

Niveles de virulencia de tres cepas mutantes de *Salmonella enteritidis* 82139

Level of virulence of three strains mutant of *Salmonella enteritidis* 82139

Raúl Beltrán Orbegoso¹; Liliana Villanueva Alva² y Rafael Rotger Anglada²

Resumen

Se evaluó la virulencia de tres cepas mutantes obtenidas de *Salmonella enteritidis* 82139 en función al crecimiento, movilidad y capacidad invasiva. Las cepas pertenecen al laboratorio de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Se usó una cepa nativa de *S. enteritidis* 82139 y tres cepas experimentales: 82139 2 (con el gen *dsbA* inactivo); 82139 C (sin plásmido de virulencia) y 82139 2C (con el gen *dsbA* inactivo y sin plásmido). La movilidad fue realizada en agar al 0,3%, sembrado por el método de puntura en placa. El crecimiento se determinó por el método del goteo en medio M9. La capacidad invasiva fue determinada en células de mamífero MDCK a 1, 2 y 4 horas correspondientes a las tres etapas de infección intracelular: internalización–adhesión; supervivencia–adaptación y multiplicación. Los resultados permiten relacionar la función del gen *dsbA* con la funcionalidad de los factores de virulencia: flagelos, fimbrias y proteínas de virulencia y que la presencia de la proteína DsbA es determinante en la virulencia de *S. enteritidis*. A partir de cepas mutantes *dsbA*- se podrían obtener vacunas vivas recombinantes.

Palabras clave: *Salmonella enteritidis* 82139, cepas mutantes, virulencia.

Abstract

The virulence of three strains mutant obtained from *Salmonella enteritidis* 82139 depending on growth, mobility and its invasive capacity was evaluated. The strains belong to the laboratory of Microbiology II of the Universidad Complutense de Madrid (UCM). Was used a native strain of *S. enteritidis* 82139 and three experimental strains: 82139 2 (with gene inactive *dsbA*); 82139 2 C (no virulence plasmid) and 82139 c (with gene inactive *dsbA* and without plasmid). Mobility was performed on agar at 0.3%, planted by the method of puncture in plate. Growth test was seeded by the method of the drip in M9 medium, requiring dilution. The invasive capacity was determined in mammalian MDCK cells to 1, 2, and 4 hours corresponding to the 3 stages of intracellular infection: internalization - accession; survival - adaptation and bacterial multiplication. The results allow to relate the function of the gene *dsbA* with the functionality of the virulence factors: flagella, fimbriae and virulence proteins and that the presence of the protein DsbA is determinant in the virulence of *S. enteritidis*. From mutant strains *dsbA* - recombinant live vaccines can be obtained.

Keywords: *Salmonella enteritidis* 82139, strains mutant, virulence

Introducción

Salmonella, bacteria gramnegativa, es el centro de atención de numerosos grupos de investigación, que estudian su capacidad patogénica desde el punto de vista genético y molecular, debido a que es el segundo agente causal más importante en brotes de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETAs) en América Latina y el Caribe (Organización Mundial de la Salud, 2003). *Salmonella enteritidis* es una causa importante de diarrea y morbilidad en la población humana (Toro, 2005). *S. enteritidis*, es ideal para estudiarlo como vehículo molecular, pues provoca una respuesta inmunitaria y su manipulación génica es sencilla (Anglada *et al.*, 1995); su capacidad de virulencia esta asociada a flagelos, fimbrias y proteínas de virulencia. Sus mecanismos de invasión necesitan de invasinas (Jun Yu, 1998).

1 Universidad Nacional de Trujillo, r_bel_orbe@hotmail.com.

2 Universidad Complutense de Madrid, España

Uno de los fenómenos de importancia en la patogenicidad bacteriana, está confinada a la configuración estructural de proteínas de virulencia biológicamente activas, que en algunos casos el correcto plegamiento está proporcionado por la oxidación o reducción de puentes disulfuro (Zapun *et al.*, 1993). Riestch y Beckwith, 1996 y 1998 determinaron que la formación de puentes disulfuro es parte del plegamiento de muchas proteínas periplásmicas y de membrana externa, contenidas en su estructura que son esenciales para su actividad catalítica.

En las bacterias, la ausencia de lisosomas es reemplazado por el espacio periplásmico (De Robertis, 1997). Holmgren (1979) y Bardwell (1994) determinaron en *E. coli*, la presencia de proteínas tiol disulfuro óxido-reductasas (TDOR) de ubicación citoplásmica y periplásmica. En la región citoplásmica se ha determinado la presencia de dos principales sistemas reductores: sistema tiorredoxina (tiorredoxina / tiorredoxina reductasa) y sistema glutarredoxina (glutathion / glutarredoxina reductasa). Mientras que en el espacio periplásmico, tanto para *E. coli* como para muchas bacterias patógenas gramnegativas, se ha determinado la presencia de un sistema específico Dsb (disulphide bond formation) (Fabianek *et al.*, 2000); Riestch y Beckwith (1998) determinaron que el sistema Dsb consta de 7 proteínas periplasmáticas,

Las proteínas TDOR periplasmáticas del Sistema Dsb, así como del Sistema no Dsb presentan en su estructura terciaria, un dominio tiorredoxina Cys-Xaa-Xaa-Cys que funcionan como centro catalizador (Nobuhiko y Hirofumi, 2004).

La movilidad así como la presencia de flagelo están relacionados con diferentes aspectos de la patogenicidad; predominantemente adhesión e invasión de células eucarióticas (Rodríguez-Peña y Anglada,1996); Mendoza del Cueto y Anglada (2002), lograron la construcción de la cepa simple mutante 82139 2 inactiva en *dsbA*, codificador de la proteína TDOR a partir de *Salmonella enteritidis*; como es: DsbA. Diferentes trabajos indican que la movilidad y el flagelo polar se necesitan para la adhesión y la invasión de líneas celulares de peces y humanas (Merino *et al.*, 1997).

Trabajos anteriores demostraron que cepas mutantes de *E. coli*, sin el gen *dsbA*, pierden la movilidad debido a que no se formarían proteínas DsbA necesarias para el correcto ensamblaje e inserción de flagelos, este hallazgo hizo suponer que también podría ocurrir en *Salmonella*. Por tanto, el objetivo del estudio fue evaluar los niveles de virulencia de tres cepas mutantes obtenidas de *Salmonella enteritidis* 82139: cepa mutante 82139 2 (con el gen *dsbA* inactivo); cepa mutante 82139 C (sin plásmido de virulencia) y cepa mutante 82139 2C (con el gen *dsbA* inactivo y sin plásmido). en función al crecimiento, movilidad y a su capacidad invasiva.

Material y métodos

Materiales

Para ensayos de crecimiento

Material biológico. Se usaron cepas nativa y simples mutante de *Salmonella enteritidis* 82139 portadora de plásmido, que pertenecen al Laboratorio de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid.

Para ensayos de movilidad:

Material biológico. Se usó 01 cepa nativa: *Salmonella enteritidis* 82139 y tres cepas experimentales: 82139 2 (cepa simple mutante *dsbA*-), 82139 C (cepa curada libre de

plásmido de virulencia) y 82139 2C (cepa doble mutante inactivado el gen *dsbA* y curada, en ausencia del plásmido de virulencia) que pertenecen al Laboratorio de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid.

Materiales de plástico no reutilizable, fue constituido por pipetas de 1, 5 y 25 mL con sus respectivas puntas, placas para cultivo, Eppendor's, placas multipocillos, Flask de 25cm³ y 75cm³, Falcón de 25mL, viales de 2mL y tubos de 10 mL.

Medios de Cultivo:

Caldo LB y agar LB (1L de caldo LB estuvo compuesto de: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de cloruro de sodio. Agregar 15g de agar en 1L de caldo LB, para obtener agar LB. Se ajusta a pH 6,5 y se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C y a 1atm).

Medio DMEM (Dubelco's Mod Eagle Médio) suplementado con Suero de Ternera Fetal (STF) al 10%.

Reactivos: Marcadores de antibiótico: amikacina, cloramfenicol y estreptomina, gentamicina y penicilina. Desoxicolato de sodio y dimetil sulfóxido (DMSO).

Equipos y material de uso permanente: Asas bacteriológicas, gradillas para tubos de plástico de 10mL., para tubos de 20x15mL y para eppendor's, estufa, Sistema computarizado de lecturas de densidad óptica para inóculos microbianos, scanner, electroporador e incubador rotatorio con sistema de agitación, micropipetas, campana de flujo laminar clase II, microscopio de inversión, congeladora a -70°C y equipo de conservación en nitrógeno líquido.

Para ensayos de capacidad invasiva

Material biológico. Se usaron cepas nativa y simples mutante de *Salmonella enteritidis* 82139 portadora de plásmido, que pertenecen al Laboratorio de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid.

Protocolo para determinar crecimiento de las colonias de *Salmonella enteritidis* en medio M9. Se utilizó el protocolo de Mendoza del Cueto y Rotger, 2002: a)Reactivación de células bacterianas; b) Crecimiento en medio M9; c) Incubación de las placas a 37°C durante 24 horas; d)Recolección de datos. El crecimiento bacteriano se determinó mediante la observación del crecimiento de la colonia sembrada por el método del goteo (1µl) previa diluciones requeridas incubadas a 37°C durante 24 horas.

Protocolo para la determinar movilidad. Se utilizó el protocolo de Mendoza del Cueto y Rotger (2002): a)Reactivación de células bacterianas; b)Siembra en Agar Movilidad; c)Recolección de datos. La movilidad de las cepas de *S. enteritidis* se determinó mediante la medición de la colonia por desplazamiento de la bacteria en mm, las que fueron expresados en %. Se tuvo en cuenta el diámetro de 3 mm de inóculo inicial y las medidas fueron tomadas después de 16 horas de incubación (o/n) a 37°C.

Métodos

Protocolo en la determinación de la capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis* en células MDCK(células epiteliales de mamífero de riñón de perro), se utilizó el protocolo de Mendoza del Cueto y Rotger (2002):

Reactivación de células bacterianas. Se reactivó las diferentes cepas en estudio obtenidas a partir de *Salmonella enteritidis* 82139 utilizando un inóculo de los viales correspondientes, los que fueron sembrados en agar Luria Bertoni (agar LB) que contenían un marcador de antibiótico. El agar LB sembrado se incubó durante 16 horas a 37°C. Como marcador molecular en mutantes *dsbA* se utilizó el antibiótico cloranfenicol.

Reactivación de células MDCK. Se procedió a la reactivación de células MDCK, descongelando viales conservados en nitrógeno líquido en 5ml. de medio DMEM (medio mínimo esencial para el crecimiento rápido de la línea celular), los cuales serán sembrados en Flask de 75 cm³ de capacidad que contienen previamente medio DMEM. Se mantendrá el cultivo de células en medio DMEM hasta conseguir la formación de una monocapa con una confluencia del 90%.

Determinación de invasión bacteriana. Mediante los recuentos de cél/mL ó porcentajes Se determinó bajo el siguiente procedimiento:

Obtención de preinóculos e inóculos bacterianos utilizando las diferentes cepas bacterianas en estudio. Se obtuvo preinóculos en fase log en medio LB con sistema de agitación y aireación, los cuales fueron utilizados para la obtención de los respectivos inóculos en inicios de la fase log Terminal en caldo LB suplementado hasta 0,3mM de NaCl en condiciones de reposo.

Obtención de monocapas de la línea celular MDCK en placas multipocillo, a partir del pase IV en fase log a concentraciones de $2,5 \times 10^5$ cél/ pocillo/ mL en DMEM suplementado con STF al 10% en condiciones de 37°C, al 5% CO₂ y durante 16 horas (o/n).

Infeción en monocapas de la línea celular MDCK. En las correspondientes monocapas de células MDCK, se procedió a la infección con las diferentes cepas de *S. enteritidis* 82139 en proporción de 1:100 por pocillo. Se procedió al recambio del medio DMEM de forma igual para las mutantes inactivadas y/o complementada. Durante el ensayo de infección culminada el T=0 (a 1 hora de interacción bacteria-célula huésped), se procedió a lavar utilizando medio DMEM conteniendo gentamicina 100µg/mL, en las horas restantes el recambio del medio DMEM empleado presentará gentamicina al 10µg/mL. Las condiciones de infección dadas en los ensayos experimentales de 37°C y a 5% de CO₂.

Recuperación de las células bacterianas invasivas de las respectivas monocapas MDCK infectadas a T=0, 1 y 3 correspondientes a 1, 2y 4 horas respectivamente, se procedió a la lisis celular provocada con desoxicolato sódico al 0,1% en PBS a ph 8,0 y en frío, con un tiempo de contacto no mayor de 10 min. De las bacterias internalizadas recuperadas se procedió a realizar diluciones las veces requeridas de acuerdo a los tiempos de infección y a lo requerido para el tipo de mutación, ya previamente estandarizada. Dichas diluciones fueron sembradas por duplicado en placas conteniendo LB con antibiótico específico a la mutación, como marcador de expresión.

Incubación de las placas a 37°C durante 24 horas.

Recuento de las unidades formadoras de colonia/mL correspondientes con los diferentes tiempos de 1,2 y 4 horas de interacción bacteria – célula huésped.

Resultados

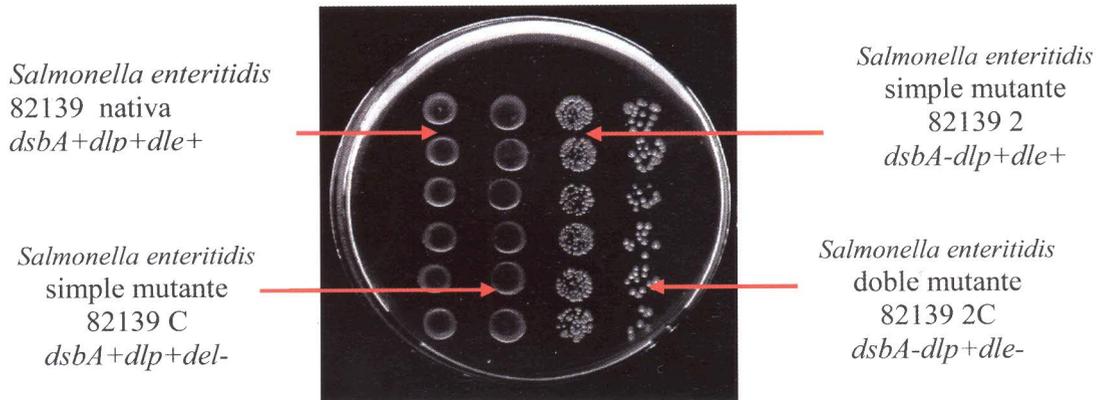


Fig.1. Efecto de la inactivación del gen *dsbA* en el crecimiento bacteriano de *Salmonella enteritidis* nativa 82139 y simples mutante 82139 2 y 82139 C, en medio M9 movilidad, incubadas a 37°C durante 24 horas.

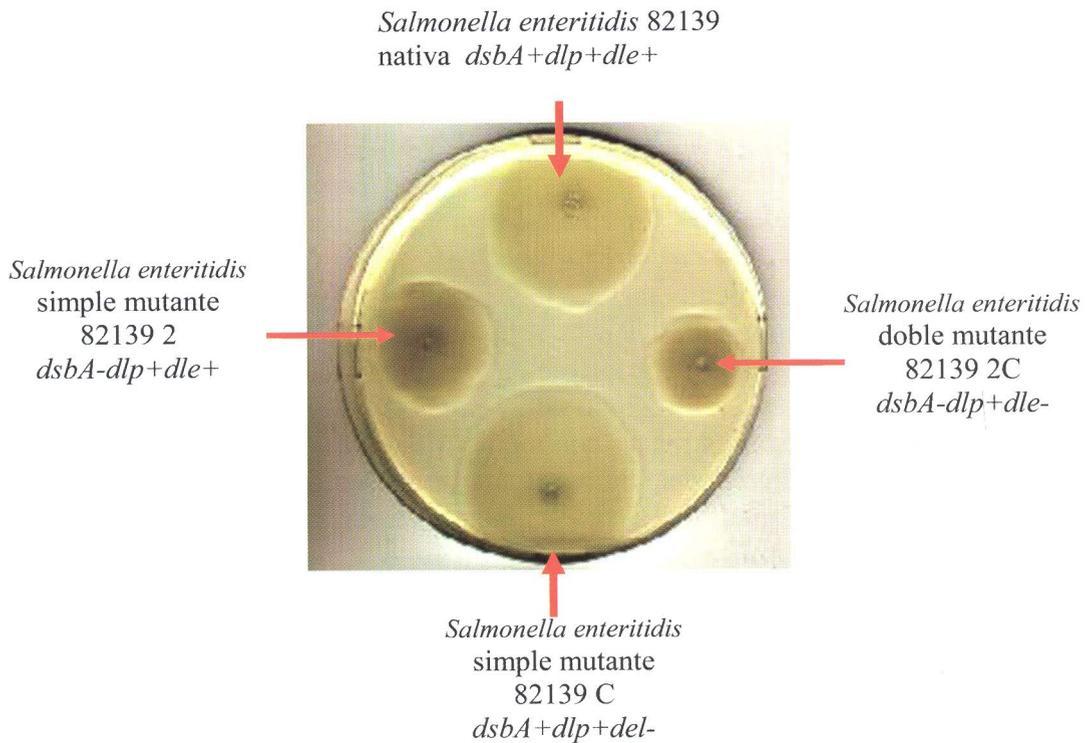


Fig. 2. Efecto de la inactivación del gen *dsbA* en la movilidad de *Salmonella enteritidis* nativa 82139 y simples mutante 82139 2, en agar movilidad 0,3%, incubadas a 37°C durante 24 horas.

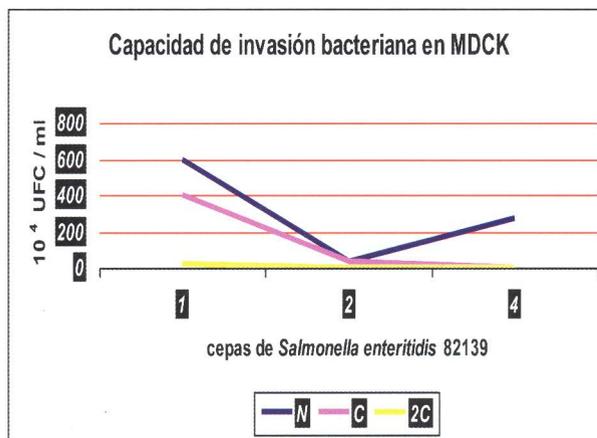


Fig.3. Capacidad invasiva de *Salmonella enteritidis* 82139, 82139C y 82139 2C por supresión (ausencia) y expresión (presencia) de DsbA, Dlp y Dle en MDCK en las primeras cuatro horas de interacción bacteria – célula huésped, expresadas en 10⁴ UFC/mL.

- N Cepa nativa, 82139: Presenta los tres genes *dsbA+*, *dlp+* y *dle+* codificadores de las proteínas TDOR periplasmáticas DbsA, Dle y Dlp
- C Cepa curada, 82139C: curada en ausencia de plásmido, *dlp-* (en un fondo proteico DsbA1Dlp0Dle1
- 2C Cepa doble mutante, 82139 2C, curada, *dlp-* y en ausencia de *dsbA-*; en un fondo proteico DsbA0Dlp0Dle1 (1, indica presencia de la proteína TDOR Dle).

Discusión

Los ensayos de crecimiento bacteriano a partir de *Salmonella enteritidis* 82139 2 simple mutante *dsbA-* comparada con la cepa nativa: *Salmonella enteritidis* 82139, permitió determinar que ante la inactivación de *dsbA* se determina el retraso del crecimiento de las colonias, en el tiempo de 24 horas de incubación. El crecimiento de la cepa simple mutante *dsbA* en placas con medio M9 determinó que el gen *dsbA* no es gen esencial, se observa crecimiento de la colonia en mutantes (Fig. 1); mientras que los ensayos de movilidad a partir de simples mutante *dsbA* ha permitido determinar la función de su proteína codificadora DsbA en *Salmonella enteritidis* 82139 2 (Fig. 2): Inactivación de *dsbA* afecta el correcto plegamiento del factor de virulencia de *Salmonella enteritidis* 82139, los flagelos, afectando el ensamblaje, inserción y/o translocación de flagelinas.

En los simples mutantes *dsbA-* se determinó también la función esencial de su proteína TDOR: DsbA en la virulencia de *Salmonella enteritidis* en función a su capacidad invasiva en células epiteliales de mamífero en las primeras cuatro horas infectivas correspondientes a la primera fase infectiva: la fase intracelular. Siendo determinante la actividad *dsbA* en la primera etapa: en la internalización – adhesión. DsbA determina el correcto ensamblaje e inserción de adhesinas e invasinas.

Comparando mutantes *dsbA- dlp-* (82139 2C) y *dsbA- dlp- dle-* (82139 2CI) se determinó una reducción (ó pérdida) de movilidad mayor del 94,5% y 100% respectivamente, con respecto a la cepa control nativa *dsbA+dlp+dle+*. Al no presentar estos efectos diferencia significativa (94,5% y 100%), indican que DsbA y Dlp presentan función TDOR determinante en la movilidad (Fig. 1 y 2) y en la actividad de los flagelos

A pesar de las determinaciones logradas en este trabajo, cabe enfatizar que, la función del gen *dsbA* en *Salmonella enteritidis* es mucho más compleja; donde la función determinante de DsbA (proteína TDOR del Sistema Dsb) se le asocia con la funcionalidad de los principales factores de virulencia: flagelos, fimbrias y proteínas de virulencia que presenten 1 ó más residuos de cisteína. También se ha podido determinar que conforme va en aumento el número de mutaciones con la respectiva ausencia de DsbA, *S. enteritidis* pierde significativamente su capacidad de virulencia.

Estos resultados encontrados permiten relacionar la capacidad de virulencia, por la codificación del gen *dsbA* de *Salmonella* e incluso con otras Enterobacteriaceae, como también de bacterias entéricas de interés clínico, como es una de ellas *Helicobacter pylori*. Inferencia apoyada por lo previamente ya determinado que, DsbA se encuentra presente en toda bacteria gramnegativa e incluso otras proteínas TDOR con función similar se encuentran presentes en algunas grampositivas como lo propuesto por Mendoza del Cueto y Rotger, 2002. La recuperación de simples mutantes intracelulares en infecciones bacterianas in vitro son menores a las dosis infectivas in vivo lo que serviría de base para nuevas investigaciones, e incluso podría utilizarse a *Salmonella* como vehículo de genes (dobles inmunizaciones) ya que provoca una respuesta inmunitaria y su manipulación génica es sencilla.

En la fig.3 se observa que la cepa de *S. enteritidis*, cepa doble mutante, 82139 2C, curada, *dlp-* carente del gen *dsbA-*; en un fondo proteico DsbA0Dlp0Dle1, exhibe una baja invasión en las células MDCK en las primeras cuatro horas de interacción bacteria célula huésped. Así mismo, la fig.3 evidencia que la cepa simple mutante presenta una significativa disminución de la capacidad invasiva en células epiteliales de mamífero MDCK.

Conclusiones

El gen *dsbA* tiene una función determinante en la movilidad de *S. enteritidis* 82139

En *S. enteritidis* mutantes del gen *dsbA* ven afectadas su capacidad inmunogénica del flagelo H.

S. enteritidis simple mutante presenta una significativa disminución de la capacidad invasiva en células epiteliales de mamífero MDCK

Referencias bibliográficas

- Bardwell, J., Lee, J., Jander, G., Martin, G., Belin, D. y Beckwith, J. (1993). "A pathway for disulfide bond formation in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 1038 – 1042.
- De Robertis, Hib, Ponzio. (1997). "*Biología Celular y Molecular de De Robertis*" 12° ed. Buenos Aires: El Ateneo. 467pp.

- Fabianek, R., Hennecke H. y Meyer, L. (2000). "Periplasmic protein thiol disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*". *Microbiology Rev.* 2000(24): 303- 316.
- Holmgren, A. (1979). "Thiorredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide". *The Journal of Biological Chemistry* 254: 9627 – 9632.
- Jun Yu. (1998). "Inactivación de DsbA, but not DsbC and DsbD, Affects the intracellular survival and virulence of *Shigella flexneri*. Infection and immunity". *American Society for Microbiology*, 66 (8):3909 – 3917.
- Mendoza del Cueto T. y Rotger A., R. (2002). "Clonación del gen *dsbA* de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* y Caracterización del fenotipo resultante de su inactivación". Tesis Doctoral. Dpto. de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Merino S., Rubires, X., Aguilar, A. y Tomás,A. (1997). "The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains". *Microbiol. Lett.* 151: 213-217.
- Nobuhiko, T. y Hirofumi,L. (2004). "Two Periplasmic Disulfide Oxidoreductases, DsbA and SrgA, target Outer Membrane Protein SpiA, a component of the Salmonella Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System". Department of Microbiology, School of pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Tokyo 108-8641, Japan. *Journal of Biological chemistry* (33): 34631-34642.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). "Propuesta de Plan de acción del instituto Panamericano de Protección de alimentos y Zoonosis (INPPAZ)". 13ª Reunión Interamericana a nivel Ministerial en Salud y Agricultura. Chile.
- Riestch, A.; Belin, M. y Beckwith, J. (1996). "An in – vivo pathway disulphide bond isomerization in *Escherichia coli*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 13048 – 13053.
- Rodríguez-Peña, J. y Rotger Anglada, R. (1996). "Mapa génico del plásmido de virulencia de *Salmonella enteritidis* y Caracterización de regiones homólogas del cromosoma de *Salmonella typhi*". Tesis Doctoral. Dpto. de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.
<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganadería/otras/aves/salmonella>.
- Rotger-Anglada, R., Rodríguez- Peña, J., Guisan, M. y Alvarez, I. (1995). "Genética de la virulencia de *Salmonella*". Microbiología y Genética. Tomo I: 13-27. Madrid: UCM.
- Toro, C. (2005). Bases Moleculares de la Patogenicidad de *Salmonella typhi*. 25 de Mayo 2005 (9.15pm) [http:// www.Geocities.com/moralab/bases.html](http://www.Geocities.com/moralab/bases.html).
- Zapun, A., Bardwell, J. y Creighton, T. (1993). "The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo". *Biochemistry* (32): 5083 – 5092.