforesis desnaturalizante	31
5.9 Tinción con azul de Coomassie	32
5.10 Immunoblotting	32
5.11 Microscopía electrónica	33
5.12 Comparación de OmpA en perfiles electroforéticos	33
5.13 Método estadístico	34
<i>RESULTADOS</i>	35
6.1 Cinética de crecimiento bacteriano	35
6.2 Conteo de unidades formadoras de colonia	37
6.3 Evaluación de OmpA en condiciones diferentes de osmolaridad y temperatura	38
6.4 Vesículas de membrana externa	40
6.5 Evaluación de OmpA a partir de OMP de SE cultivada en presencia de suero de ave SPF	42
6.6 Evaluación de OmpA a partir de OMV de SE cultivada en presencia de suero de ave SPF	44
<i>DISCUSIÓN</i>	46
<i>CONCLUSIONES</i>	52
<i>PROSPECTIVA</i>	53
<i>ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO</i>	54
<i>ANEXO 2. SOLUCIONES</i>	56
<i>REFERENCIAS</i>	61

## Índice de figuras

Figura 1. Invasión de <i>Salmonella</i>	13
Figura 2. Vías de contaminación del huevo	14
Figura 3. Gel de electroforesis de proteínas de membrana externa de SG	16
Figura 4. Metodología general	25
Figura 5. Cinética de crecimiento de SE con tratamientos de osmolaridad y temperatura de 37°C	36
Figura 6. Cinética de crecimiento de SE con tratamientos de osmolaridad y temperatura de 42°C	36
Figura 7. Conteo de UFC de SE con tratamientos de osmolaridad a 37°C	37
Figura 8. Comparación de patrones electroforéticos de proteínas de membrana externa de SE	39
Figura 9. Western blot de OmpA a partir de proteínas de membrana externa	39
Figura 10. Vesículas de membrana externa de SE	41
Figura 11. Cuantificación de proteínas por método colorimétrico (bradford)	41
Figura 12. Cuantificación de KDO por método colorimétrico (ácido tiobarbitúrico)	42
Figura 13. Comparación de perfiles electroforesis de OMP de SE	43
Figura 14. Western blot de OmpA a partir de proteínas de membrana externa	44
Figura 15. Western blot de OmpA a partir de vesículas de membrana externa	45

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Tratamientos de la primera y segunda etapa experimental.	27
Cuadro 2. Tratamientos de la tercera etapa experimental.	28

## RESUMEN

JONATHAN CHRISTOPHER LOZANO OLIVO. Evaluación de la liberación de OmpA en vesículas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis cultivada bajo diferentes condiciones ambientales. (Bajo la dirección de: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez y M. en C. Inda Marcela Figueroa Ochoa).

La salmonelosis es una de las enfermedades más comunes de origen alimenticio y su distribución es mundial. Así mismo, es uno de los principales problemas de salud pública. En la mayor parte de los países donde hay vigilancia de *Salmonella*, las dos serovariedades notificadas con mayor frecuencia son *S. Typhimurium* (ST) y *S. Enteritidis* (SE), tanto en aves como en humanos. Estos hechos conllevan a tomar medidas con base en la prevención. La estrategia propuesta consiste en la caracterización de OmpA, una proteína mayoritaria de membrana externa, presumiblemente liberada en vesículas de membrana externa de SE. Previamente, se demostró que una OMP (outer membrane protein) de 30 kDa en *Salmonella* Gallinarum (SG) disminuye su detección cuando es cultivada en caldo nutritivo adicionado con suero obtenido de aves libres de patógenos específicos (SPF). La secuenciación del extremo amino de esta proteína demostró una identidad del 100% con OmpA de *S. Typhimurium*. En *E. coli* se demostró que OmpA se recupera a partir del sobrenadante del medio de cultivo en presencia de suero de humano con uso de perlas magnéticas. En SG se detectó a OmpA a partir de sobrenadantes con presencia de suero de gallina SPF. El objetivo del presente trabajo fue identificar las condiciones ambientales (osmolaridad, temperatura, suero de gallina) en las que exista una detección diferente de OmpA de SE contenida en OMPs y OMV (outer membrane vesicles) para lo cual se cultivó a la bacteria en medios CNA, CNA + 0.3 M NaCl y CNA + 20% sacarosa en combinación de las temperaturas 37°C y 42°C. Los mismos tratamientos se utilizaron para identificar la condición ambiental de mayor liberación de vesículas. Los últimos ensayos se realizaron con CNA + 30% de suero de gallina SPS a 42°C. Los resultados se analizaron con análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey. Diferentes condiciones ambientales de osmolaridad y temperatura no modificaron la detección de la proteína OmpA de SE. La producción de OMV de SE se modifica por diferentes condiciones de osmolaridad pero no de temperatura. CNA es el tratamiento donde hay mayor liberación de estas estructuras. La presencia de suero de ave SPF al 30% en el medio de cultivo modifica la detección de OmpA en OMPs de SE. Con la metodología utilizada, no se logró identificar a OmpA en OMV de SE cultivada en presencia de suero de ave SPF al 30%.



# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad de distribución mundial. Tiene importancia en salud pública debido a que es una zoonosis y es la segunda con mayor reporte anualmente. También tiene importancia económica debido a que afecta a diferentes especies, entre ellas, a animales de producción.<sup>1,2,3</sup> La ruta más común de la transmisión se lleva a cabo por la vía fecal oral por medio de la ingestión de alimentos o agua contaminada. La enfermedad puede manifestarse, tanto en animales y el humano, como una infección gastrointestinal o una infección sistémica. La primera forma aparece como un cuadro de enteritis de gravedad media a grave, mientras que la forma sistémica puede comprometer la vida. Además, existe la posibilidad de que ese hospedero permanezca como portador asintomático, lo que permite hacer aislamientos hasta por un año y esto representa uno de los principales reservorios de la bacteria.<sup>3,4,5,6,7</sup>

## 1.2 Características del género *Salmonella*

### 1.2.1 Agente etiológico

*Salmonella* es una enterobacteria, bacilo Gram negativo, de 0.7 a 1.5 x 2 a 5 µm, anaerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo, no forma esporas, y la mayoría de las serovariedades tienen movilidad debido a la presencia de flagelos peritricos<sup>8,9</sup>

## 1.2.2 Cultivo bacteriano

La bacteria se puede aislar a partir de heces, sangre, órganos, alimentos y agua. Los medios de cultivo que se utilizan para su aislamiento son selectivos, diferenciales y de enriquecimiento. Los primeros son agar MacConkey, agar citrato desoxicolato, agar Salmonella-Shigella, agar verde brillante y medio Hektoen. Los medios de enriquecimiento son caldo selenito, caldo tetracionato, medio Müller modificado y medio Rappaport-Vasidialis.<sup>8</sup>

## 1.2.3 Metabolismo

La mayoría de las bacterias del género *Salmonella* presentan un conjunto de características metabólicas comunes. En medio hierro triple azúcar (TSI) produce ácido sulfhídrico, gas y desdobla la glucosa, pero no la lactosa ni la sacarosa. Utilizan el citrato como única fuente de carbono, no produce ureasa ni triptofanasa por lo que no forma anillo de indol en el medio ácido sulfhídrico-indol-motilidad (SIM). Tiene actividad arginina hidrolasa y lisina descarboxilasa. Fermenta arabinosa, maltosa, manitol, ramnosa, sorbitol, trehalosa, y la xilosa.<sup>8,10</sup>

## 1.2.4 Clasificación y nomenclatura

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *enterica* y *bongori*. A su vez, *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*. La mayoría de la serovariedades descritas

pertenece a la subespecie *enterica* y se han registrado más de 2600 de acuerdo al sistema de Kuaffman y White, el cual considera a los antígenos somático (O) y flagelar (H) para la determinación antigénica. El antígeno O incluye a antígenos mayores, los cuales clasifican en grupos a las cepas, y a los antígenos menores, los cuales ayudan a clasificar a la serovariedad y se escriben con números. Cuando se escribe la fórmula antigénica se inicia con el nombre de la subespecie (en cursiva); la serovariedad con la primera letra en mayúscula y sin cursiva. En la fórmula antigénica, el antígeno somático se indica con número, después el antígeno flagelar con letras más guion, letras y números o con un signo negativo si se trata de una serovariedad monofásica, bifásica o inmóvil, respectivamente. Un ejemplo de fórmula antigénica completa es *Salmonella enterica* sub. *enterica* serovariedad Enteritidis (1,9,12 g,m:–). Después de citar el nombre completo por primera vez, se puede mencionar solamente el nombre del género y de la serovariedad (*Salmonella* Enteritidis) o simplemente, escribir las primeras dos letras (SE).<sup>11</sup>

Las serovariedades de *Salmonella* también se pueden clasificar con base en los hospederos que infectan y su presentación clínica. Las serovariedades adaptadas (específicas de especie) afectan sólo a un hospedero y provocan cuadros septicémicos en adultos, como *Salmonella entérica* serovariedad Typhi en humanos y *Salmonella enterica* serovariedad Gallinarum en aves. Las serovariedades no restrictivas de especie están asociadas principalmente a cuadros sistémicos en un hospedero pero pueden causar enfermedad en un número limitado de otras especies, como ocurre con *Salmonella Cholerasuis*, en cerdos y *S. Dublin* en bovinos. Finalmente, las serovariedades ubicuas pueden

infectar a varios hospederos, de las cuales, las principales son *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium.<sup>1,3</sup>

### **1. 3 Epidemiología de la salmonelosis**

En humanos, la salmonelosis está relacionada frecuentemente con el consumo de pollo y huevo. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) reportó 73,627 casos de salmonelosis en el 2013.<sup>3</sup> En Estados Unidos se registran 42,000 casos cada año, sin embargo, se estima un total de 1.4 millones debido a subnotificación<sup>6</sup> y en México, en el 2014, se notificaron 139,417 casos.<sup>12</sup> En la avicultura, el origen de los aislamientos es principalmente a partir de muestras de huevo y aves.<sup>13</sup> También, existen aislamientos a partir de los ingredientes utilizados en la elaboración de alimentos para animales de producción.<sup>3,13</sup> En el 2013, la EFSA notificó que el 1.13% de las parvadas reproductoras (*Gallus gallus*) fueron positivos a *Salmonella*; en las gallinas productoras de huevo, se detectó 2.58% de animales positivos a *Salmonella* y un 3.68% en pollo de engorda, previo al sacrificio.<sup>3</sup> En México, no existen informes de la enfermedad en animales. La Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar (actualmente derogada), se enfocó a las biovariedades *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* debido a las pérdidas económicas<sup>14</sup>. En el 2002, se declaró al territorio nacional libre de la pulorosis aviar<sup>14</sup>; respecto a la tifoidea aviar, el último foco publicado corresponde al de Tulancingo de Bravo, Hidalgo reportado en el periodo de octubre de 2011 al 3 de enero de 2012.<sup>15</sup>

### **1.3.1 Epidemiología de *Salmonella* Enteritidis**

La EFSA reporta que SE es la principal serovariedad más común en el humano con un 43% y menciona que el 22% de los casos de salmonelosis están relacionados con el consumo de huevo y subproductos.<sup>3,16</sup> En el 2014, El FoodNet, componente principal de enfermedades transmitidas por alimentos del Programa de Infecciones Emergentes de los Centros de Control de Enfermedades (CDC), notificó 7,452 casos de salmonelosis, por cada 100,000 habitantes, relacionados con el consumo de alimentos en EUA, de los cuales, SE es la serovariedad más aislada.<sup>5</sup> En un estudio en México, de 1972 a 1999, se obtuvieron 24,394 cepas de *Salmonella* de origen humano y no humano y se identificaron 199 serovariedades, siendo los más frecuente *S. Typhimurium* (20.4%) y *S. Enteritidis* (18.3%). En el mismo trabajo, con un perfil anual, SE desplazó a ST a partir del 1991.<sup>17</sup> Finalmente, la EFSA indica en el 2013 que SE es la serovariedad más identificada en las poblaciones de producción avícola, con porcentajes de 0.2%, 0.78% y 0.12% en parvadas reproductoras, gallinas ponedoras y pollo engorda (previo al sacrificio), respetivamente.<sup>3</sup>

### **1.4 Importancia económica**

La salmonelosis tiene importancia económica a nivel mundial. En Europa se estima una pérdida económica de tres billones de euros al año mientras que en Estados Unidos se calcula un gasto de 3,666 millones de dólares en costos médicos directos y productividad, lo que caracteriza a la enfermedad como la

mayor gasto de las ETAs.<sup>18,19</sup> En el caso particular de SE, existen pocos reportes que describan los costos de produce la enfermedad, tanto en humanos como en la avicultura. En Inglaterra se indicó en el 2011 que los costos promedio producidos por SE son de £993.<sup>20</sup> La Universidad de California hizo mención de los costos estimados para el programa de control de SE donde se consideró una población de 23 millones de gallinas ponedoras. Conceptos de pruebas de diagnóstico, limpieza, desinfección, control de roedores, vacunación, mortalidad, etc. resultaron en un costo estimado de 2,520,693 dólares.<sup>21</sup> En la avicultura de México no existen informes sobre las pérdidas ocasionadas por la enfermedad; sin embargo, es importante su consideración debido a que se trata de una industria de carácter mundial. México ocupa el primer lugar en consumo de huevo fresco, sexto lugar en producción de huevo y séptimo en producción de pollo a nivel mundial. Además, el sector avícola representa el 63% de la producción pecuaria nacional. En el 2014, se registró una producción de huevo de 2,571,270 ton y 3,025,113 ton de pollo. El consumo per cápita es de 25.6 kg de pollo y 22.2 kg de huevo. Los estados con mayor producción de huevo son Jalisco, Puebla, Sonora, La Laguna, Yucatán, Sinaloa, Nuevo León y Guanajuato. Los estados con mayor producción de pollo son Aguascalientes y Querétaro, le siguen La región de la Comarca Lagunera y Veracruz, Jalisco, luego Puebla, Yucatán y Chiapas con el mismo porcentaje, después Estado de México, Guanajuato, Sinaloa, Nuevo León, San Luis Potosí e Hidalgo, Morelos y Michoacán. Finalmente, la avicultura genera 1,220,000 empleos directos e indirectos.<sup>22</sup>

## 1.5 Paratifoidea aviar

Paratifoidea aviar es el nombre que recibe la enfermedad provocada por SE en aves. De forma general, las estirpes pesadas, como la Sussex, son más susceptibles que las ligeras, como la White Leghorn.<sup>23</sup> La descripción de la enfermedad se realiza de acuerdo a la edad de las aves:

- Aves jóvenes: Comprende principalmente a aves que se encuentran en un estado de crianza, en el que el pollito no tiene completa capacidad de modular su temperatura (de dos a tres semanas de edad) y a aves en desarrollo que va desde el final de la crianza hasta que acaba de emplumar (tres a cuatro semanas de edad). Las aves jóvenes son las más afectadas con una mortalidad alta, de 20% hasta 90% y se presenta principalmente durante las primeras semanas de vida. Esto sugiere que SE no lidia de forma óptima con el sistema inmune maduro. La mortalidad depende de varios factores como la cepa bacteriana, fagotipo, concentración del inóculo, la edad del hospedero, etc.<sup>24</sup> Los signos clínicos son somnolencia, ojos cerrados, plumas erizadas y agrupamiento cerca de las fuentes de calor. Además, se presenta diarrea, deshidratación y empastamiento cloacal. Macroscópicamente, se pueden observar focos necróticos en el hígado, un remanente de saco vitelino endurecido, enteritis catarral y hemorrágica y los ciegos pueden estar llenos con exudado caseoso.<sup>25</sup>
- Gallinas: es el ave sexualmente madura (pollona) y que rompe postura (5% de producción de huevo). Este evento sucede entre las 17-18 semanas de

edad. La enfermedad generalmente no produce signos aparentes más que la disminución de producción de huevo. Un estudio demuestra que la inoculación de SE por vía oral disminuye la postura casi a la mitad e inoculada por vía intravenosa, la reduce aún más.<sup>26</sup> Durante la necropsia se puede encontrar peritonitis, necrosis multifocal en hígado y riñones, ovarios deformados, encogidos, pálidos, congestionados, folículos malformados y huevos de cáscara blanda.<sup>24</sup>

## 1.6 Patogénesis molecular

La salmonelosis se transmite de forma horizontal por medio de la ingestión de alimentos o agua contaminados o por la vía vertical que se presenta cuando la bacteria pasa a la progenie y sucede principalmente en aves. Cuando la bacteria ingresa al tubo gastrointestinal, resiste el pH ácido del estómago. Se ha demostrado que la tolerancia a la acidez está involucrada con los genes *fur* y *atp*, que codifican para la proteína reguladora de unión a  $Fe^{2+}$  y para la ATPasa translocadora de protones dependiente de  $Mg^{2+}$ , respectivamente. Mutantes de alguno de estos genes tienen una supervivencia menor del 0.001% a las 4 h en un cultivo con un pH de 3.3.<sup>27</sup> Por otra parte, la muerte celular, provocada por un pH bajo, se reduce cuando la bacteria se encuentra suspendida en un vehículo lipofílico.<sup>28</sup> Esta tolerancia permite que las células bacterianas lleguen viables al lumen intestinal, donde la bacteria se encuentra en un medio ligeramente alcalino y con elevada osmolaridad lo que produce una inducción de genes. El proceso de invasión inicia cuando *Salmonella* se adhiere a la zona apical de las células



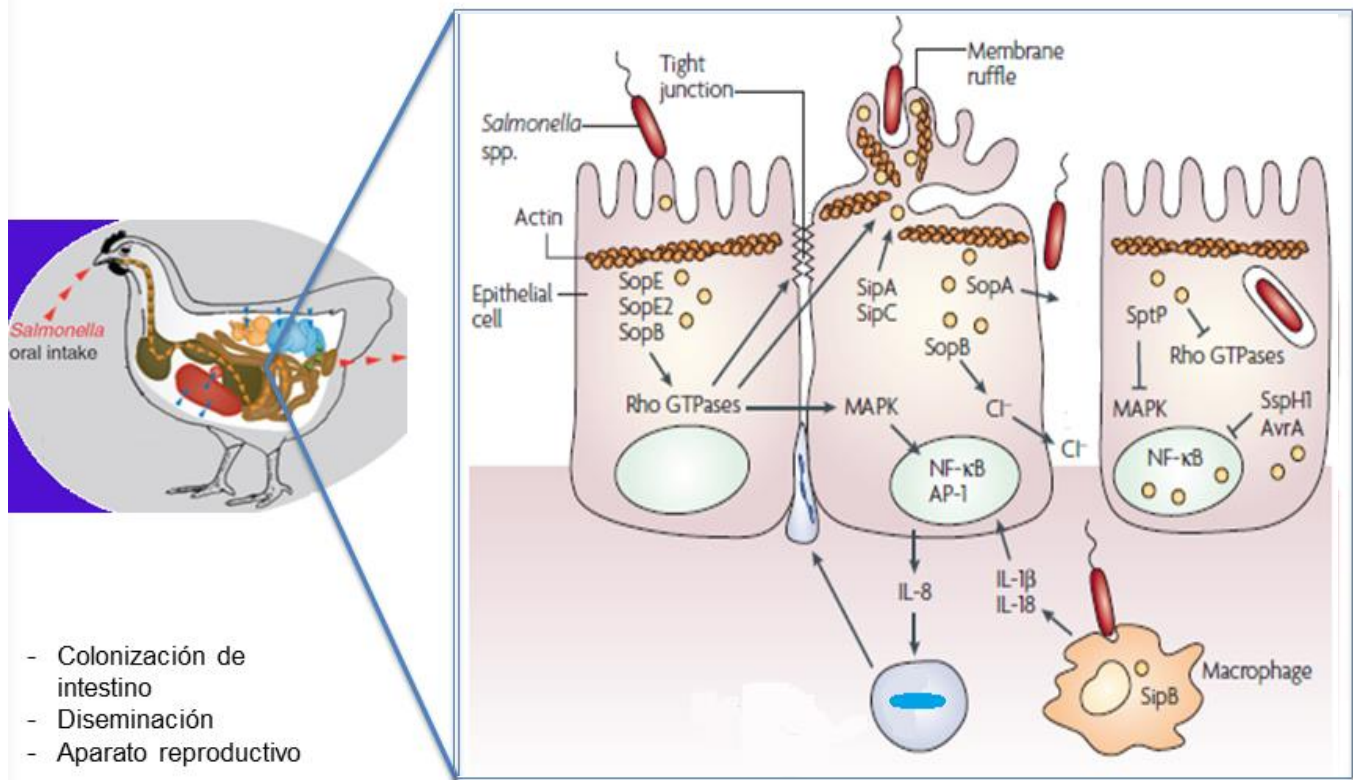
epiteliales del íleon por medio de adhesinas, ya sea fimbriales o afimbriales, aunque también puede invadir células M. El contacto con la célula hospedera desencadena un mecanismo conocido como disparo (*trigger*) con el cual, la bacteria inicia la invasión mediante la translocación de proteínas (efectores), desde la célula bacteriana hacia el citoplasma de la célula hospedera. Este evento se lleva a cabo por medio del sistema de secreción tipo III (SSTIII) codificado por la isla de patogenicidad I (SPI-1).<sup>29</sup>

Dichos efectores provocan modificaciones intracelulares que permiten el ingreso del agente infeccioso.<sup>29</sup> En primer lugar, transloca SopE, SopE2 y SopB las cuales tienen actividad de proteína GEF (*Guanine Exchange Factor*) y producen la activación de Rho GTPasas (Cdc42, Rac1 y RhoG), lo que produce tres efectos principales: re-arreglo de los filamentos de actina, activación de MAPK y desestabilización de las uniones intercelulares (Figura 1).<sup>7,29,30</sup> MAPK induce a la proteína activadora de factores de transcripción (AP-1) y al factor nuclear (NF- $\kappa$ ), los cuales provocan la producción de la interleucina proinflamatoria (IL-8). Cuando la bacteria tiene contacto con macrófagos, induce la activación de la caspasa 1, junto con la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18, lo que provoca un aumento de la respuesta inflamatoria. Los cambios en el citoesqueleto de actina, modulados por los efectores SipA y SipC, producen un ondulamiento (*ruffling*) por el cual la bacteria se interna y por medio del englobamiento, *Salmonella* queda contenida en una vacuola (SCV). Por otra parte, SopB tiene actividad inositol fosfatasa lo cual genera una gran cantidad de fosfolípidos de inositol e inositol fosfato con capacidad de señalización, que además de participar en los rearrreglos del

citoesqueleto, se encuentra involucrada en la secreción de fase fluida al estimular la secreción de cloro. Una vez que la bacteria está en el interior, la estructura del citoesqueleto vuelve a su estado original al translocar a SptP que inhibe a Cdc42 y Rac1, debido a su actividad GAP y también inhibe la señalización MAPK y la secreción de IL-8 por medio de su actividad de tirosina fosfatasa. SspH1 y AvrA inhiben la activación de NFκβ. El proceso anterior resulta en disminución de la respuesta inflamatoria.<sup>7,29</sup>

La diseminación sistémica de *Salmonella* resulta del transporte de la bacteria, vía sistema retículo endotelial hacia el bazo e hígado. En el interior del macrófago, *Salmonella* está rodeada inicialmente en un fagosoma espacioso. Después, esta estructura se encoge y el medio interno se acidifica (SCV). Una osmolaridad y pH bajos reprimen a la SPI-1 e inducen a la SPI-2. Cuando la bacteria detecta el ambiente ácido, se inducen varios sistemas reguladores que promueven la supervivencia intracelular, como OmpR/EnvZ, PhoP/PhoQ, RpoS/RpoE, PmrA/PmrB, Cya/Cyp y diGMP cíclico, los cuales confieren resistencia a péptidos antimicrobianos y estrés oxidativo. Así mismo, transloca diferentes efectores de los cuales, los más importantes son SifA, SseJ, SseF, SseG, SopD2 y PipB2. En la formación de filamentos a partir de la SCV (Sif), se disminuye el reclutamiento de quinesina hacia la SCV y los efectores SifA y SseJ mantienen su integridad. Los filamentos podrían funcionar para aumentar el tamaño de SCV y facilitar la replicación bacteriana durante la infección sistémica y SpiC interfiere el tráfico intracelular de membranas, inhibiendo la fusión de SCV con los lisosomas. SseF y SseG promueven la agregación de vesículas endocíticas y reclutamiento de vesículas exocíticas derivadas del aparato de Golgi hacia la SCV, lo que sugiere

que la bacteria puede ser capaz de usurpar tanto las vías endocítica y exocítica de procesos de transporte celular, también contribuyen en la formación de Sif y agrupación de microtúbulos. Después de la fagocitosis, NADPH-oxidasa contenida en vesículas produce especies reactivas de oxígeno altamente tóxicos que juegan un papel importante en la muerte inicial, sin embargo, *Salmonella* se ha desarrollado una serie de estrategias para reducir la eficacia de los sistemas antimicrobianos fagocitos dependientes de oxígeno. Algunas de estas estrategias son enzimas como la superóxido dismutasa, hidroperoxidasas, oxidorreductasas, y sistemas de reparación. Además, *Salmonella* ha adquirido, por transferencia horizontal, genes que producen efectores que interfieren con el tráfico de vesículas que contienen NADPH-oxidasa y evitan la fusión fago-lisosoma, mejorando así la supervivencia dentro de los macrófagos. Una vez que la bacteria ha superado los mecanismos descritos de los macrófagos, se disemina a otros sitios como médula ósea y vesícula biliar.<sup>7,29</sup>

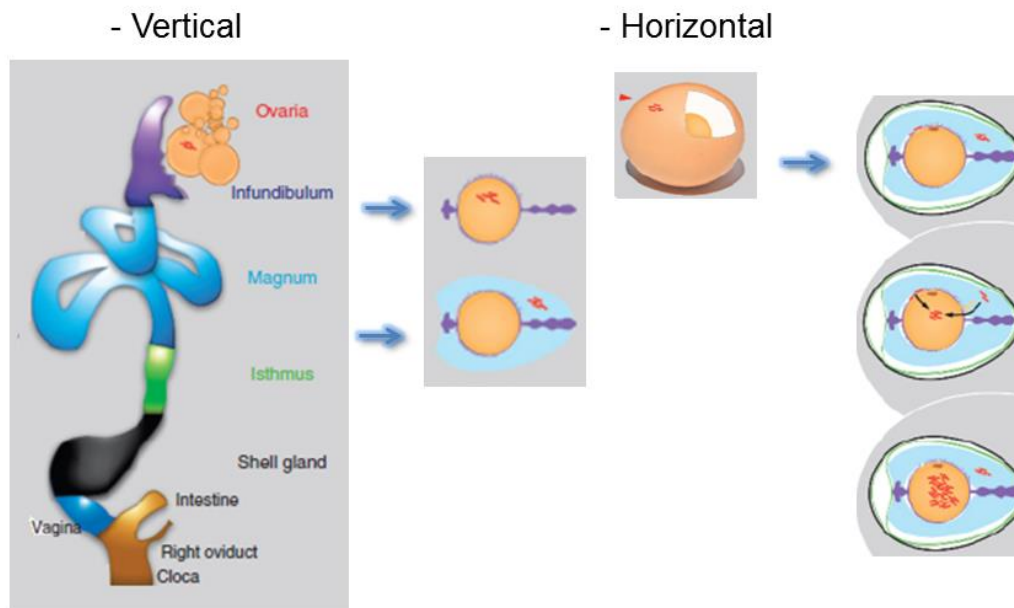


**Figura 1. Invasión de Salmonella.** La bacteria llega a nivel intestinal y se interna en células epiteliales (modificado de Haraga A, 2008).

## 1.7 Contaminación del huevo con *Salmonella*

La principal causa de salmonelosis en el humano es debido al consumo de huevo o sus subproductos. El huevo se puede contaminar por penetración de la bacteria, presente en heces, o durante su formación, por contaminación directa de la yema o clara debido a una infección sistémica de la gallina ponedora.<sup>7,31</sup> A pesar de que el huevo posee mecanismos que producen un efecto protector contra los microorganismos como la cutícula, la fáfara y las membranas del cascarón que funcionan como barreras físicas y mecanismos químicos, como son ovotransferrina, ovocalixina-36, péptidos catiónicos y su ambiente hiperosmótico,

*Salmonella* es capaz de atravesar el cascarón de huevo fértil recién puesto y el multiplicarse en su interior.<sup>32</sup> Se considera que la contaminación se facilita inmediatamente después de la postura porque la cutícula es inmadura y durante el enfriado se produce presión negativa; cuando el huevo es viejo, la cutícula se contrae y esto provoca que los poros sean de mayor tamaño (Figura 2).<sup>7,31</sup>



**Figura 2. Vías de contaminación del huevo:** Vertical a través de invasión de órganos reproductivos y horizontal por medio de contaminación del cascarón (Modificado de Desin TS, 2013).

## 1.8 Medidas de control de la enfermedad

Diversas estrategias se han implementado para controlar la enfermedad. Se utilizan fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación para controlar la infección y se ha presentado resistencia a ampicilina, tetraciclina y sulfonamidas;

el control de ratas en las naves de producción es importante ya que estos animales pueden ser portadores de la bacteria y servir como vehículo. Las medidas de higiene se integran principalmente a los sistemas de producción con enfoque en la colección del huevo, en el que se elimina el que está sucio o roto. Además, se ha tomado interés en el desarrollo de inmunógenos; en la actualidad, existen varios en el mercado que permiten disminuir la colonización de órganos, pero con bajos porcentajes de protección.<sup>3,33</sup>

Se continúa realizando investigación para obtener mejores candidatos vacunales:

- Vacunas atenuadas. Bacterias con mutaciones en algunos genes lo que produce una disminución de la virulencia:  $\Delta aroA$ ,  $\Delta SPI-1$  y  $\Delta SPI-2$ .
- Vacunas inactivadas. Bacterias inactivadas con formalina, calor, acetona u otro tratamiento.
- Subunitarias. Antígenos simples o múltiples (predominantemente proteínas), por ejemplo, extracto de proteínas de SE y FliC.<sup>33</sup>

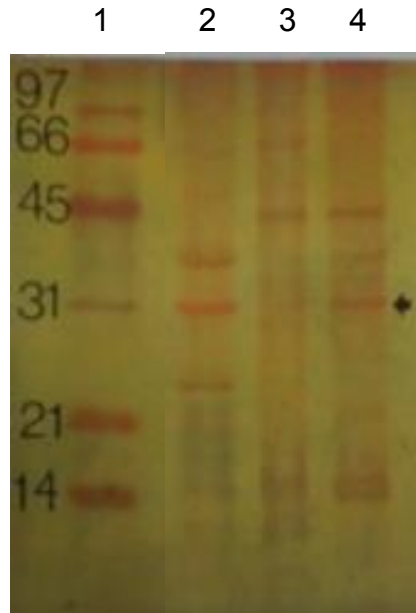
## 1.9 Antecedentes

En el grupo de investigación del laboratorio de Microbiología Molecular han realizado trabajos de proteómica y genómica:

- Bautista-Cruz B (1996), estandarizó una prueba de ELISA con PMEs de SG la cual discrimina anticuerpos en contra de otras enterobacterias.<sup>34</sup>
- Huerta L (1996) comparó el cultivo de *Salmonella Gallinarum* en múltiples condiciones ambientales:

- a) Caldo nutritivo A (CNA)
- b) CNA 30% suero de aves SPF sin calentar
- c) CNA 30% suero de aves SPF calentado<sup>35</sup>

y observó que la presencia de una proteína mayoritaria disminuye su detección cuando la bacteria se cultiva con el tratamiento de suero sin calentar (Figura 3).



**Figura 3. Gel de electroforesis de proteínas de membrana externa de SG.** 1: MPM; 2:CNA; 3: CNA 30% suero de gallina sin calentar; 5: CNA 30% suero de gallina calentado. La flecha indica la localización de la proteína de alrededor de 30 kDa la cual se modifica su presencia con base a los tratamientos en los que se cultivó a SG (tomado de Vega-Manríquez, 2000)

- Vega-Manríquez X (2000) realizó la secuenciación del extremo amino terminal de la proteína que Huerta identificó y se determinó una identidad del 100% con OmpA de *S. Typhimurium*.<sup>36</sup>
- Hernández-Morales I (2008), diseñó una vacuna de ADN con *ompA* de SE.<sup>37</sup>

Los resultados de estos ensayos alentaron a continuar estudiando a la proteína de membrana externa OmpA.

## 1.10 OmpA

OmpA es una proteína monomérica altamente conservada. Su producción por célula bacteriana es  $1 \times 10^5$  lo que la clasifica como proteína mayoritaria. Consta de 329 residuos de aminoácidos (SE) que atraviesan 8 veces la membrana externa con cadenas *beta* plegada. De esta forma, su conformación tridimensional origina un pequeño poro.<sup>38,39</sup> A pesar de esta morfología, tienen una baja eficiencia como porina y sólo alrededor del 2-3% forma canales que permiten la difusión de solutos.<sup>40</sup> El dominio N-terminal se ancla a la membrana externa y el C-terminal se encuentra en el periplasma e interactúa con el peptidoglicano<sup>38</sup>. Entre sus funciones se encuentran:

- Mantenimiento estructural. Mutaciones en los genes *llp* y *ompA* de *E. coli* provocan que la bacteria pierda su morfología bacilar y se requiere un medio isotónico para que se mantenga viable.<sup>41</sup>
- Receptor de colicinas y fagos. Las colicinas K y L y el bacteriófago M13 no producen efectos en bacterias con delección de *ompA* de *E. coli*.<sup>42</sup>
- Mediador de la conjugación dependiente del factor F. Las bacterias F<sup>-</sup> con delección de *ompA* no pueden recibir información genética por medio de conjugación a partir de bacterias F<sup>+</sup> de SE.<sup>43</sup>
- Potenciar la invasión bacteriana. *Escherichia coli* uropatógena sin OmpA disminuye la invasión de células epiteliales.<sup>44</sup>
- Participación en la resistencia al suero. *Escherichia coli* mutante de *ompA* es más sensible al efecto de la vía clásica del complemento de suero de humano.<sup>45</sup>



- Resistencia a detergentes y pH ácido. *Escherichia coli* mutante de ompA es más sensible al efecto de SDS y colatos.<sup>46</sup>
- Inmunógeno. OmpA recombinante de *Klebsiella pneumoniae* induce la producción de citocinas en macrófagos y la maduración de células dendríticas por lo que se ha considerado como candidata para su uso como un inmunógeno.<sup>47,48,49</sup>

El transporte de la proteína hacia la membrana externa inicia desde el momento de su síntesis (cadena de 350 aa en SE) en el citoplasma. Su conformación inicial es no plegada, posee un péptido señal, el cual participa en conjunto con el sistema general de secreción (SecA-EY-G) y permite su translocación hacia el espacio periplásmico. En este sitio, se produce la separación del péptido señal por peptidasas, se une la chaperona Skp al extremo amino terminal y en conjunto con el LPS, la proteína se pliega y se inserta en la membrana externa. Además, su presencia se ha confirmado en el sobrenadante filtrado, lo que se explica por medio de la liberación de ciertas estructuras conocidas como vesículas de membrana externa (OMV).<sup>50,51,52</sup>

### **1.11 Vesículas de membrana externa**

Las OMV son estructuras semiesféricas que liberan las bacterias Gram negativas. Están formadas por componentes de la membrana externa y elementos periplásmicos como proteínas, fosfolípidos y LPS.<sup>52</sup> El tamaño varía de 20-1000 nm de diámetro, siendo las más comunes de 50-250 nm.<sup>53</sup> Tanto las bacterias patógenas como las no patógenas liberan OMV durante su crecimiento y no

durante su muerte o lisis. Las OMV se han obtenido a partir de bacterias cultivadas en medios líquidos, medios sólidos, en biopelículas y en infecciones de *Escherichia coli*, *Shigella*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Brucella melitensis*, *Campylobacter jejuni*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Xenorhabdus nematophilus* y *Borrelia burgdorferi*.<sup>52</sup>

A partir de los trabajos con *Vibrio cholerae* en el que se observó que la inoculación del sobrenadante filtrado en conejos producía efectos comparables a los de la bacteria y proyecciones de microscopía electrónica demostraron protuberancias en la superficie de esta bacteria durante la fase logarítmica, lo cual sugería que la toxina se encontraba en las vesículas. Trabajos posteriores confirmaron este hecho.<sup>54</sup>

### **1.11.1 Composición de las vesículas de membrana externa**

La formación de vesículas se describe como un proceso de abultamiento de la membrana externa y “pellizcado”. Están conformadas por fosfolípidos, OMP, LPS y constituyentes periplásmicos, con estudios se han identificados 141 proteínas en OMV de *E. coli*, algunos de los cuales se encuentran constantemente en otros géneros bacterianos de las que podemos mencionar

- OMP: PorA, PorB y OprF.
- Hidrolasas de mureína. Met y SLT.
- Factores de virulencia: Hemolisina.

- Bombas de expulsión. Mtr, Mex, y TolC.
- Transportadores: LamB y FadL.<sup>54</sup>

### 1.11.3 Liberación de vesículas de membrana externa

Tres mecanismos se han propuesto para su formación de las OMV:

1) Sitios de pérdida de contacto entre la membrana externa y el peptidoglicano.

Deleciones de las proteínas de membrana externa que están ancladas al peptidoglicano, producen una mayor cantidad de vesículas. Este es el caso de OmpA, LppAB y el sistema Tol-PalAB a diferencia de OmpC, OmpF y OmpX en el que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la producción de vesículas.

2) Presión local producida por proteínas periplásmicas.

3) Participación de proteínas que tienen efecto físico en la membrana.<sup>55</sup> La proteína PQS (Pseudomonas quorum signal) de *P. aeruginosa* produce un efecto de curvatura en un modelo de bicapa lipídica en el que su incubación con eritrocitos, produce la formación de espículas. Cuando se aumentó la concentración de PQS hubo un porcentaje mayor de hemólisis.<sup>56</sup> Cuando la molécula se incubaba con *E. coli*, hay mayor producción de OMV.<sup>57</sup>

### 1.11.4 Condiciones de estrés en la liberación de vesículas

Se comparó la producción de vesículas de la bacteria *E. coli* Dh5α a 30°, 34° y 37°C y se obtuvo una mayor cantidad en la última temperatura<sup>58</sup>. *Serratia*

*marcences* produce más vesículas cuando se cultiva a 22° y 30° en comparación a 37°C.<sup>59</sup> Lo anterior sugiere que la producción de vesículas está influenciada por la temperatura. Por otro lado, la presencia de antibióticos como la gentamicina en *Pseudomonas aeruginosa*, produce la liberación de una cantidad mayor de vesículas.<sup>60</sup>

### **1.11.5 Funciones de las vesículas de membrana externa**

En primera instancia, las vesículas sirven como medio de supervivencia frente a condiciones de estrés. Un incremento de proteínas no plegadas en el periplasma produce un aumento en la producción de vesículas. Tratamientos como ciprofloxacino y peróxido de hidrógeno produjo una mayor cantidad de vesículas en *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>61</sup> Se describe que las OMV dan protección a fagos. Una bacteria *E. coli* alta productora de vesículas tubo mayor viabilidad cuando se cultivó con el fago lítico T4.<sup>62</sup> Además, participan en la formación de biofilms lo cual les da protección a las bacterias.<sup>63,64</sup> Por otra parte, se ha descrito que las vesículas participan durante la patogénesis bacteriana debido a que transportan efectores, por ejemplo HtrA la cual participa durante la infección de *E. coli* enteropatógena.<sup>61</sup> También se cita que las OMV tienen participación en la liberación de proteasas y autolisinas cuando existen diferentes comunidades bacterias lo cual provoca lisis.<sup>65</sup> Algunos las consideran como un sistema de secreción más<sup>66</sup> y pueden producir una respuesta inmune (candidatos vacunales).<sup>52,67,68</sup>

### **1.11.6 Usos de las vesículas de membrana externa**

Se ha demostrado que las OMV pueden utilizarse como acarreadores de antígenos e inmunógenos. Jae-Young K demuestra que la inmunización de ratones con la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a ClyA y liberada en OMV produce una respuesta humoral, a diferencia de aquellos inoculados sólo con GFP.<sup>69</sup> En la actualidad, existe la patente de la vacuna de OMV contra la meningitis para el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*.<sup>54,70,71,72</sup>

## **JUSTIFICACIÓN**

A la fecha no se reporta el uso de algún inmunógeno completamente efectivo contra *Salmonella* Enteritidis. La mayoría produce una disminución en la colonización de bacterias en órganos y una menor eliminación en heces. La proteína OmpA contenida en OMV podría emplearse como una herramienta para la elaboración de un inmunógeno con las características descritas anteriormente. Sin embargo, es necesario conocer varios factores ambientales que pueden modificar su liberación en las OMV, por ejemplo, temperatura, osmolaridad o presencia de suero, entre otros. En el presente trabajo se evaluó la liberación de OmpA en OMV de *Salmonella* Enteritidis cultivada bajo diferentes condiciones ambientales.

## **HIPÓTESIS**

La liberación de OmpA en vesículas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis se modifica en diferentes condiciones ambientales.

## **OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Cultivar a *Salmonella* Enteritidis en diferentes condiciones ambientales para evaluar la liberación de OmpA en vesículas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis mediante electroforesis desnaturalizante (*SDS-PAGE*) y *Western blot*.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Realizar cinéticas de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis cultivada en condiciones diferentes de temperatura y osmolaridad para identificar su fase logarítmica tardía.
- II. Comparar la producción de vesículas de membrana externa de *Salmonella* Enteritidis cultivada en condiciones diferentes de temperatura y osmolaridad para identificar la condición de mayor liberación.
- III. Comparar a OmpA de *Salmonella* Enteritidis (OMP y OMV) cultivada en presencia de suero de ave SPF mediante perfiles electroforéticos y *Western blot*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo de esta investigación se presenta en el siguiente diagrama de flujo:

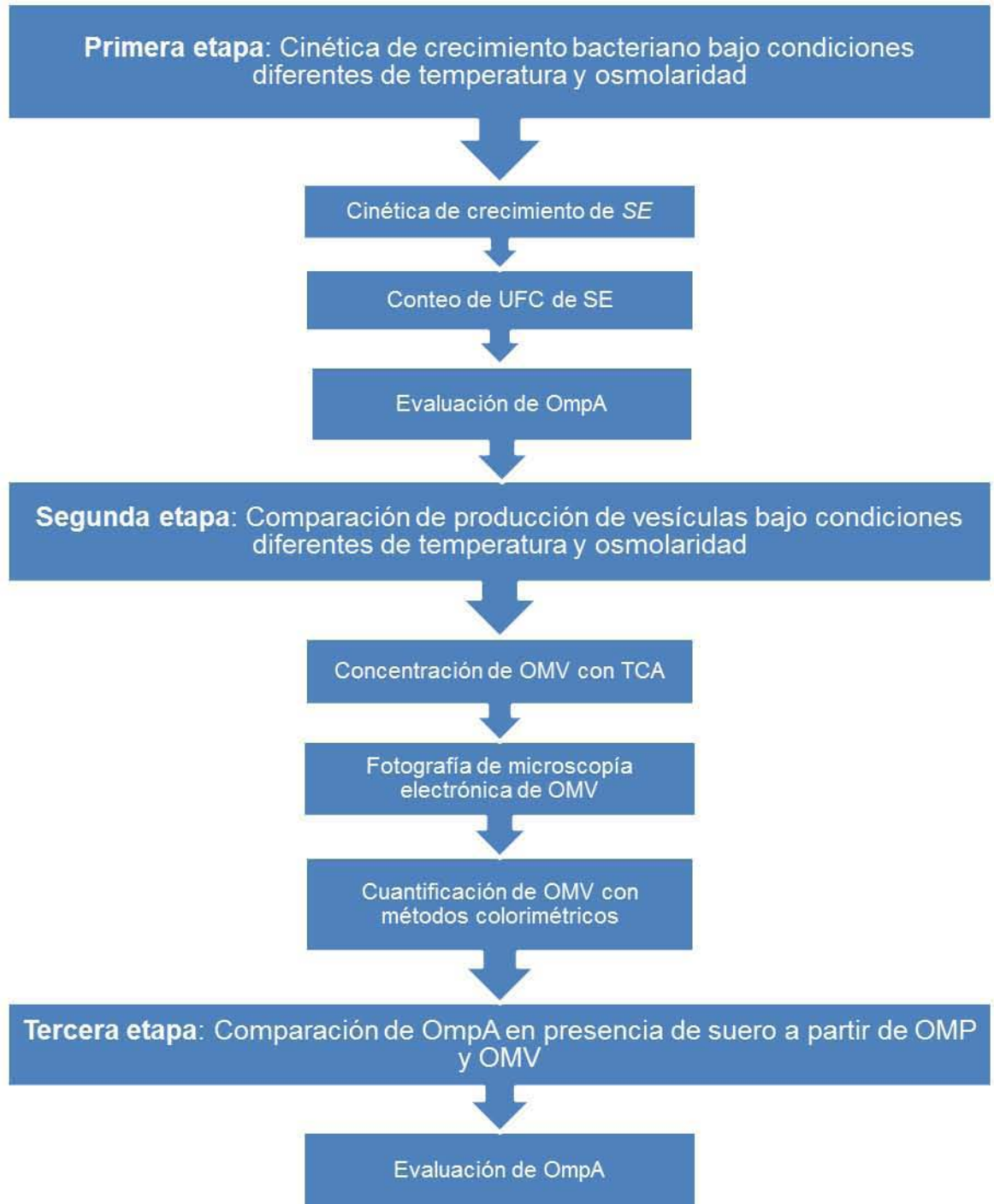


Figura 4. Metodología general. Diagrama de flujo del trabajo presente.



## 5.1 Cultivos y cepas

La bacteria *Salmonella* Enteritidis ATCC® 49214 se utilizó para desarrollar todos los ensayos de este trabajo. El caldo nutritivo (CNA) se estandarizó a 50 mL como volumen de trabajo, se utilizó como medio de cultivo base y se le adicionaron diferentes tratamientos a éste de acuerdo al diseño experimental.

## 5.2 Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial de 3 x 2 en los ensayos de cinéticas de crecimiento bacteriano, conteo de UFC, cuantificación de OMV y evaluación de OmpA bajo diferentes condiciones de temperatura y osmolaridad.<sup>73</sup> Los tratamientos utilizados son los siguientes:

- **Tratamiento 1 (T1):** CNA incubado a 37° C.
- **Tratamiento 2 (T2):** CNA incubado a 42° C.
- **Tratamiento 3 (T3):** CNA 0.3 M de NaCl e incubado a 37° C.
- **Tratamiento 4 (T4):** CNA 0.3 M de NaCl e incubado a 42° C.
- **Tratamiento 5 (T5):** CNA 20% de sacarosa e incubado a 37° C.
- **Tratamiento 6 (T6):** CNA 20% de sacarosa e incubado a 42° C.

Cada medio de cultivo se inoculó con SE y los tratamientos control fueron medios sin inocular. En estos ensayos, se consideró al medio como factor  $\alpha$  y a la temperatura  $\beta$ . La combinación de cada nivel de los factores corresponde a cada

uno de los tratamientos utilizados, los cuales se muestran en el cuadro 1. El mismo cuadro se utilizó para hacer la captura de los resultados.

Cuadro 1. Tratamientos de la primera y segunda etapa experimental. En el cuadro se observa cada uno de los tratamientos provenientes de la combinación de los niveles temperatura y osmolaridad.

<b>Medio (<math>\alpha</math>)</b>	<b>Temperatura (<math>\beta</math>)</b>	
	37° C	42° C
CNA	$\alpha_{i1}\beta_{j1}$	$\alpha_{i1}\beta_{j2}$
CNA 0.3 M NaCl	$\alpha_{i2}\beta_{j1}$	$\alpha_{i2}\beta_{j2}$
CNA 20% sacarosa	$\alpha_{i3}\beta_{j1}$	$\alpha_{i3}\beta_{j2}$
Control CNA	$\alpha_{i4}\beta_{j1}$	$\alpha_{i4}\beta_{j2}$
Control CNA 0.3 M NaCl	$\alpha_{i5}\beta_{j1}$	$\alpha_{i5}\beta_{j2}$
Control CNA 20% sacarosa	$\alpha_{i6}\beta_{j1}$	$\alpha_{i6}\beta_{j2}$

La comparación de OmpA a partir de OMP y OMV provenientes de medios de cultivo con suero, se realizó mediante un diseño completamente aleatorizado (DCA). Los tratamientos son los siguientes:

- **Tratamiento 1 (T1):** CNA sin 30% de suero de ave SPF.
- **Tratamiento 2 (T2):** CNA con 30% de suero de ave SPF sin calentar.
- **Tratamiento 3 (T3):** CNA con 30% de suero de ave SPF calentado a 56° C durante 30 minutos.

Cada medio de cultivo se inoculó con SE y los tratamientos control corresponden a medios sin inocular. En estos ensayos, se consideró al suero como factor  $\alpha$ . Cada nivel del factor corresponde a un tratamiento diferente los cuales se muestran en el cuadro 2. El mismo cuadro se utilizó para hacer la captura de los resultados.

Cuadro 2. Tratamientos de la tercera etapa experimental. En el cuadro se observa cada nivel del tratamiento de suero de gallina SPF.

<b>Suero (<math>\alpha</math>)</b>	<b>Tratamiento</b>
Sin suero	$\alpha_{i1}$
Suero sin calentar	$\alpha_{i2}$
Suero calentado	$\alpha_{i3}$
Suero sin calentar	$\alpha_{i4}$
Suero calentado	$\alpha_{i5}$

### **5.3 Cinética de crecimiento bacteriano y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC)**

La cinética de crecimiento bacteriano se realizó en un periodo de 10 h con mediciones en cada hora. Brevemente, se sembró una asada de la bacteria SE (5 colonias) en 10 mL de CNA y se incubó hasta alcanzar una lectura de absorbancia de 1 a 540 nm de OD<sup>I</sup>. Posteriormente, se transfirió 1 mL de este cultivo a 50 ml de medio CNA, CNA 0.3 M NaCl y CNA 20% sacarosa y se incubaron a 37°C con agitación de 220 rpm<sup>II</sup>. Otro conjunto de medios de cultivo se utilizaron para realizar el mismo procedimiento a una temperatura de incubación de 42°C. Como control se utilizó medio sin inocular.

El conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) se realizó con los mismos tratamientos y las tomas de muestra se efectuaron a las 4, 6, 8 y 10 h. A partir de diluciones décuples seriadas (volumen total de 1 mL), se sembraron 100  $\mu$ L de cultivo bacteriano en agar CNA y se esparció sobre su superficie con perlas de vidrio estériles, se incubó durante 24 h y se realizó el conteo de las UFC.

<sup>I</sup> Ultrospec 3000, Pharmacy Biotech, USA.

<sup>II</sup> Lab-line instruments model 3525, illinois, USA.

## 5.4 Extracción de proteínas de membrana externa

Las proteínas de membrana externa se obtuvieron por el método de Matsuyama<sup>74</sup> a partir de cultivos incubados bajo diferentes condiciones de temperatura, osmolaridad y presencia de suero. Brevemente, cultivos de un volumen de 50 mL incubados durante 8 h se centrifugaron a 3 500 x g<sup>III</sup> durante 15 min. Después, el sobrenadante se retiró, la pastilla bacteriana obtenida se lavó con 15 mL de solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2 y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones<sup>III</sup>. El sobrenadante se eliminó y las pastillas bacterianas de cada tratamiento se suspendieron en 10 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2 y se sonicaron<sup>IV</sup> con las constantes de 4 °C, amplitud de 50%, pulso de 2.5 s y descanso de 9.9 s durante 4 min. Luego, las muestras se centrifugaron a 3 500 x g durante 15 min<sup>III</sup>, se tomó el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas, y se ultracentrifugó a 125 000 x g durante 35 min<sup>V</sup>. Las pastillas de proteínas se purificaron con 10 mL de solución Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2 y 2% de tritón X-100 y se incubaron durante 30 min a 37°C. Posteriormente, las muestras se ultracentrifugaron a 125 000 x g durante 35 min<sup>V</sup>, el sobrenadante se decantó, las proteínas se suspendieron en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2 y se repitió la ultracentrifugación<sup>V</sup> con las mismas condiciones. Finalmente, las proteínas se suspendieron en PBS y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

---

<sup>III</sup> IEC®, modelo PR-2, Mass, USA.

<sup>IV</sup> Cole Parmer. Modelo CPX600, USA.

<sup>V</sup> Beckman L8/L8M Rotor 50 Ti, USA.

## 5.5 Concentración de vesículas de membrana externa

La obtención de OMV se realizó a partir de los sobrenadantes de los cultivos incubados bajo condiciones diferentes de temperatura, osmolaridad y presencia de suero con ácido tiobarbitúrico (TCA).<sup>75</sup> Brevemente, los cultivos de 50 mL se incubaron durante 8 h y se centrifugaron 13 500 x g durante 15 min<sup>VI</sup>. El sobrenadante se obtuvo y se filtró con una membrana PVDF<sup>VII</sup> de 45 µm de tamaño de poro, y se realizó una prueba de esterilidad (100 µl en agar CNA). Cuando se comprobó la ausencia de bacterias, el material filtrado se precipitó con TCA (concentración final de 10%) y se centrifugó a 3 500 x g<sup>III</sup> durante 15 min para obtener una pastilla de OMV. Éstas se transfirieron a microtubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 15 500 x g<sup>VIII</sup>. Las pastillas se lavaron con etanol absoluto 6 veces, se suspendieron en 100 µL de PBS y se mantuvieron a -20° C hasta su uso. Como control se utilizó medio sin inocular.

## 5.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se determinó mediante el método de Bradford<sup>76,77</sup> en placa de 96 pozos. En resumen, se colocó 1 µl de muestra en 99 µl de PBS y se agregó 100 µl de reactivo de Bradford. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un aparato de ELISA<sup>IX</sup> y se compararon con una curva de referencia

---

<sup>VI</sup> Beckman J2-21, Rotor JA-17, USA.

<sup>VII</sup> Durapore.

<sup>VIII</sup> Eppendorf, modelo 5415 R, Germany.

<sup>IX</sup> Biorad, modelo 3550, USA.

con concentraciones de 1-6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de albúmina sérica bovina (linealidad mayor al 98%).

## 5.7 Cuantificación de KDO

Las concentración de 2-ceto-3-deoxioctonato (KDO) se determinó por medio del ensayo colorimétrico (Karkhanis et al., 1978). Brevemente, se mezclaron 90  $\mu\text{L}$  de muestra con 10  $\mu\text{l}$  de 0.2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y se calentaron a  $100^\circ\text{C}$  durante 30 min en microtubos sellados. Se le dio un pulso a los microtubos y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de reactivo periodato de sodio (0.04 M  $\text{NaIO}_4$  en 0.125 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Se incubó a temperatura ambiente y en obscuridad durante 20 min, y se agregaron 130  $\mu\text{L}$  del reactivo arsenito (2%  $\text{NaAsO}_2$  en 0.5N  $\text{HCl}$ ) y se homogenizó hasta que el color café desapareció. Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de 0.3% ácido tiobarbitúrico, la reacción se homogenizó e incubó a  $100^\circ\text{C}$  durante 10 min. Finalmente, se colocaron 250  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxico (DMSO). Las muestras se colocaron en cubetas y la lectura se realizó a una densidad óptica de  $550\text{nm}^1$ . Una curva estándar como referencia de 0.1 a 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de  $\text{KDO}^x$  se utilizó para realizar la cuantificación. La misma reacción sin KDO se ocupó como blanco.<sup>78</sup>

## 5.8 Electroforesis desnaturalizante

Se prepararon geles de 0.75 mm de grosor y se colocaron en la cámara de

---

<sup>x</sup> Sigma Chemical, Co.

electroforesis<sup>XI</sup> sumergidos en una solución amortiguadora. Las muestras de trabajo se prepararon con amortiguador Laemmli 2X en una proporción 1:1 y se hirvieron a 100 °C durante 5 min. La electroforesis se realizó a 60 V al inicio y se cambió a 70 V cuando el colorante del amortiguador de carga pasó el gel concentrador. El tiempo de corrida fue de 4 h. Durante el proceso, se utilizaron geles gemelos, uno para tinción con azul coomassie y el otro para inmunotransferencia.<sup>77,79</sup>

## **5.9 Tinción con azul de Coomassie**

Los geles con las proteínas se tiñeron con una solución de azul de Coomassie durante 4 h y después, se sumergieron en solución de lavado hasta que las bandas fueron visibles.<sup>77,80</sup>

## **5.10 Immunoblotting**

El gel gemelo de la electroforesis se colocó en un casete de la cámara de transferencia junto con filtros, esponjas y membrana de nitrocelulosa. Este conjunto se montó en la cámara con exposición a solución de transferencia y las proteínas se transfirieron con un voltaje de 100 mA durante 16 h. Al término, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau y se destiñó con agua destilada para observar a las proteínas. Después, la membrana se colocó en 100 mL de TBS con leche descremada al 5% durante 4 h para realizar su bloqueo. Posteriormente, se

---

<sup>XI</sup> Mini-PROTEAN II, USA.

realizaron tres lavados con PBS-tween y tres con TBS. Una vez en este punto, la membrana se incubó durante 16 h con el anticuerpo primario anti OmpA (policlonal) diluido en TBS-tween a 1:500 ó 1:50, según el caso. Después, se realizaron lavados como los descritos anteriormente y se incubó durante 2 h con el anticuerpo secundario anti IgG de coneja a una dilución 1:800 en TBS-tween. Finalmente, el revelado se realizó con una solución de 4-cloro naphthol y peróxido de hidrógeno.<sup>77,81,82</sup>

### **5.11 Microscopía electrónica**

La observación de las OMV se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión.<sup>83</sup> La muestra se fijó con glutaraldehído (2.5%) en una proporción 1:1 y se envió a la Unidad de Microscopía Electrónica<sup>XII</sup> “MVZ Aurora Velásquez Echegaray” de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

### **5.12 Comparación de OmpA en perfiles electroforéticos**

La comparación de OmpA (34 kDa) en perfiles electroforéticos se realizó a partir de geles teñidos con azul de Coomasie y *Western-blot*, con el uso del programa ImageJ<sup>XIII</sup>. Este programa realiza comparaciones del número de pixeles detectados de la proteína de interés.<sup>84</sup>

---

<sup>XII</sup> Zeis EM900, Germany.

<sup>XIII</sup> IJ1



### 5.13 Método estadístico

Se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANOVA) y Tukey como prueba de comparación de medias de los experimentos con una significancia de 0.05. La prueba de normalidad se realizó con el estadístico Shapiro-Wilk y la prueba de homogeneidad de varianzas se obtuvo con el estadístico de Levene.<sup>73</sup> La hipótesis a contrastar de los experimentos con estructura factorial es:

$$H_{0AB}: \alpha\beta_{ij} = \alpha\beta_{ij'} \quad \text{vs} \quad H_{aAB}: \alpha\beta_{ij} \neq \alpha\beta_{ij'} \quad 1 \leq i \neq i' \leq 3 \quad 1 \leq j \neq j' \leq 2$$

La hipótesis a contrastar de los experimentos de DCA es:

$$H_{0A}: \alpha_i = \alpha_{i'} \quad \text{vs} \quad H_{aA}: \alpha_i \neq \alpha_{i'} \quad 1 \leq i \neq i' \leq 3$$

## RESULTADOS

### 6.1 Cinética de crecimiento bacteriano

Los cultivos bacterianos de SE presentaron un patrón de crecimiento exponencial, independientemente del tratamiento aplicado. La inferencia estadística demuestra que no existe efecto de interacción entre los factores por lo que se evaluó a los efectos principales ( $p > 0.05$ ). La comparación de los niveles de temperatura ( $37^{\circ}\text{C}$  y  $42^{\circ}\text{C}$ ) no indica que haya diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), mientras que el análisis de los niveles de osmolaridad (CNA, CNA 0.3 M NaCl y CNA 20% sacarosa) concluye que por lo menos un tratamiento es diferente. La prueba de comparación de medias Tukey define a CNA 20% sacarosa como el único tratamiento desigual ( $p < 0.05$ ). En los perfiles gráficos se observan estas evaluaciones y se aprecia que la bacteria tuvo mayor crecimiento en los tratamientos de CNA y CNA 0.3 M NaCl, con valores de absorbancia de hasta 2.050 mientras que en el tratamiento de CNA 20% sacarosa se obtuvieron lecturas máximas de absorbancia de 1.2. En adición, la diferencia estadística entre tratamientos inicia a partir de la hora 2 de incubación y la fase logarítmica tardía se presenta entre las 6-8 h. (Figuras 5 y 6). Este último resultado es de importancia para este trabajo ya que varias publicaciones mencionan a esta fase como la de mayor liberación de OMV. Para tener mayor precisión en la determinación de la fase logarítmica tardía, se realizó el conteo de UFC.

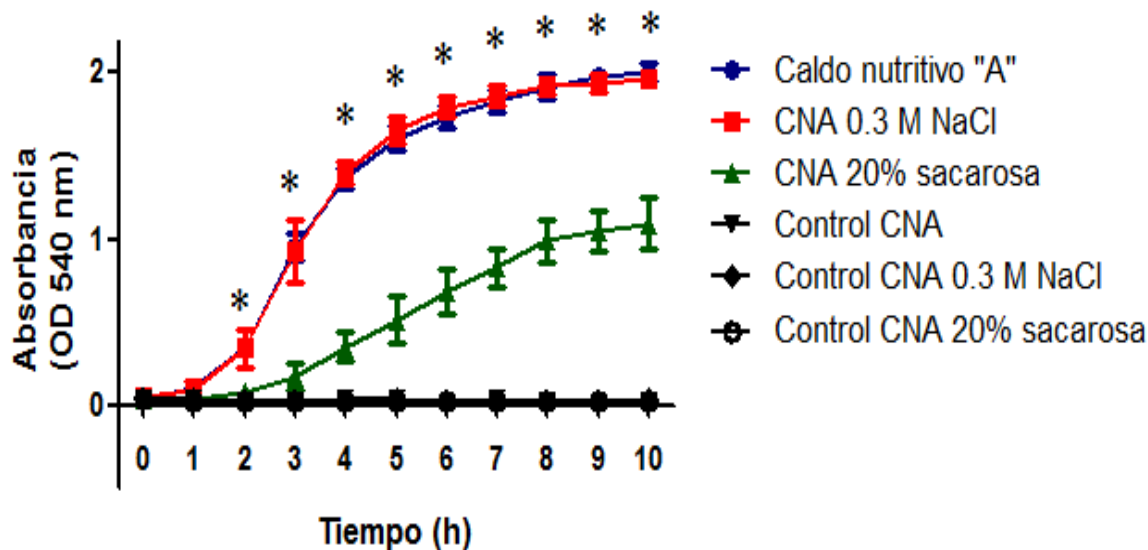


Figura 5. Cinética de crecimiento de SE con tratamientos de osmolaridad y temperatura de 37°C a 220 rpm. Se realizaron 5 repeticiones. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

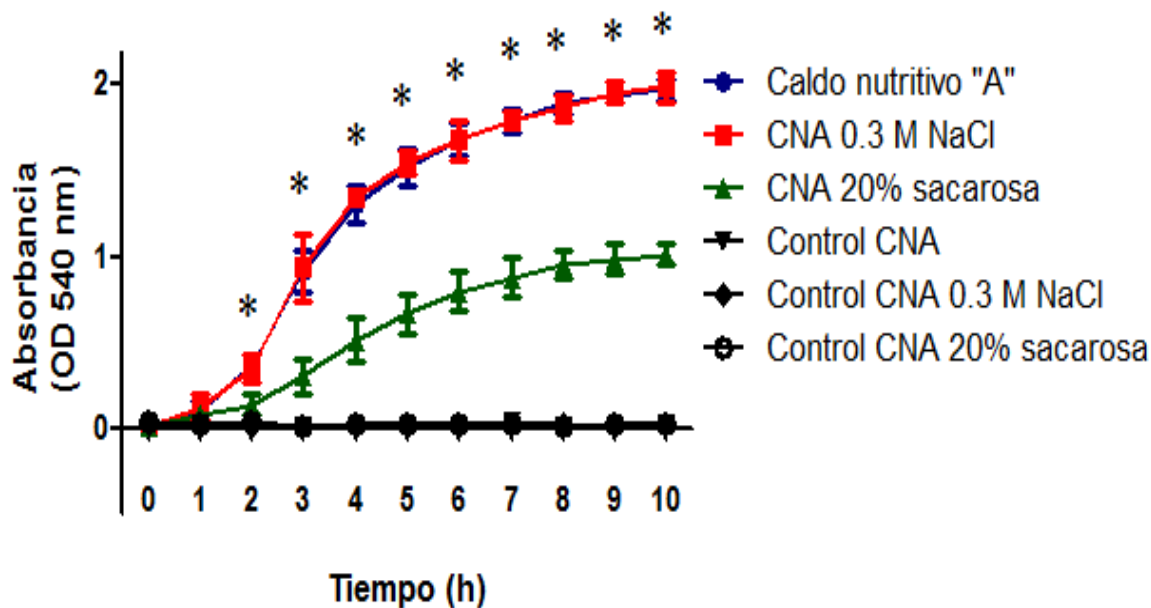


Figura 6. Cinética de crecimiento de SE con tratamientos de osmolaridad y temperatura de 42°C a 220 rpm. Se realizaron 5 repeticiones. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## 6.2 Conteo de unidades formadoras de colonia

El perfil del conteo de UFC permite observar un comportamiento acorde a las cinéticas de crecimiento bacteriano. El conteo de UFC se realizó solamente a 37°C debido a que no hay diferencia significativa entre los niveles de temperatura. Con este ensayo se determinó con precisión que la fase logarítmica tardía se localiza a las 8 h de incubación (Figura 7). Así, este periodo se utilizó para realizar los demás experimentos.

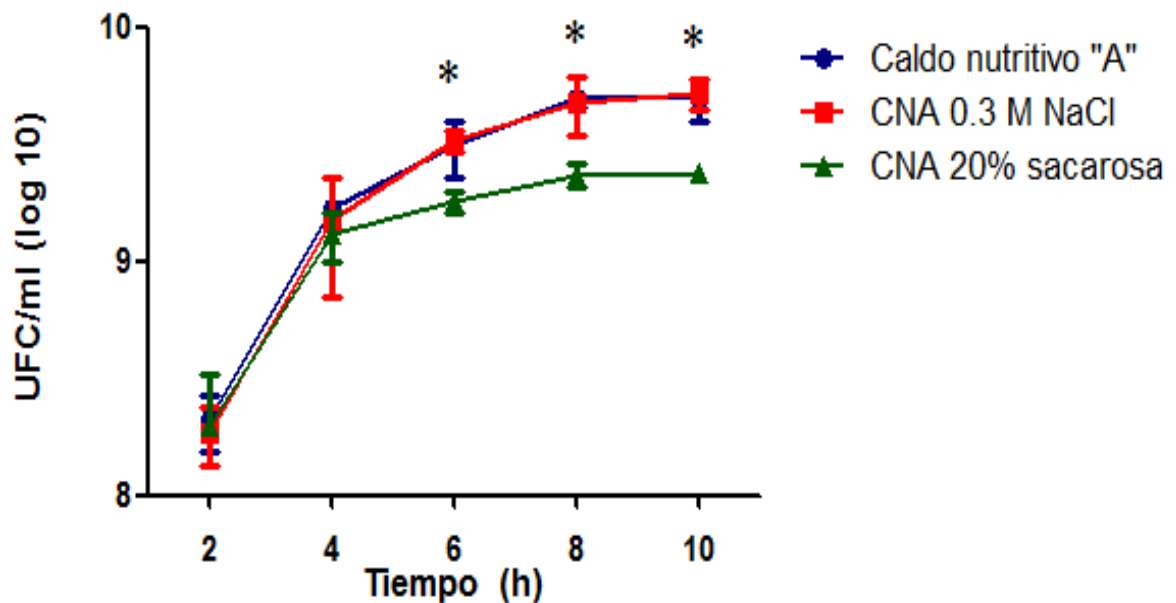
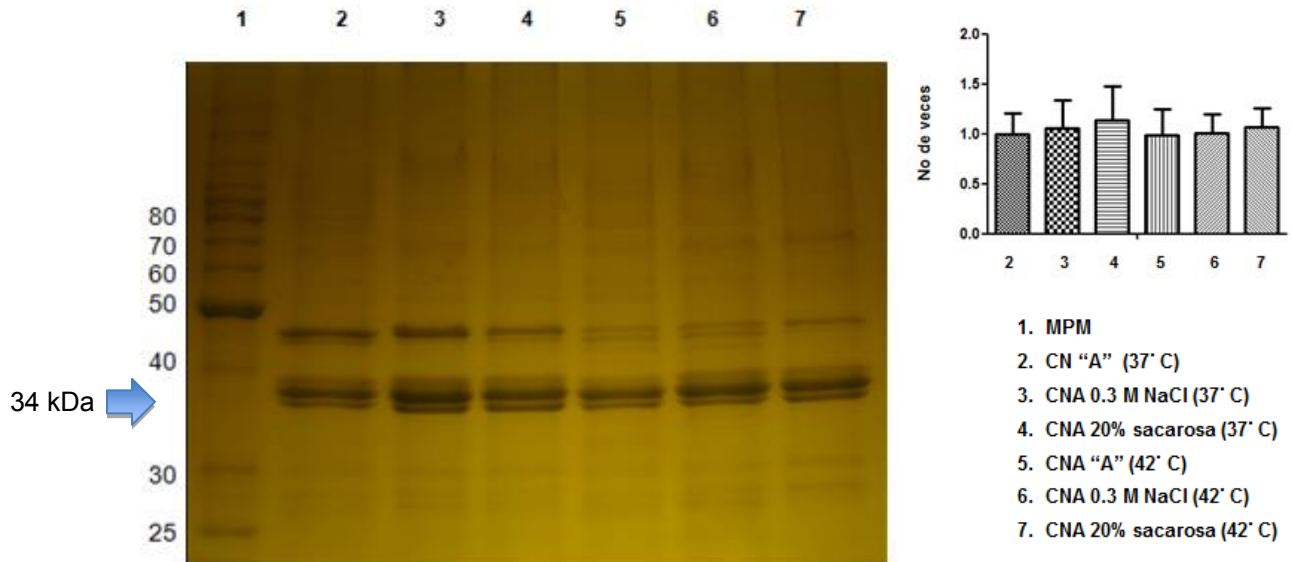


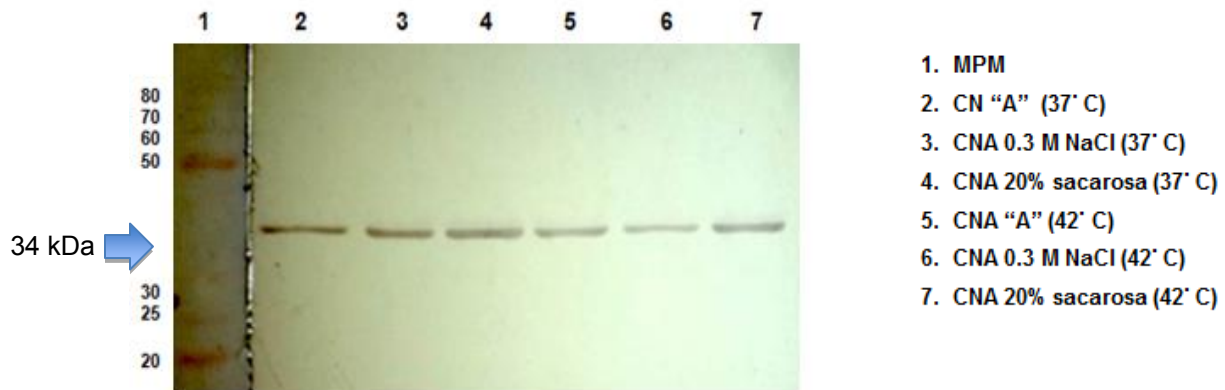
Figura 7. Conteo de UFC de SE con tratamientos de osmolaridad a 37°C y 220 rpm. Se realizaron 5 repeticiones.\*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

### **6.3 Comparación de OmpA en condiciones diferentes de osmolaridad y temperatura**

El primer cuestionamiento sobre la proteína de interés fue conocer si su detección se modifica cuando la bacteria se cultiva en diferentes condiciones ambientales y para ello, se realizaron comparaciones de perfiles electroforéticos a partir de proteínas de membrana externa de la bacteria cultivada en los tratamientos mencionados anteriormente. La unidad de análisis (número de píxeles) se estimó a partir de los perfiles electroforéticos de proteínas. Las mediciones del tratamiento CNA a 37° C se fijaron con el valor de 1 ya que se utilizó como punto de referencia para realizar las comparaciones. La inferencia estadística determina que no existe efecto de interacción entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ) por lo que se evaluó a los efectos principales. Tanto la temperatura y osmolaridad no tienen diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) por lo que se concluye que los tratamientos usados en estos ensayos no modifican el nivel de detección de OmpA (Figura 8). De forma paralela, se realizó un *Western blot* para confirmar que la proteína que comparamos es OmpA, con un peso molecular de 34 kDa (Figura 9).



**Figura 8. Comparación de patrones electroforéticos de proteínas de membrana externa de SE.** La flecha indica la localización de OmpA, proteína de 34 kDa. La comparación con base en el número de píxeles detectados en el gel de acrilamida indica que no existe diferencia significativa ( $>0.05$ ). Gel de poliacrilamida al 14%, teñido con azul de Coomassie. Se realizaron 5 repeticiones.

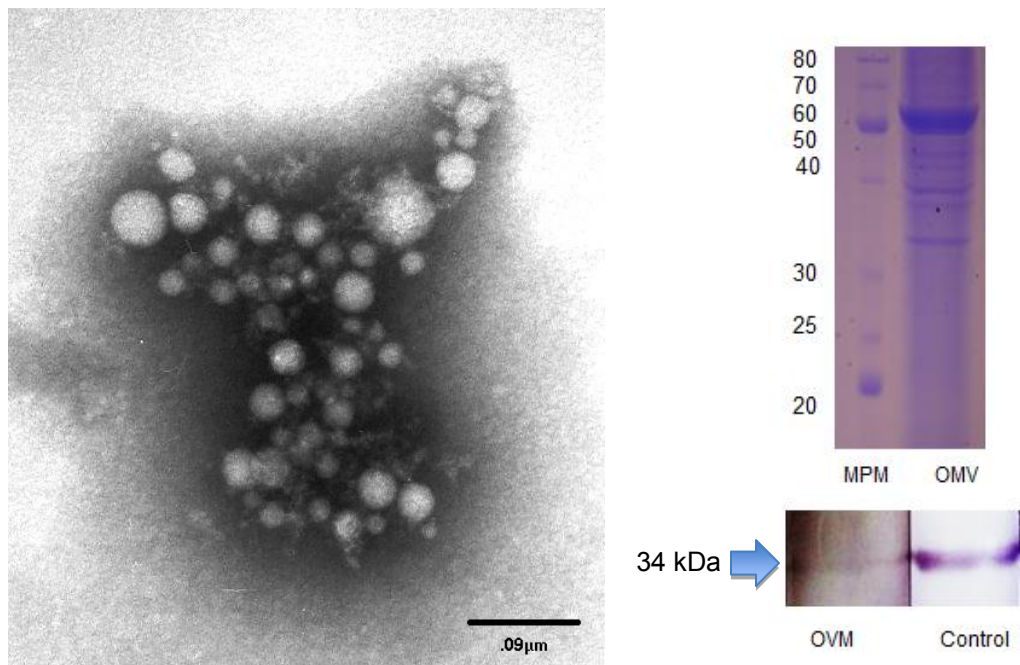


**Figura 9. Western blot de OmpA a partir de proteínas de membrana externa.** La flecha indica la localización de la bandas de detección de OmpA. En todos los tratamientos se detecta a la proteína. Anticuerpo policlonal de origen conejo 1:500 (anti OmpA de SG). Anticuerpo secundario anti-conejo 1:800. Se realizaron 5 repeticiones.

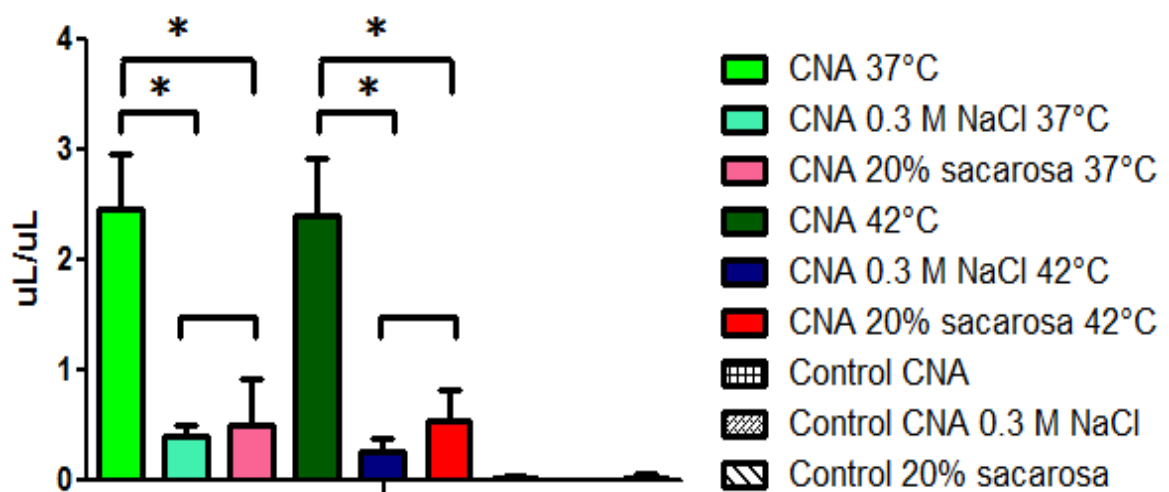
## 6.4 Vesículas de membrana externa

Las OMV se concentraron a partir cultivos de 50 mL con ácido tricloroacético al 10% (TCA). Las pastillas de OMV provenientes del tratamiento de CNA siempre fueron de mayor tamaño. La presencia de las vesículas se comprobó mediante microscopía electrónica y se observaron OMV de diámetros de 25 a 90 nm. Una vez estandarizado el método de obtención de vesículas, se evaluó si se mantenía la integridad de las proteínas. Mediante electroforesis desnaturizante se demostró que el método es efectivo. En paralelo, se identificó a la proteína OmpA a partir de OMV mediante *Western blot*. Para poder detectar una señal, se utilizaron por lo menos 100  $\mu$ m de proteína de OMV y pozos de mayor tamaño (Figura 10).

Una vez estandarizado el método de obtención de vesículas, se cuantificaron de forma indirecta mediante métodos colorimétricos, con uso de los reactivos de Bradford y ácido tiobarbitúrico, los cuales detectan a proteínas y LPS, respectivamente. Se observó que no existe efecto de interacción entre los factores ( $p > 0.05$ ). En la evaluación de efectos principales, se obtuvo que no hay diferencia significativa entre temperaturas pero sí entre los niveles de osmolaridad. La prueba de comparación de medias define al medio CNA como diferente a los otros dos ( $p < 0.05$ ). De esta forma, se concluye que la bacteria cultivada en CNA libera más vesículas, sin importar a que temperatura se incuba (Figuras 11 y 12).



**Figura 10. Izquierda: Vesículas de membrana externa de SE.** Microscopía electrónica de transmisión. Se observan vesículas de un diámetro de 25 a 51 nm. Aumento de 85000 X. Se realizó una toma fotográfica. **Derecha: Electroforesis desnaturizante y Western blot de OmpA a partir de OMV.** La flecha indica la localización de la bandas de detección de OmpA. Anticuerpo policlonal de origen conejo 1:50 (anti OmpA de SG). Anticuerpo secundario anti-conejo 1:800. Control de OMP de SE. Se realizaron 3 repeticiones.



**Figura 11. Cuantificación de proteínas por método colorimétrico (Bradford).** La lectura de absorbancia se realizó a 590 nm. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Se realizaron 3 repeticiones.



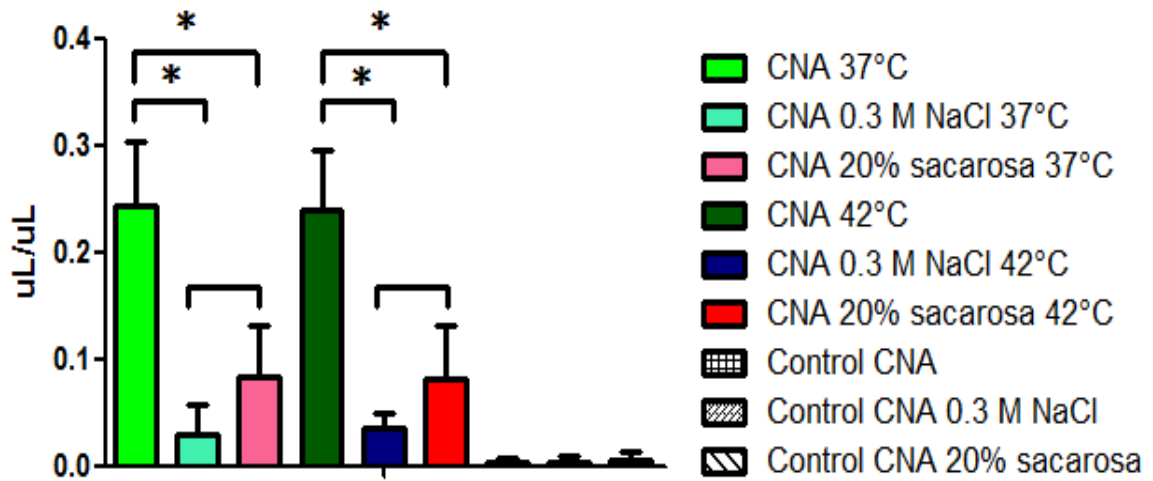


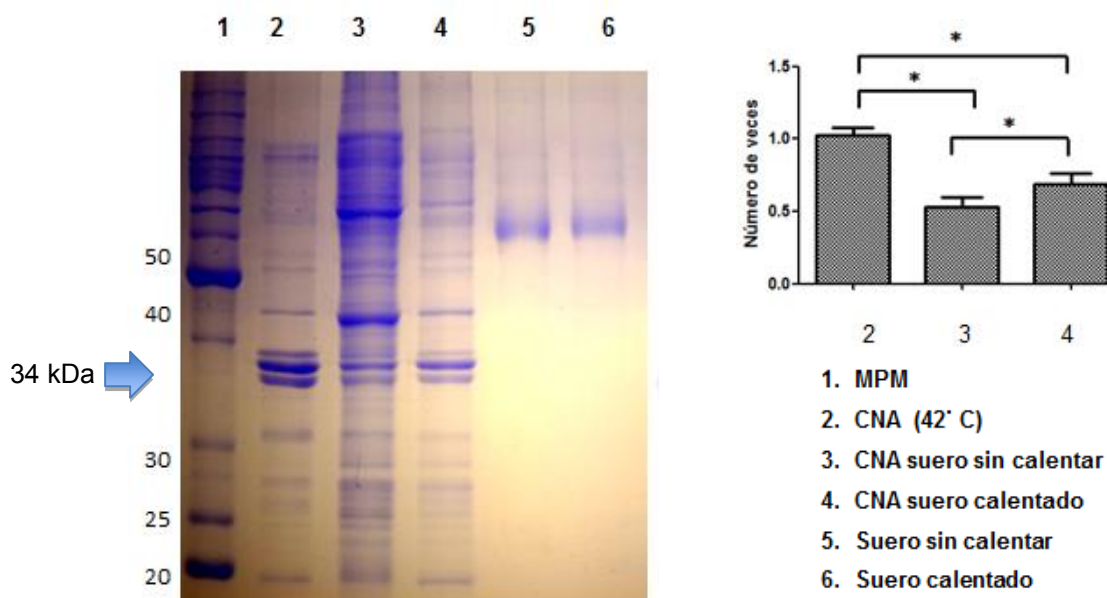
Figura 12. Cuantificación de KDO por método colorimétrico (ácido tiobarbitúrico). La lectura de absorbancia se realizó a 550 nm. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Se realizaron 3 repeticiones.

## 6.5 Comparación de OmpA a partir de OMP de SE cultivada en presencia de suero de ave SPF

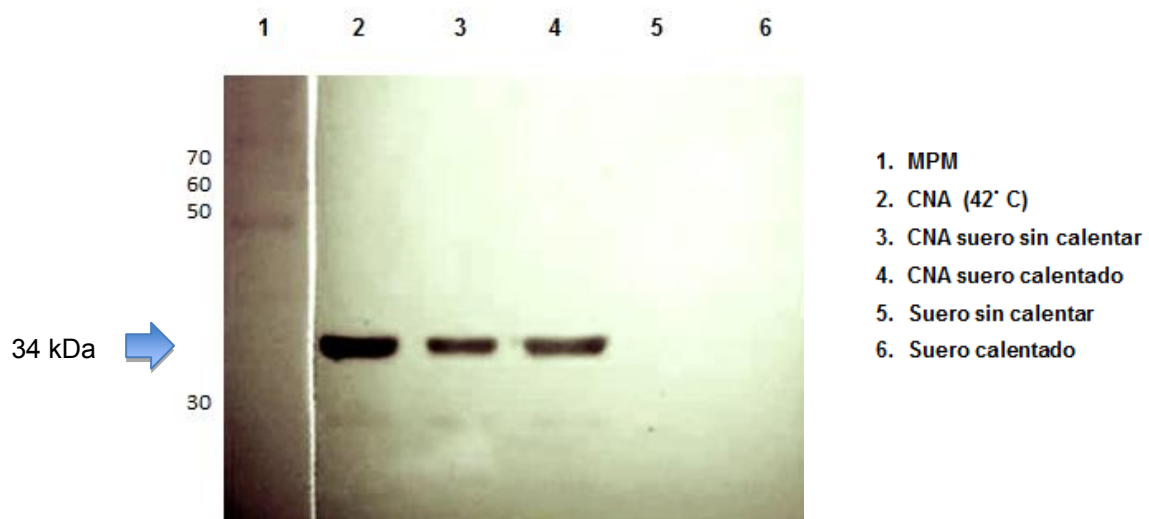
Una vez identificada la condición de mayor liberación de vesículas, se decidió utilizar la temperatura de 42°C en los ensayos finales, debido al interés que se tiene en la paratifoidea aviar. De forma inicial, se comparó a OmpA, a partir de proteínas de membrana externa de SE cultivada en las siguientes condiciones:

- CNA
- CNA 30% de suero de ave SPF sin calentar
- CNA 30% de suero de ave SPF calentado a 56° C.

El tratamiento CNA a 42° C se utilizó como punto de referencia para las comparaciones y por ello, el promedio de sus lecturas se fijaron con un valor de 1. La unidad de análisis (número de píxeles) indica que por lo menos un tratamiento es diferente ( $p < 0.05$ ). La prueba de comparación de medias determina que los tres tratamientos son diferentes ( $p < 0.05$ ). Así, la proteína OmpA disminuye su nivel de detección a la mitad, cuando la bacteria se cultiva en caldo CNA con 30% de suero de ave SPS sin calentar comparado con el primer tratamiento. Cuando el suero se trata a 56°C durante 30 min, la detección de la proteína disminuye pero no al mismo nivel que el tratamiento dos (Figura 13). De la misma forma que ensayos anteriores, OmpA se identificó con *Western blot* (Figura 14). Este resultado indica que la proteína OmpA modifica su nivel de detección cuando SE se cultiva en presencia de suero de ave SPS al 30%.



**Figura 13. Comparación de perfiles electroforesis de OMP de SE.** La flecha indica la localización de OmpA, proteína de 34 kDa. La comparación con base en el número de píxeles detectados en el gel de acrilamida indica que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Gel de poliacrilamida al 14%, teñido con azul de Coomassie. Se realizaron 5 repeticiones.

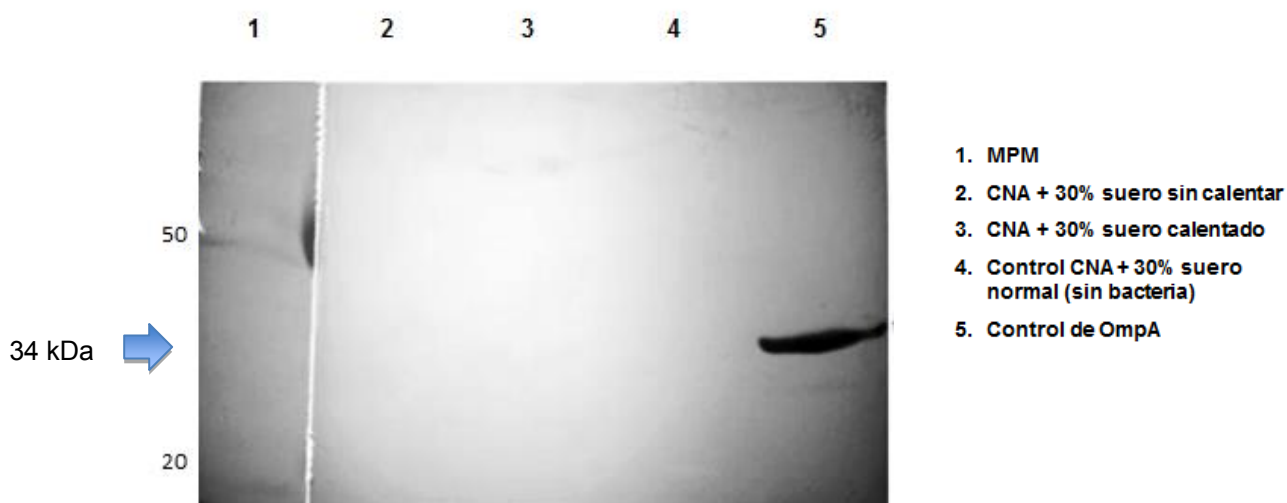


**Figura 14. Western blot de OmpA a partir de proteínas de membrana externa.** La flecha indica la localización de la bandas de detección de OmpA. Los niveles de detección corresponden a los observados en el gel de acrilamida. En los controles negativos no se detecta a OmpA. Anticuerpo policlonal de origen conejo 1:500 (anti OmpA de SG). Anticuerpo secundario anti-conejo 1:800. Se realizaron 5 repeticiones.

## 6.6 Evaluación de OmpA a partir de OMV de SE cultivada en presencia de suero de ave SPF

El último experimento consistió en detectar y comparar a OmpA a partir de vesículas de SE cultivada en presencia de suero. Se utilizó el mismo protocolo de concentración de OMV y las pastillas obtenidas fueron grandes debido a que también se precipitaba la albúmina contenida en el suero. Debido a que el ensayo requiere gran cantidad de proteínas de OMV para poder detectar una señal de OmpA en el *Western blot*, se colocaron grandes cantidades de proteína en los pozos, desde 250 µg a 1.2 mg. A causa de esto, la evaluación sólo se realizó con

el western-blot ya que la albúmina produce interferencia para poder observar a OmpA, en un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie. Además, se utilizó solamente un control debido que se contaba con un menor número de pozos ya que estos eran más anchos. El anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:500 y 1:50. El resultado es que ninguna combinación de las condiciones mencionadas logró detectar a OmpA (Figura 15). Este resultado sugiere que el procedimiento utilizado no fue el idóneo para poder identificar a OmpA en OMV y evaluarla.



**Figura 15. Western blot de OmpA a partir de vesículas de membrana externa.** La flecha indica la localización de la bandas de detección de OmpA. No existe detección de la proteína en tratamientos (carril 2 y 3). No existe detección de la proteína en control negativo (carril 4). Detección de OmpA en control positivo (carril 5). Anticuerpo policlonal de origen conejo 1:500 (anti OmpA de SG). Anticuerpo secundario anti-conejo 1:800. Se realizaron 5 repeticiones.

## DISCUSIÓN

En el desarrollo del presente trabajo, se demostró, mediante perfiles electroforéticos de OMPs, que la detección de OmpA de *S. Enteritidis* se modifica cuando la bacteria se cultiva en presencia de suero. A partir de OMV de los mismos cultivos, la proteína OmpA no se logró detectar con la metodología utilizada.

Este trabajo constituye el primer reporte donde se evalúa el crecimiento bacteriano de *Salmonella* Enteritidis bajo los tratamientos de osmolaridad CNA, CNA 0.3 M NaCl y CNA 20% sacarosa en combinación de las temperaturas 37° y 42°C. Se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano durante un periodo de 10 h y no existieron diferencias entre las cinéticas realizadas con diferentes temperaturas. En contraste, los tratamientos de osmolaridad sí provocaron una diferencia en las cinéticas de crecimiento. Aquellos cultivos incubados en las condiciones CNA y CNA 0.3 M NaCl resultaron ser iguales estadísticamente ( $>0.05$ ), caso contrario al tratamiento de CNA 20% sacarosa ( $<0.05$ ) en el que hay un menor crecimiento debido a lisis bacteriana ocasionada por el ambiente hipertónico.<sup>85</sup> El crecimiento de *Shewanella oneidensis* en la condición de 20% de sacarosa fue alrededor de 4 veces menos comparado con el medio sin sacarosa. Un cultivo de la misma bacteria incubado hasta su fase logarítmica media y posteriormente, colocado en la condición de estrés osmótica de sacarosa no creció más.<sup>86</sup> En el caso del tratamiento con NaCl, no se observa un efecto de estrés osmótico en el crecimiento bacteriano cuando se utiliza a 0.3 M pero concentraciones mayores

producen disminución del crecimiento. Se ha observado que *E. coli* 5K con diferentes concentraciones de NaCl muestran menor grado de crecimiento a partir de 0.5 M.<sup>87</sup> La mutación del gen *ksgA* en SE, que codifica para la proteína dimetil adenosine transferasa (KsgA), tiene un crecimiento menor con concentraciones igual o mayor del 6% NaCl a 37°C y 42°C.<sup>88</sup> Se requieren más estudios para entender el comportamiento de SE en diferentes condiciones ambientales. Un hallazgo en los experimentos de este trabajo es que una proteína de peso molecular de alrededor de 45 kDa modifica su detección cuando SE se cultiva a 37°C y 42°C.

Los cultivos utilizados en los ensayos de crecimiento bacteriano se aprovecharon para comparar a OmpA mediante perfiles electroforéticos. La OMPs se cosecharon inmediatamente después de que SE se cultivó durante 8 h, tiempo específico de la fase logarítmica tardía de la bacteria. El nivel de detección de OmpA no se modifica en ningún tratamiento, tal como se ha comprobado en trabajos realizados con *E. coli* y *S. Typhi* en los que se cultivaron con 0.3 NaCl y 20% sacarosa.<sup>89,90,91</sup> Condiciones de alta osmolaridad producen modificaciones en la detección de las proteínas mayoritarias OmpC y OmpF debido a que éstas se modulan por el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR.<sup>86,89,92,93</sup> Otros efectos se observan cuando se utilizan condiciones de estrés osmótico. La adherencia e invasión de *S. Typhi* sobre células de Henle es mayor cuando se cultiva en LB 0.3 M NaCl y el antígeno Vi es suprimido.<sup>94,95</sup> Además, la transcripción de los genes *sipB*, *sipC* y *sipD* son significativamente mayores en la presencia de alta osmolaridad en ST.<sup>96,97</sup>

La producción de OMV se evaluó en las mismas condiciones. El tamaño de la OMV fue de 25 a 51 nm, dentro del rango de varios trabajos.<sup>52,53,54</sup> Se demostró que la producción de vesículas de SE se modificó únicamente por efecto de osmolaridad. *Acinetobacter baylyi* cultivada con 0.5 M NaCl no produce prácticamente vesículas. Este hecho puede deberse a que el crecimiento bacteriano se reduce cuando se cultiva a la bacteria a esa osmolaridad.<sup>98</sup> En *Pseudomonas aeruginosa* se observó que la liberación de vesículas en células epiteliales bronquiales disminuyó, de 36%±6 en un medio de .3 M NaCl a 4%±1, después de 3 h.<sup>99</sup> Guyard-Nicodème observó mediante microscopía electrónica de transmisión que *P. fluorescens* libera OMV cuando se cultiva a 0.5 M NaCl mientras que no sucede así en ausencia de NaCl.<sup>100</sup> En la actualidad se desconoce la forma en que la osmolaridad influye en la producción de OMV. En casi todos los trabajos, la obtención de vesículas se realiza a partir de cultivo con baja osmolaridad como LB.<sup>54</sup> Aún se requieren diversos experimentos para conocer con mayor profundidad los mecanismos de producción de OMV cuando se utilizan diferentes condiciones de osmolaridad puesto que existe escasa información al respecto. En el presente trabajo se observó que CNA fue el cultivo donde se obtuvo mayor cantidad de OMV comparado con los tratamientos CNA 0.3 M NaCl y CNA 20% sacarosa en los que hubo poca cantidad de vesículas. Con este resultado, se utilizó CNA para realizar los últimos experimentos.<sup>54</sup>

La proteína OmpA de SE tiene modificación en su detección cuando la bacteria se cultiva con suero de ave SPF al 30%. El mismo efecto se observó en *S. gallinarum* a las 8 h de cultivo a 37°C.<sup>36</sup> La regulación de OmpA se da por diferentes

estímulos. Unos aumentan su expresión como la presencia de poliaminas y cultivo con pH ácido en anaerobiosis. Por otro lado, la adhesión a superficies abióticas y el crecimiento en la fase estacionaria disminuyen su expresión.<sup>101</sup> En este trabajo se observó una disminución del nivel de OmpA en presencia de suero, como se reportó en SG.<sup>102</sup> Este efecto podría deberse como mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata ya que la proteína resulta un blanco de la unión de la proteína sérica amiloide A lo cual incrementa la fagocitosis bacteriana<sup>103,104</sup> La proteína OmpA se ha asociado con resistencia al suero.<sup>45,105</sup> En *E. coli*, la expresión de OmpA participa en la sobrevivencia de la bacteria en suero e incrementa la bacteremia en ratas jóvenes.<sup>45</sup> La base de esta resistencia incluye interferencia con la activación del complemento. OmpA de *E. coli* K1 se une a la proteína fijadora del complemento C4bp por medio de las asas 1 y 2. Cuando C4bp se une a *E. coli*, actúa como cofactor del factor 1 que promueve la escisión de los factores del complemento C3b y C4b, lo que provoca inhibición del sistema del complemento.<sup>106,107,108,109</sup> En el caso de OmpA de *Yersinia pestis*, la proteína no produce un efecto de resistencia al suero pero sí un efecto de sobrevivencia intracelular.<sup>110</sup> También se sugiere que OmpA puede disminuir el reconocimiento de anticuerpos, complemento o ambos ya que la proteína se ha detectado en el sobrenadante de cultivo de *E.coli* con suero de humano, y de esa forma, los factores mencionados reconocerían a la proteína libre y no a la bacteria.<sup>45</sup> Para indagar más a fondo en este tema, se sugiere realizar cultivos bacterianos con presencia de fracciones de complemento en estudios posteriores. Por otra parte, se observó que otras proteínas de los perfiles electroforéticos del presente trabajo se modificaron por lo que se deben analizar en estudios posteriores.



Debido a que se obtienen dos patrones electroforéticos diferentes, cuando se utilizan suero calentado (30 min a 56°C) y sin tratar, valdría la pena evaluar la respuesta de animales inoculados con estas bacterias y compararlos con la cepa parental. La modificación del electroferotipo se ha observado en las bacterias cultivadas en suero de humano: *K. pneumoniae*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Hadar*.<sup>111</sup>

Finalmente, se realizó la detección de OmpA a partir de OMV de cultivos incubados en presencia de suero. La metodología utilizada no permitió el reconocimiento de la proteína aunque no significa que esté ausente. Probablemente, el método utilizado no es el óptimo ya que, durante el proceso de precipitación con TCA, las vesículas se encuentran en una pastilla compuesta en su mayoría por albúmina proveniente del suero de ave, lo cual dificulta el procesamiento de las moléculas de interés. Otra condición que influye en la detección de moléculas a partir de OMV es la cantidad de medio de cultivo que se utiliza y el método de purificación. Desafortunadamente, no se contaba con el recurso necesario para adquirir perlas magnéticas para facilitar la purificación o suero para trabajar con medios de cultivo de más de 50 mL. Se ha identificado a OmpA a partir del sobrenadante de cultivos de *E. coli* cultivada con suero de humano; la purificación se realizó con perlas magnéticas.<sup>112</sup> Si se ocupa un volumen mayor de cultivo, es más probable detectar a la proteína.<sup>113</sup> En adición, el uso de una bacteria alta productora de OMV ayudaría, por ejemplo se ha visto que la mutante de TolR (OMP que tiene interacción con peptidoglicano) produce una mayor cantidad de vesículas.<sup>114</sup> En el caso del lavado, se utilizó etanol para no

alterar la estructura de las OMV. Algunos trabajos refieren el uso de acetona, sin embargo, por tratarse de un solvente orgánico, éste puede alterar a las OMV por lo que no es recomendable, puesto que el interés es tener a las proteínas insertadas en las vesículas nativas debido a que se consideran un adyuvante.<sup>114</sup>

OmpA es una proteína de interés debido a que produce respuestas como la inducción de citocinas en macrófagos y la maduración de células dendríticas,<sup>48,49</sup> sin embargo, su inoculación en aves produce una respuesta inmune pero no protectora frente a un desafío.<sup>115</sup> Por esa razón, se considera que OmpA podría inducir una respuesta protectora si se inocula en conjunto de elementos antigénicos de superficie de la bacteria, tal como sucede en OMV. El ejemplo de éxito corresponde a las OMV de *Neisseria meningitidis* las cuales poseen a la proteínas mayoritarias PorA y PorB.<sup>70,71,72</sup> En el caso de esta investigación, se esperaba identificar un nivel mayor de detección de OmpA a partir de vesículas de SE cultivada con suero de gallina SPF. Aunque no se logró obtener, no se descarta la detección de la proteína a partir de los cultivos con presencia de suero.

## CONCLUSIONES

- Diferentes condiciones ambientales de osmolaridad y temperatura no modificaron la detección de la proteína OmpA de *Salmonella* Enteritidis.
- La producción de OMV de *Salmonella* Enteritidis se modifica por diferentes condiciones de osmolaridad pero no de temperatura.
- La presencia de suero de ave SPF al 30% en el medio de cultivo modifica la detección de OmpA en OMPs de *Salmonella* Enteritidis.
- Con la metodología utilizada, no se logró identificar a OmpA en OMV de *Salmonella* Enteritidis cultivada en presencia de suero de ave SPF al 30%.

## **PROSPECTIVA**

- Purificar el sobrenadante de cultivos de SE con presencia de suero usando perlas magnéticas y un volumen mayor de cultivo para evaluar a OmpA.
- Evaluar a OmpA de SE cultivada con diferentes fracciones de complemento.
- Valorar el uso de OmpA como acarreador de epítopos heterólogos.

## ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO

### Caldo nutritivo A (CNA)

Caldo nutritivo. Difco	7 g
Extracto de levadura. Bioxon	1 g
Glicerol. Sigma	2 mL
K <sub>2</sub> HP <sub>4</sub> . JT Baker	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> JT Baker	1.3 g

Se aforó a 1000 mL con agua destilada, esterilizó y almacenó a temperatura ambiente. Cuando se combinó con suero de ave SPF (30% final), se preparó el medio 1.42 veces más concentrado y se mezclaron 35 ml de CNA con 15 ml suero.

### CNA 0.3 molar NaCl

Caldo nutritivo. Difco	7 g
Extracto de levadura. Bioxon	1 g
Glicerol. Sigma	2 mL
K <sub>2</sub> HP <sub>4</sub> . JT Baker	3.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> JT Baker	1.3 g
NaCl	17.53 g

Se aforó a 1000 mL con agua destilada, esterilizó y almacenó a temperatura ambiente.

### CNA 20% de sacarosa

Caldo nutritivo. Difco	23.32 g
Extracto de levadura. Difco	3.32 g
Glicerol. Sigma	4.64 mL
K <sub>2</sub> HP <sub>4</sub> . JT Baker	12.32 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> JT Baker	4.32 g

Se aforó a 1000 mL con agua destilada, esterilizó y almacenó a temperatura ambiente. Se mezclaron 15 ml de medio, 20 ml de la solución stock de sacarosa al 50% y 15 ml de agua estéril.

### **Sacarosa al 50%**

Sacarosa. Bioxon

50 g

Se aforó a 100 mL con agua MiliQ y se filtró con membrana de 0.45 micrómetros. La prueba de esterilidad se realizó mediante la siembra de 100 µl del material filtrado en agar CNA.

### **Agar CNA**

Caldo nutritivo. Difco

7 g

Extracto de levadura. Difco

1 g

Glicerol. Sigma

2 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. JT Baker

3.7 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. JT Baker

1.3 g

Agar bacteriológico. MCD Lab

15 g

Se aforó a 1000 ml con agua desionizada, se esterilizó y se sirvió en cajas petri.

## ANEXO 2. SOLUCIONES

### PBS

NaCl. Merk	32 g
KCl. JT Baker	0.6 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . JT Baker	4.32 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . JT Baker	0.72 g

Se ajustó el pH a 7.4, se aforó a 3000 ml con agua destilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

### Solución amortiguadora de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH7.2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M pH 7.2 JT Baker	1.4196 g
---	----------

Se aforó a 1000 ml con agua desionizada, se esterilizó y se almacenó a 4°C.

### Solución amortiguadora de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2 con 2% de tritón

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M pH 7.2 JT Baker	98 ml
Tritón X-100. USB	2 ml

### ➤ Geles de poliacrilamida-SDS, electroforesis y transferencia

#### Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 Sigma

Tris base. USB	18.17 g
----------------	---------

Se homogenizó el contenido con un poco de agua desionizada, se ajustó el pH a 8.8 con HCl, se aforó a 100 ml y se esterilizó. Al día siguiente, a temperatura de 25°C, se midió el pH y se ajustó sólo en caso de que hubiera variación.

#### Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Tris base. USB	6 g
----------------	-----

Se homogenizó el contenido con un poco de agua desionizada, se ajustó el pH a 6.8 con HCl, se aforó a 100 ml y se esterilizó. Al día siguiente, a temperatura de 25°C, se midió el pH y se ajustó sólo en caso de que hubiera variación.

### **Acrilamida**

Acrilamida. GE Healthcare 29 g  
Bisacrilamida. Bio-Rad 1 g

Se aforó a 100 ml con agua desionizada, se filtró con una membrana Whatman y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C

### **Persulfato de amonio al 10% (PSA)**

Persulfato de amonio. Técnica química 20 mg

Se aforó a a 200 µl de agua desionizada y se preparó el mismo día de uso.

### **Amortiguador de muestra**

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 1 mL  
Glicerol. Sigma 0.8 mL  
SDS al 10%. Sigma 1.6 mL  
2-mercaptoetanol. Sigma 0.4 mL  
Azul de bromofenol. Aldrich cristales

Se aforó a 4 ml con agua desionizada y se almacenó a 4°C.

### **Preparación de gel separador al 14%**

Agua desionizada 2.6 mL  
Poliacrilamida al 30%. GE Healthcare/Bio-Rad 4.7 mL  
Tris 1.5 M (pH 8.8). USB 2.5 mL  
10% SDS. Sigma 0.1 mL  
10% Persulfato de amonio. Técnica química 0.1 mL  
TEMED. Gibco BRL 0.004 mL  
Volumen 10 mL

### **Preparación de gel concentrador**

Agua desionizada 2.7 mL  
Poliacrilamida al 30%. GE Healthcare/Bio-Rad 0.67 mL  
Tris 1.5 M (pH 8.8). USB 0.5 mL  
10% SDS. Sigma 0.04 mL  
10% Persulfato de amonio. Técnica química 0.04 mL  
TEMED. Gibco BRL 0.004 mL  
Volumen 10 mL



### **Solución amortiguadora de corrida (Tris glicina 5X)**

Tris base. Usb	25 mM	15.1 g
Glicina. Sigma	250 mM	94 g
SDS 10%. Sigma		50 ml

Se aforó a 1000 ml con agua desionizada y se almacenó a temperatura ambiente.

### **Solución amortiguadora de transferencia**

Tris base. USB	48 mM	2.9 g
Glicina. Sigma	39 mM	5.8 g
SDS. Sigma	0.037%	0.37 g
Metanol. JT Baker	20%	200 ml

Se aforó a 1000 ml con agua desionizada y se almacenó a temperatura ambiente.

### **➤ Concentración de vesículas y cuantificación de proteínas**

#### **BSA**

BSA. Sigma 1 mg/ml de agua desionizada.  
Se filtró con membrana de 0.22  $\mu$ m y se almacenó a -20°C.

#### **Ácido fosfórico al 85%**

Ácido fosfórico. JT Baker 85 mL  
Se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

#### **Reactivo de Bradford**

Azul de Coomassie G-250. Baker Analyzed	0.01 g
Etanol absoluto. JT Baker	5 mL
Ácido fosfórico al 85%. JT Baker	10 mL

Se aforó a 100 ml con agua desionizada, se filtró con papel whatman y se almacenó en frasco ámbar a 4°C.

### **Ácido tricloroacético al 100% (TCA)**

Ácido tricloroacético. Merk 500 g  
Agua desionizada 227 mL  
Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **SOLUCIONES PARA CUANTIFICAR KDO**

#### **Ácido sulfúrico 0.2 N**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 N). J.T. Baker 1 mL  
H<sub>2</sub>O desionizada c.b.p. 100 mL  
Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

#### **Ácido sulfúrico 0.125 N (2X)**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 N). J.T. Baker 1 mL  
H<sub>2</sub>O desionizada c.b.p. 80 mL  
Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

#### **Peryodato 0.04 M (2X)**

HIO<sub>4</sub>. Laitz 1.82 g  
H<sub>2</sub>O desionizada c.b.p. 100 mL  
Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

#### **Ácido clorhídrico 0.5 N (2X)**

Se utilizó ácido clorhídrico de presentación comercial a 1 N. J.T. Baker

#### **Arsenito 2% (2X)**

NaAsO<sub>2</sub>. Sigma 5.2 g  
H<sub>2</sub>O desionizada c.b.p. 100 mL  
Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

#### **DMSO**

Se utilizó DMSO de la presentación comercial. Merck

### **TINCIONES**

#### **Tinción de Coomassie**

Etanol absoluto. JT Baker 45 ml  
Ácido acético. Reproquifin 10 ml  
Azul brillante de Coomassie al 0.05%. Baker Analyzed 0.25 g

Aforar a 100 ml con agua desionizada y filtrar con papel Whatman No 2.  
Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **Solución desteñidora para tinción de Coomassie**

Metanol absoluto. JT Baker	90 mL
Ácido acético. Reproquifin	20 mL
Azul brillante de Coomassie al 0.05%. Baker Analyzed	90 mL

Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

### **Solución reveladora**

Metanol. JT Baker.	20 mL
4-cloro-1 naftol. Sigma	60 mg
Peróxido de hidrógeno.	100 $\mu$ L
PBS	100 mL

La reacción de revelado se detuvo con agua fría cuando se observaron bandas en el *western-blot*.

## REFERENCIAS

- 
- <sup>1</sup> Uzzau S, Brown DJ, Wallis BT, Rubino S, Leori G, Bernard S, *et al.* Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 2000;125(2):229–255.
- <sup>2</sup> Chin, James. El control de las enfermedades transmisibles. 17<sup>a</sup> ed. Washington, DC: OPS, 2001. (Publicación Científica y Técnica No. 581)
- <sup>3</sup> European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2015;13(1):1-165.
- <sup>4</sup> Bokkenheuser J. Detection of Typhoid Carriers. *Am J Public Health* 1964;54:477–486.
- <sup>5</sup> CDC. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – Foodborne Diseases Active. Surveillance network, 10 US Site, 2006-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015; 64(18):485-512.
- <sup>6</sup> Voetsch AC, Gilder TJV, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, *et al.* FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. *Clin Infect Dis* 2004;38.
- <sup>7</sup> Stevens MP, Humphrey TJ, Maskell DJ. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:2709-23.
- <sup>8</sup> Holt JG, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. USA: Williams & Wilkins, 1984.
- <sup>9</sup> List of prokariotic names with standing in nomenclature (en línea). LPSN; (actualizado el 18 de junio de 2015; citado el 18 de septiembre de 2015). Genus *Salmonella* (alrededor de 3 páginas). Disponible desde: <http://www.bacterio.net/salmonella.html>
- <sup>10</sup> Barrow GI, Feltham RKA, editors. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3th ed. Cambridge:Cambridge University Press, 1993.
- <sup>11</sup> Grimont PAD, Weill FX. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. 9<sup>th</sup> ed. Paris: WHO, 2007.
- <sup>12</sup> Dirección General de Epidemiología (en línea). DGE; (actualizado el 19 de agosto de 2015, citado el 16 de octubre de 2015). Boletín epidemiológico, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica; (alrededor de 3 páginas). Disponible desde: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem01.pdf>

- 
- <sup>13</sup> Silva EN, Duarte A. *Salmonella* Enteritidis in Poultry: Retrospective in Brazil. Rev Bras Cienc Avic 2002;4:85-100.
- <sup>14</sup> NORMA Oficial Mexicana NOM-005-Z00-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. México (DF): SAGARPA, 2006.
- <sup>15</sup> Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (en línea). SAGARPA; (actualizado el 2 de enero de 2012, citado el 16 de abril de 2012). Dirección de epidemiología y análisis de riesgo; (alrededor de 3 páginas). Disponible desde: [www.senasica.gob.mx/?doc=20328](http://www.senasica.gob.mx/?doc=20328)
- <sup>16</sup> Banning M. Salmonella: epidemiology, pathogenesis and management. Gastrointestinal Nursing 2006;4:20-25.
- <sup>17</sup> Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública México 2000;42:490-495.
- <sup>18</sup> European Food Safety Authority (en línea). EFSA; (actualizado el 14 de noviembre de 2011, citado el 16 de abril de 2012). Salmonella. (alrededor de 4 páginas). Disponible desde: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>
- <sup>19</sup> Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (en línea). USDA; (actualizado el 24 de junio de 2011, citado el 16 de abril de 2012). Foodborne Illness Cost Calculator: *Salmonella*; (alrededor de 4 páginas). Disponible desde: [http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/salm\\_Intro.asp](http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/salm_Intro.asp)
- <sup>20</sup> Santos AC, Roberts JA, Cook AJ, Simons R, Sheehan R, Lane C, *et al.* Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis in England: costs to patients, their families, and primary and community health services of the NHS. Epidemiol Infect 2011; 139(5):742-53.
- <sup>21</sup> Universidad de California (en línea). UCDAVIS; (citado el 19 de noviembre de 2015). Economic impact of the *Salmonella* Enteritidis control program to the Egg Industry in California (alrededor de 3 páginas). Disponible desde: <http://animalscience.ucdavis.edu/avian/kinde.pdf>
- <sup>22</sup> Unión Nacional de Avicultores (en línea). UNA (actualizado el 10 de agosto de 2015, citado el 17 de agosto de 2015) Indicadores económicos (alrededor de 4 páginas). Disponible desde: <http://www.una.org.mx/index.php/component/content/article/2-uncategorised/19-indicadores-economicos>
- <sup>23</sup> Smith HW. The susceptibility of different breeds of chickens to experimental *Salmonella* Gallinarum infection. Poult Sci 1956;35(3):701-705.
- <sup>24</sup> Suzuki S. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. Int J Food Microbiol 1994;21:89-105.

- 
- <sup>25</sup> Ivan Dinev. (en línea). The poultry site (última actualización en 2014, citado el 16 de abril de 2014). Poultry News, Health, Welfare, Diseases, Markets and Economics; alrededor de 4 páginas). Disponible desde: <http://www.thepoultrysite.com/publications/6/diseasesofpoultry/180/paratyphoid-infections/>
- <sup>26</sup> Shivaprasad HL, *et al.* Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Dis* 1990;34(3):48-557.
- <sup>27</sup> García-del Portillo F, Foster JW, Finlay BB. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella* Typhimurium virulence. *Infect Immun.* 1993;61(10):4489-4492.
- <sup>28</sup> Mølbak K, Olsen JE, Wegener HC. *Salmonella* infections: chapter 3. In Riemann HP, Cliver DO, editors, *Foodborne infections and intoxications*. Elsevier Science. 2006.
- <sup>29</sup> Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:53-66.
- <sup>30</sup> Orchard RC, Alto NM. Mimicking GEFs: a common theme for bacterial pathogens. *Cellular Microbiology* 2012;14(1):10–18
- <sup>31</sup> Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Immerseel FV. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33:718–738.
- <sup>32</sup> Mario-Padron N. *Salmonella typhimurium* Penetration through the Eggshell of Hatching Eggs. *Avian Diseases* 1990;34(2):463-465.
- <sup>33</sup> Desin TS, Köster W, Potter AA. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. *Expert Rev Vaccine* 2013 ;12(1):87-96.
- <sup>34</sup> Bautista-Cruz BE. Validación en campo de un inmuno ensayo enzimático para el diagnóstico de la tifoidea aviar (tesis de licenciatura). DF, México: UNAM, 1996.
- <sup>35</sup> Huerta L, López-Vidal Y, Suárez F, Willms K, Verdugo-Rodríguez A. Detección de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* útiles para el diagnóstico. Memorias de XI Congreso Internacional de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica., III Congreso Nacional de Antimicrobianos y Quimioterapia; 1996; Guadalajara (Jal) México.
- <sup>36</sup> Vega-Manríquez DX. Caracterización parcial del gene *ompA* de *Salmonella gallinarum* (Tesis de maestría).DF, México: UNAM, 2000.

- 
- <sup>37</sup> Hernández-Morales I. Elaboración y evaluación de una vacuna de ADN contra la proteína de membrana externa A (ompA) de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis para aves de postura. UNAM (tesis de licenciatura), 2008.
- <sup>38</sup> Negoda A, Negoda E, Reusch RN. Resolving the native conformation of *Escherichia coli* OmpA. FEBS J 2010;277(21):4427-37.
- <sup>39</sup> Freudl R, Cole ST. Cloning and molecular characterization of the *ompA* Gene from *Salmonella* Typhimurium. Eur J Biochem 1983;134:497-502.
- <sup>40</sup> Puohiniemi R, Karvonen M, Vuopio-Varkila J, Moutiala A, Helander I, Sarvas M. A strong antibody response to the periplasmic C-terminal domain of the OmpA protein of *Escherichia coli* is produced by immunization with purified OmpA or with whole *E. coli* or *Salmonella* Typhimurium bacteria. Infect Immun 1990;58:1691–1696.
- <sup>41</sup> Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y, Henning U. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. J Bacteriol 1978;136(1):280–285.
- <sup>42</sup> Morona R, Klose M, Henning U. *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. J Bacteriol 1984;159:570–578.
- <sup>43</sup> Sanderson KE, Janzer J, Head J. Influence of lipopolysaccharide and protein in the cell envelope on recipient capacity in conjugation of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 1981;148:283-93.
- <sup>44</sup> Nicholson TF, Watts KM, Hunstad DA. OmpA of Uropathogenic *Escherichia coli* promotes postinvasion pathogenesis of cystitis. Infect Immun 2009;77(12):5245-51.
- <sup>45</sup> Weiser JN, Gotschlich EC. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. Infect Immun 1991;59:2252-2258.
- <sup>46</sup> Wang Y. The Function of OmpA in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2002;292:396–401.
- <sup>47</sup> Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Roni A, Rusnati M, Presta M, Maina V, Magistrelli G, Haeuw JF, *et al.* Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. Immun 2002;551-560.
- <sup>48</sup> Jeannin P, Magistrelli G, Goetsh L, Haeuw JF, Thieblemont N, Bonnefoy JY, *et al.* Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. Vaccine 2002;20:23-7.

- 
- <sup>49</sup> Jeannin P, Renno T, Goetsch L, Miconnet I, Aubry JP, Delneste Y, *et al.* OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat* 2000;1:502-509.
- <sup>50</sup> Bergman MA, Cummings LA, Barrett SLR, Smith KD, Lara JC, Aderem A, Cookson BT. CD4<sup>+</sup> T Cells and Toll-like receptors recognize *Salmonella* antigens expressed in bacterial surface organelles. *Infect Immun* 2005;73(3):1350-6.
- <sup>51</sup> Ochoa-Repáraz J, Sesma B, Álvarez M, Renedo MJ, Irache JM, Gamazo C. Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella* Enteritidis against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet Res* 2004; 35:291-298.
- <sup>52</sup> Kuehn MJ, Kesty N. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 2005;19:2645-55.
- <sup>53</sup> Deatherage BL, Lara JC, Bergsbaken T, Barrett SLR, Lara S, Cookson BT. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol* 2009;72:1395-1407.
- <sup>54</sup> Chatterjee SN, Chaudhuri Keya. Outer membrane vesicles of bacteria. Verlag Berlin Heidelberg:Springer, 2012.
- <sup>55</sup> Terri N. Ellis and Meta J. Kuehn. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74(1):81-94.
- <sup>56</sup> Schertzer JW, Whiteley M. A Bilayer-Couple Model of Bacterial Outer Membrane Vesicle Biogenesis. *mBio* 2012;3(2):e00297-11.
- <sup>57</sup> Tashiro Y, Ichikawa S, Nakajima-Kambe T, Uchiyama H, Nomura N. Pseudomonas quinolone signal affects membrane vesicle production in not only gram-negative but also gram-positive bacteria. *Microbes Environ* 2010;25(2):120-5.
- <sup>58</sup> McBroom AJ, Kuehn MJ. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* 2007;63:545-558.
- <sup>59</sup> McMahon KJ, Castelli ME, Vescovi EG, Feldman MF. Biogenesis of Outer Membrane Vesicles in *Serratia marcescens* Is Thermoregulated and Can Be Induced by Activation of the Rcs Phosphorelay System. *J Bacteriol.* 2012;194(12): 3241–3249.
- <sup>60</sup> Kadurugamuwa, J. L., and T. J. Beveridge. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* 177:3998–4008.



- 
- <sup>61</sup> Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews microbiology* 2015;13:605-619.
- <sup>62</sup> Manning, A. J. & Kuehn, M. J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* 2011;11:258.
- <sup>63</sup> Schooling SR, Hubley A, Beveridge TJ. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 2009;191:4097–4102.
- <sup>64</sup> Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* 2006;188: 5945–5957.
- <sup>65</sup> Beveridge TJ. Structure of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 1999;181: 4725-2733.
- <sup>66</sup> Yoon H, Ansong C, Adkins JN, Hedffron F. Discovery of *Salmonella* virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infect Immun* 2011;49:2182.
- <sup>67</sup> Alaniz RC, Deatherage BL, Lara JC, Cookson BT. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella* Typhimurium that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J Immunol* 2007;179:7692-701.
- <sup>68</sup> Park SB, Jang HB, Nho SW, Cha IS, Hikima J, Ohtani M, Aoki T, Jung TS. Outer Membrane Vesicles as a Candidate Vaccine against Edwardsiellosis. *PLoS One* 2011;6(3):e17629.
- <sup>69</sup> Jae-Young K, et al. Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *J Mol Biol* 2008;380(1):51-66.
- <sup>70</sup> Santos S, Arauz LJ, Baruque-Ramos J, Lebrun I, Carneiro SM, Barreto SA, Schenkman RP. Outer membrane vesicles (OMV) production of *Neisseria meningitidis* serogroup B in batch process. *Vaccine* 2012;14;30(42):6064-9.
- <sup>71</sup> Dan M. Granoff. Review of Meningococcal Group B Vaccines. *Clin Infect Dis* 2010;50(Supplement 2):S54-S65.
- <sup>72</sup> Nøkleby H, Aavitsland P, O'Hallahan J, Feiring B, Tilman S, Oster P. Safety review: two outer membrane vesicle (OMV) vaccines against systemic *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine*. 2007;25(16):3080-4.
- <sup>73</sup> Kuehl RO, Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis. Pacific Grove, CA: Duxbury/Thomson Learning, 2000.
- <sup>74</sup> Matsuyama S, Inokuchi K, Mizushima S. Promoter exchange between *ompF* and *ompC*, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1984;158(3):1041–1047.

- 
- <sup>75</sup> Yoon H, Ansong C, Adkins JN, Heffron F. Discovery of *Salmonella* Virulence Factors Translocated via Outer Membrane Vesicles to Murine Macrophages. *Infect Immun* 2011;79(6):2182–2192.
- <sup>76</sup> Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- <sup>77</sup> Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York :Cold Spring Harbor Lab Press,1989.
- <sup>78</sup> Herla V, De Alaniz MJT, Bakás L. Role of lipopolysaccharide on the structure and function of  $\alpha$ - hemolysin from *Escherichia coli*. *Chem Phys Lipids* 2005;135(2):107-15.
- <sup>79</sup> Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat* 1970;227(5259): 680-685.
- <sup>80</sup> Meyer TS, Lambert, BL. Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta* 1965;107(1):144–145.
- <sup>81</sup> Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76 (9): 4350–54.
- <sup>82</sup> Corley RB. *A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*. New York:Springer, 2005.
- <sup>83</sup> Park KS, Choi KH, Kim YS, Hong BS, Kim OY, Kim JH, et al. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* induce systemic inflammatory response syndrome. *PLoS One*.2010;5:e11334.
- <sup>84</sup> National Institutes of Health (en línea). NIH (actualizado el 18 de septiembre de 2015, citado el 21 de septiembre de 2015). ImageJ. (alrededor de 4 páginas). Disponible desde: <http://imagej.nih.gov/ij/>
- <sup>85</sup> Scheie PO. Plasmolysis of *Escherichia coli* B/r with Sucrose. *Journal of Bacteriology* 1969;98(2):335-346.
- <sup>86</sup> Yuan J, Wei B, Shi M, Gao H (2011) Functional Assessment of EnvZ/OmpR Two-Component System in *Shewanella oneidensis*. *PLoS ONE* 6(8):e23701.
- <sup>87</sup> Balsalobre C, Johansson J, Uhlin BE, Juárez A, Muñoa FJ. Alterations in Protein Expression Caused by the *hha* Mutation in *Escherichia coli*: Influence of Growth Medium Osmolarity. *J Bacteriol* 1999;181(10):3018–3024.
- <sup>88</sup> Chiok KL, Addwebi T, Guard J, Shah DH. Dimethyl adenosine transferase (KsgA) deficiency in *Salmonella enterica* serovar enteritidis confers susceptibility to

---

high osmolarity and virulence attenuation in chickens. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:7857–7866.

<sup>89</sup> Puente JL, Verdugo-Rodríguez A, Calva E. Expression of *Salmonella* Typhi and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity; dependence on *Escherichia coli* OmpR. *Mol Microbiol* 1991;(5):1205-1210.

<sup>90</sup> Martínez-Flores I, Cano R, Bustamante VH. The *ompB* Operon partially Determines differential expression of OmpC in *Salmonella* Typhi and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999;(2):556.

<sup>91</sup> Forst S, Delgado J, Ramakrishan G, Inouye M. Regulation of *ompC* and *ompF* Expression in *Escherichia coli* in the Absence of *envZ*. *Journal of Bacteriology* 1988;170(11):5080-5085.

<sup>92</sup> Cai SJ, Inouye M. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2002;277(27):24155-61.

<sup>93</sup> Martínez-Flores I, Cano R, Bustamante VH, Calva E, Puente JL. The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1999;181(2):556-62.

<sup>94</sup> Tartera C, Metcalf ES. Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella typhi* adherence to and invasion of human intestinal cells. *Infect Immun*. 1993;61(7):3084–3089.

<sup>95</sup> Zhao L, Ezaki T, Li Z, Kawamura Y, Hirose K, Watanabe H. Vi-Suppressed Wild Strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's Patches. *Microbiol Immunol* 2001;45(2):149–158.

<sup>96</sup> Huang X, Xu H, Sun X, Ohkusu K, Kawamura Y, Ezaki T. Genome-wide scan of the gene expression kinetics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi during hyperosmotic Stress. *Int J Mol Sci* 2007, 8:116-135.

<sup>97</sup> Arricau N, Hermant D, Waxin H, Ecobichon C, Duffey PS, Popoff MY. The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol Microbiol* 1998;29(3):835-850.

<sup>98</sup> Fulsundar S, Harms K, Flaten GE, Johnsen PJ, Chopade BA, Nielsen KM. Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of *Acinetobacter baylyi* and Effects of Stress on Vesiculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;80(11):3469-3483.

<sup>99</sup> Jolly AL, Takawira D, Oke OO, Whiteside SA, Chang SW, Wen ER, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*-induced bleb-niche formation in epithelial cells is independent of actinomyosin contraction and enhanced by loss of cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator osmoregulatory function. *mBio*

---

2015;6(2):e02533-14.

<sup>100</sup> Guyard-Nicodème M, Bazire A, Hémerly G, Meylheuc T, Mollé D, Orange N, *et al.* Outer membrane Modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in response to hyperosmolarity. *Journal of Proteome Research* 2008;7:1218–1225.

<sup>101</sup> Smith GJS, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* 2007;273:1–11.

<sup>102</sup> Vega-Manriquez X, Huerta-Ascencio L, Martínez-Gómez D, López-Vidal Y, Verdugo-Rodríguez A. Influence of heat-labile serum components in the presence of OmpA into the outer membrane of *Salmonella gallinarum*. Artículo enviado para su publicación.

<sup>103</sup> Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 2005;280:18562-18567.

<sup>104</sup> Shah C, Hari-Dass R, Raynes JG. Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* 2006;108:1751-1757.

<sup>105</sup> Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, *et al.* Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest* 2003;111:1589-1602.

<sup>106</sup> Prasadarao NV, Blom AM, Villoutreix BO, Linsangan LC. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. *J Immunol* 2002;169:6352–6360.

<sup>107</sup> Wooster DG, Maruvada R, Blom AM, Prasadarao NV. Logarithmic phase *Escherichia coli* K1 efficiently avoids serum killing by promoting C4b-mediated C3b and C4b degradation. *Immunology* 2006;117:482–493

<sup>108</sup> Miajlovic H, Smith SG. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol Lett* 2014;354:1–9.

<sup>109</sup> Rooijackers SHM, Van Strijp JAG. Bacterial complement evasion. *Molecular Immunology* 2007;44: 23–32.

<sup>110</sup> Bartra SS, Gong X, Lorica CD, Jain C, Nair MK, Schifferli D, *et al.* The outer membrane protein A (OmpA) of *Yersinia pestis* promotes intracellular survival and virulence in mice. *Microb Pathog* 2012 Jan;52(1):41-6.

<sup>111</sup> Sarowska J, Bugla-Płoskońska G, Futoma-Kołodziej B, Drulis-Kawa Z. The Sensitivity Level of *Salmonella Enterica* ESBL+ Transconjugants to Normal Human Serum Correlated with OMP Band Patterns Obtained by SDS-PAGE. *Adv Clin Exp Med* 2010;19;6:669–677.

---

<sup>112</sup> Hellman J, Loiseau PM, Tehan MM, Allaire JE, Boyle LA, Kurnick JT, et al. Outer Membrane Protein A, Peptidoglycan-Associated Lipoprotein, and Murein Lipoprotein Are Released by Escherichia coli Bacteria into Serum. *Infect Immun*. 2000;68(5):2566–2572.

<sup>113</sup> Chutkan H, Macdonald I, Manning A, Kuehn MJ. Quantitative and qualitative preparations of bacterial outer membrane vesicles. *Methods Mol Biol* 2013;966:259-72.

<sup>114</sup> Bartolini E, Ianni E, Frigimelica E, Petracca R, Galli G, Berlanda Scorza F, et al. Recombinant outer membrane vesicles carrying Chlamydia muridarum HtrA induce antibodies that neutralize chlamydial infection in vitro. *J Extracell Vesicles* 2013, 2: 20181.

<sup>115</sup> Okamura M, Ueda M, Noda Y, Kuno Y, Kashimoto T, Takehara K, et al. Immunization with outer membrane protein A from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis induces humoral immune response but no protection against homologous challenge in chickens. *Poult Sci* 2012;91:2444–2449.