



**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE HIGIENE**

Prof. Arnoldo Berta
DEPARTAMENTO DE DESARROLLO BIOTECNOLOGICO



**Estudio de los determinantes moleculares del
fenotipo aflagelado en aislamientos de *Salmonella*
enterica serovar Dublin**

Tesis de Maestría

PEDECIBA

Área Biología, Sub-área Microbiología

Lic. Sebastián Sasías Martínez

Tutor: Dra. Lucía Yim Leone

Dpto. Desarrollo Biotecnológico

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

2016

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mis padres y abuela, por el apoyo en todo momento. A mis hermanos y el resto de mi familia.

A la Dra. Lucía Yim, por haberme aceptado como estudiante, pero sobre todo, por su capacidad para transmitirme conocimientos y su paciencia infinita, virtudes sin las cuales, este trabajo no se hubiese podido concluir.

Al Dr. Alejandro Chabalgoity por recibirme en el laboratorio y todos los queridos compañeros del Depto. de Desarrollo Biotecnológico, por toda la ayuda brindada y los almuerzos y mates compartidos, en especial a la Dra. Laura Betancor y a la Lic. Aracé Martínez.

Al Dr. Gustavo Varela quien me recibió en primera instancia en su laboratorio y me sugirió conocer a la Dra. Yim.

Al Departamento de Inmunología, en el Instituto de Higiene, y a la División Neurociencias, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, por haberme permitido hacer uso de sus equipos en diferentes oportunidades.

A la Dra. Gabriela Algorta (Centro Nacional de Salmonella) y la Dra. Teresa Camou (Ministerio de Salud Pública) por habernos cedido las cepas necesarias para la realización del presente trabajo.

Al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) y la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), por el apoyo económico durante el desarrollo del presente trabajo.

1.- ÍNDICE

1.- ÍNDICE	1
2.- ABREVIATURAS	4
3.- RESUMEN	5
4.- INTRODUCCIÓN	7
4.1.- Epidemiología y taxonomía del género <i>Salmonella</i>	7
4.2.- Patogénesis	10
4.3.- Flagelo bacteriano	12
4.4.- Modelos experimentales <i>in vivo</i> para el estudio de la respuesta inflamatoria intestinal a la infección por <i>Salmonella</i>	15
4.5.- Antecedentes del grupo de trabajo	16
5.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1.- Cepas, medios de cultivo y crecimiento	21
6.2.- Ensayos de Movilidad y pasajes sucesivos	23
6.3.- Plásmidos	23
6.4.- Obtención de las construcciones moleculares	25
6.4.1.- Construcción de pBA y pJA	25
6.4.2.- Transformación de las construcciones moleculares	26
6.4.3.- Construcción de pBE y pJE	27
6.4.4.- Construcción de pGEXA y pGEXM	28
6.4.5.- Construcción de las cepas resistentes a estreptomicina para su evaluación en el modelo de colitis en ratón	29
6.4.6.- Construcción de la cepa SDu5 <i>fliC::kan^R</i> resistente a estreptomicina para su evaluación en el modelo de colitis en ratón	29
6.5.- PCR cuantitativa en Tiempo Real para la cuantificación de los niveles de ARNm bacterianos	30
6.5.1.- Extracción de ARN	30
6.5.2.- Tratamiento con DNAsa	31
6.5.3.- Transcripción reversa	31

6.5.4.- PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	31
6.6.- Análisis de la producción de proteínas	32
6.6.1.- Obtención de antisueros Anti-FliA y Anti-FlgM	32
6.6.2.- Obtención de extractos proteicos	34
6.6.3.- SDS-PAGE	35
6.6.4.- Western Blot	35
6.7.- Secuenciación y análisis de secuencias	36
6.7.1.- <i>Screening</i> de la delección <i>fliE</i> Δ42 por PCR	36
6.7.2.- Análisis de secuencia nucleotídica de <i>fliE</i> en revertientes	
SDu3/pJA mot+	36
6.8.- Tinción fluorescente de flagelos	37
6.9.- Ensayos en ratones (modelo de colitis). Recuento en órganos,	
histología, qRT-PCR	37
6.10.- Análisis estadísticos	38
7.- RESULTADOS	39
7.1.- Evaluación de la capacidad inflamatoria de aislamientos salvajes <i>in vivo</i>	39
7.1.1.- Análisis de la respuesta transcripcional de citoquinas y proteínas antimicrobianas	39
7.1.2.- Análisis histopatológico de ciegos	43
7.2.- Expresión de genes flagelares	44
7.3.- Análisis de niveles y localización celulares de FliA y FlgM	45
7.3.1.- Producción y purificación de FliA y FlgM recombinantes	46
7.3.2.- Producción de anticuerpos anti-FliA y anti-FlgM	47
7.3.3.- Estudio de la localización y niveles celulares de FliA y FlgM	48
7.4.- Reversión del fenotipo aflagelado	49
7.4.1.- Pasajes sucesivos de cepa aflagelada en agar de movilidad	49
7.4.2.- Complementación en trans de cepas aflageladas con el gen <i>fliA</i> de cepa flagelada, análisis de la expresión de genes de clase 3, síntesis de FliC y movilidad	50
7.4.3.- Pasajes sucesivos de cepas SDu3/pBA y SDu3/pJA	52

7.5.- Análisis comparativo de las secuencias completas de los operones flagelares	54
7.5.1.- Comparación de la secuencia nucleotídica de la región de genes flagelares	54
7.5.2.- Screening de <i>fliEΔ42</i> por PCR en últimos aislamientos clínicos obtenidos	56
7.5.3.- Complementación de SDu3 con <i>fliE</i> de SDu5	58
7.5.4.- Evaluación de la capacidad inflamatoria de la cepa SDu3 complementada con <i>fliE+</i>	59
7.5.5.- Análisis de la secuencia nucleotídica de <i>fliE</i> de SDu3/pJA <i>mot+</i>	60
7.6.- Análisis de la movilidad en aislamientos de S. Dublin obtenidos de ganado bovino	62
7.6.1.- Estudio de la movilidad de aislamientos S. Dublin de ganado bovino	62
7.6.2.- Screening de <i>fliEΔ42</i> en aislamientos no móviles de ganado bovino	63
7.6.3.- Análisis de síntesis y localización de FliC en aislamientos no móviles de ganado bovino	64
8.- DISCUSIÓN	66
8.1.- El flagelo en <i>Salmonella enterica</i> serovar Dublin	66
8.2.- Respuesta inflamatoria intestinal generada por aislamientos de S. Dublin flagelados y no flagelados	70
8.3.- Mecanismo molecular responsable del fenotipo aflagelado en las cepas uruguayas de S. Dublin	72
9.- CONCLUSIONES	77
10.- BIBLIOGRAFÍA	79
11.- ANEXOS	85
11.1.- Publicación de resultados parciales del presente trabajo	85

2.- ABREVIATURAS

ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
SNT	<i>Salmonella</i> no tifoidea
MSP	Ministerio de Salud Pública
INAC	Instituto Nacional de Carnes
CNS	Centro Nacional de <i>Salmonella</i>
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
SST3	Sistema de secreción tipo 3
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
CFU	Unidades formadoras de colonias
qRT-PCR	PCR cuantitativa en Tiempo Real
MLST	Multilocus <i>sequence Type</i>
O/N	Cultivo <i>overnight</i> (de un día para el otro)
O/D	Cultivo <i>overday</i> (de 2 a 4 horas aproximadamente)
LB	Medio Luria-Bertani
rpm	Revoluciones por minuto
DO	Densidad óptica
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
GST	Glutation S-transferasa
pb	Pares de bases
TA	Temperatura ambiente
M-MLV	Virus de la leucemia murina de Moloney
PBS	Solución tampón fosfato salino
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
P.I.	Post-inmunización
kDa	KiloDalton

3.- RESUMEN

El género *Salmonella* es una de las causas de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) más frecuentes en todo el mundo, siendo el principal agente bacteriano causal en Uruguay. Las cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes al grupo no tifoideo (SNT) causan generalmente en humanos una gastroenteritis autolimitada. Sin embargo, dependiendo de la cepa involucrada y del estado inmune del hospedero pueden darse casos de infecciones extra-intestinales, las cuales conllevan elevados índices de morbi-mortalidad. La mayoría de estos tipos de infecciones se deben a los serotipos Typhimurium y Enteritidis, altamente prevalentes en nuestro país y a nivel mundial. Por otra parte, ciertos serotipos poco prevalentes presentan elevado porcentaje de infecciones invasivas respecto al total de casos para el mismo serotipo, como por ejemplo Dublin, un serotipo no tifoideo adaptado a bovinos.

Al interactuar con la mucosa del intestino delgado, las cepas de SNT desencadenan una reacción inflamatoria aguda y diarrea, que se postula cumplen un rol importante en prevenir la diseminación bacteriana a sitios sistémicos. El flagelo es uno de los principales factores bacterianos involucrados en la generación de respuesta inflamatoria a nivel intestinal, siendo la flagelina (FliC, principal componente estructural del flagelo) un importante patrón molecular asociado a patógenos.

En trabajos previos del grupo, al analizar una colección de 7 aislamientos clínicos de *Salmonella* Dublin, se encontró que 3 aislamientos carecían de flagelo y todos ellos fueron obtenidos de infecciones invasivas (hemocultivo). Además, estos aislamientos aflagelados eran capaces de generar una respuesta pro-inflamatoria significativamente menor que los móviles al infectar células epiteliales intestinales humanas en cultivo.

Basándonos en estos antecedentes hipotetizamos que la ausencia del flagelo podría ser un mecanismo mediante el cual cepas del serotipo Dublin consiguen evadir la respuesta inflamatoria local intestinal del hospedero promoviendo así su diseminación a sitios sistémicos. En este sentido, nos propusimos estudiar la respuesta inflamatoria generada por aislamientos de *S. Dublin* a nivel intestinal en un modelo animal, para verificar si lo observado *in vitro* se reproduce *in vivo*, y elucidar los mecanismos moleculares responsables del fenotipo aflagelado observado en 3 de los 7 aislamientos clínicos de *S. Dublin* disponibles al inicio de este trabajo. Asimismo, nos propusimos evaluar si dicho fenotipo es reversible y analizar el fenotipo de movilidad en una

colección de aislamientos de *S. Dublin* obtenidos de ganado bovino, para verificar si allí también se encuentran cepas carentes de flagelo, tal como se había observado en aislamientos clínicos.

En primer lugar, los resultados obtenidos en el modelo murino de colitis, demuestran que un aislamiento aflagelado (SDu3) genera una respuesta inflamatoria a nivel de ciego significativamente menor que uno flagelado (SDu5), y a su vez si se inactiva el gen *fliC* de un aislamiento flagelado, el mutante resultante es defectivo en sus propiedades inflamatorias.

Posteriormente, detectamos en los aislamientos aflagelados un defecto en la secreción de FlgM, un factor anti-Sigma que inhibe la función del factor Sigma flagelar FliA, haciendo que la expresión de los genes dependientes de dicho factor Sigma (entre los que se encuentra *fliC*), sea dos órdenes de magnitud menor respecto a los flagelados.

Luego de analizar las secuencias genómicas completas de todos los aislamientos, encontramos una deleción de 42 nucleótidos en el gen *fliE* (*fliE* Δ 42) en los aislamientos aflagelados. Este gen codifica para una proteína integrante del cuerpo basal del flagelo, donde se localiza el sistema de secreción tipo III a través del cual se secretan al exterior celular los productos flagelares. Al complementar la cepa aflagelada SDu3 en trans con el gen *fliE* completo, revirtió inmediatamente su fenotipo y generó en el modelo murino respuestas inflamatorias mayores que la cepa parental aflagelada, y similares a la cepa naturalmente flagelada.

Por otro lado, entre los aislamientos obtenidos de ganado bovino, encontramos aislamientos inmóviles que presentaban una deleción en *fliE* de un tamaño similar a *fliE* Δ 42. También encontramos aislamientos no móviles con el gen *fliE* de tamaño similar al gen completo, entre los cuales encontramos aislamientos que si producen flagelina y otros que no la producen.

En base a estos resultados, podemos concluir que la causa del fenotipo aflagelado de ciertos aislamientos clínicos de *S. Dublin* es la presencia de la deleción en *fliE*. Esta deleción no es un hecho aislado puntual, dado que también se observa en aislamientos de origen animal. Asimismo, podemos afirmar que las cepas del serovar Dublin carentes de flagelo poseen sus propiedades proinflamatorias afectadas, tal como se había descrito para Typhimurium, y por tanto la elevada frecuencia de aislamientos de *S. Dublin* aflagelados encontrada en este trabajo podría explicar en parte el elevado índice de invasividad exhibido por este serotipo. En este sentido, podemos especular que el aparato flagelar en este serovar podría estar pasando por un proceso de pérdida.

4.- INTRODUCCIÓN

4.1.- Epidemiología y taxonomía del género *Salmonella*

El género *Salmonella*, integrado por bacterias patógenas Gram-negativas y perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es agente causal de infecciones con altas tasas de morbilidad tanto en países en desarrollo como en países industrializados y con alta mortalidad principalmente en países en desarrollo (Sanchez-Vargas *et al.*, 2011). La salmonelosis es una de las infecciones transmitidas por alimentos más frecuentes en todo el mundo. Se estima que ocurren 93,8 millones al año de casos de gastroenteritis causados por *Salmonella* no tifoidea, ocasionando 155.000 muertes. De estos casos, 80,3 millones fueron transmitidos por alimentos (Majowicz *et al.*, 2010). Considerando el conjunto de los patógenos causa de enfermedad transmitida por alimentos (ETA) en EEUU y Reino Unido, *Salmonella* es el agente responsable del mayor número de muertes (Adak *et al.*, 2002; FoodNet and CDC, 2010; Kennedy *et al.*, 2004). En Uruguay, *Salmonella* es el principal agente causal de ETA, siendo responsable de más del 50% del total de los brotes registrados por el Ministerio de Salud Pública entre 1998 y 2011 (Taller de fortalecimiento de la vigilancia de ETA, MSP, IMM, INAC, Diciembre 2011, Montevideo, Uruguay).

Está comprendido por dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* se subdivide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Como se reporta en Issenhuth-Jeanjean *et al.* 2014, hasta el año 2010 se caracterizaron 2659 serovares, de los cuales, 2637 pertenecen a *S. enterica* (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). A pesar de esta variedad de serotipos, la salmonelosis es generalmente causada solo por unos pocos que predominan ampliamente. Se estima que más del 70% de las infecciones humanas están causadas por 12 serovariedades prevalentes (Anjum *et al.*, 2005). Los distintos serotipos de *Salmonella* están estrechamente relacionados a nivel genético, como lo demuestra el análisis de secuencia de genes ortólogos (Baumler *et al.*, 1998). La divergencia en la secuencia nucleotídica oscila entre el 3,8 y el 4,6% y las diferencias en las secuencias de aminoácidos varían entre 0,7 y 1,3% (Selander *et al.*, 1994). Esta estrecha relación genética entre serotipos de *Salmonella* evidencia su origen clonal, y basándose en el grado de divergencia en la secuencia, se puede estimar que existió un antepasado común del género entre 25 y 40 millones de años atrás.

Según el rango de hospederos, los serotipos de *S. enterica* pueden clasificarse en

- 1) Ubicuos, que pueden infectar a un amplio espectro de hospederos, como es el caso de

los serovares Typhimurium y Enteritidis.

2) De hospedero restringido, exclusivos de un determinado hospedero, como Typhi y Gallinarum que únicamente afectan a humanos y aves, respectivamente.

3) Adaptados a hospedero, que infectan preferentemente a una especie, aunque en ciertas ocasiones pueden infectar a otras, como Dublin que es un serotipo adaptado a ganado bovino pero, con baja frecuencia también causa enfermedad en humanos.

En general, los serovares ubicuos causan una gastroenteritis aguda auto-limitada, mientras que los restringidos o adaptados a hospedero se asocian frecuentemente a infección sistémica que puede producir focos extra-intestinales de infección (Uzzau *et al*, 2000).

Los determinantes genéticos bacterianos responsables de la adaptación a un hospedero determinado constituyen un área de intenso estudio. Avances tecnológicos recientes como la secuenciación completa del genoma bacteriano, la hibridación genómica comparativa mediante el uso de microarrays, el análisis del perfil transcripcional y del proteoma completo bacterianos han empezado a brindar pistas sobre estas cuestiones (Encheva *et al.*, 2007; Soyer *et al.*, 2009; Holt *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2008; Pullinger *et al.*, 2008; Porwollik *et al.*, 2005; Yue *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Langridge *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha sugerido que la degradación del genoma y la delección de genes contribuyen a la restricción de hospedero en *S. Typhi* y *S. Paratyphi A* mediante la eliminación de vías metabólicas que son esenciales para la infección en los hospedadores no permisivos (Parkhill *et al.*, 2001; McClelland *et al.*, 2004). Del mismo modo, el análisis del genoma de *S. Gallinarum* reveló la existencia de numerosos genes inactivos o pseudogenes, lo que puede explicar su fenotipo de restricción a hospedero (Thomson *et al.*, 2008). Un estudio reciente de comparación de pseudogenes entre serovares causantes de gastroenteritis versus extra-intestinales reporta la existencia de una extensiva degradación génica afectando rutas del metabolismo central anaeróbico, necesarias para la fase intestinal de la infección, en los serovares extra-intestinales (Nuccio *et al.*, 2014). En este sentido, Matthews y colaboradores, al comparar las secuencias de cepas de los serovares Dublin, Enteritidis y Gallinarum, identificaron diferencias de pseudogenes entre cepas de un mismo serovar y entre cepas de diferentes serovares. Además ejemplifican los dos mecanismos conocidos por tener un rol importante en la evolución del genoma de *Salmonella*: la adquisición de nuevos genes mediante transferencia horizontal, y la pérdida de funciones génicas, debida a la acumulación de mutaciones puntuales y delecciones e inserciones

que resultan en la formación de pseudogenes (Matthews *et al*, 2015).

A su vez, los serotipos causantes de infecciones en humanos pueden clasificarse, según la evolución de la enfermedad que generan, en dos grupos:

1) grupo tifoideo (serotipos Typhi y Paratyphi A, B y C, y Sendai) asociados a enfermedad sistémica y en raras ocasiones a gastroenteritis, siendo Typhi y Paratyphi exclusivos de humanos. Aislamientos pertenecientes a estos serotipos son escasos en nuestro país y en la región.

2) Salmonelas no tifoideas (SNT) (el resto de los serotipos) que a diferencia del grupo tifoideo producen gastroenteritis autolimitada y raramente atraviesan la barrera intestinal. En este grupo se encuentran serotipos como Typhimurium y Enteritidis, que son capaces de infectar amplio rango de hospedadores, entrando así fácilmente a la cadena alimenticia lo que los hace prevalentes en nuestro país y en todo el mundo (Hendriksen *et al.*, 2011).

Aunque en general causan cuadros localizados en el intestino, cepas de SNT pueden pasar a la sangre y diseminarse sistémicamente, dependiendo del estado inmune del hospedero así como también del serotipo y la cepa bacteriana involucrada. La mayoría de los casos de infecciones extra-intestinales causadas por cepas de SNT se deben a los serotipos Typhimurium y Enteritidis, prevalentes en la cadena alimenticia y en consecuencia, más frecuentemente asociados con gastroenteritis. Sin embargo, ciertos serotipos menos prevalentes presentan un mayor índice de invasividad (número de casos de infecciones invasivas expresado en porcentaje de casos totales para ese serotipo). Es el caso de los serotipos Dublin y Choleraesuis, adaptados normalmente a hospederos bovino y suino respectivamente, que a nivel mundial son reportados en humanos con índices de invasividad, y por tanto de morbi-mortalidad, inusualmente elevados. Para el caso de Enteritidis, el índice de invasividad varía en las diferentes regiones del mundo entre un 1 y un 7% mientras que para Dublin varía entre el 50 y el 70% de los casos (Guibourdenche *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2008; Langridge *et al.*, 2008; Langridge *et al.*, 2009). En Uruguay el panorama parece ser similar. Según datos del Centro Nacional de *Salmonella* (CNS), entre los años 1975 y 2009, Typhimurium y Enteritidis fueron responsables del 78% de los aislamientos clínicos de *Salmonella*, pero su índice de invasividad fue bajo (21 y 13,5% respectivamente), mientras que del serotipo Dublin o Choleraesuis son muy pocas las cepas aisladas (0,9% del total entre los dos), pero de éstas el 57 y 89% respectivamente, provienen de enfermedades sistémicas (Fuente: CNS, datos

no publicados).

La prevalencia de las infecciones invasivas por SNT varía en las diferentes regiones del mundo, registrándose desde un 2% hasta más de un 50%. Las muertes por infecciones invasivas causadas por SNT no son infrecuentes (Vugia *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2008); la tasa de mortalidad por salmonelosis invasiva es del 3,5% en EEUU, comparado con un 0,3% para aquellos pacientes con enfermedad entérica (Barton *et al.*, 2011). En África sub-sahariana, cepas inusualmente invasivas de SNT pertenecientes principalmente a los serotipos Typhimurium y Enteritidis han emergido en los últimos años como causa prominente de infecciones bacterianas del torrente sanguíneo en niños y adultos, alcanzando una mortalidad del 20-25% (Okoro *et al.*, 2012; Kingsley *et al.*, 2009; Gordon *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2012; Feasey *et al.*, 2012). Estudios genómicos indican que dichas cepas pertenecen a un tipo genético diferente al de las cepas Typhimurium o Enteritidis diseminadas globalmente y mayormente causantes de enfermedad entérica (Kingsley *et al.*, 2009). En nuestro país se desconoce la prevalencia exacta de infecciones invasivas con respecto al total de casos asociados a *Salmonella*, aunque según datos del CNS y del MSP existe un número importante de cepas obtenidas de cuadros de infecciones sistémicas. Entre 2010 y 2013, el CNS tipificó un total de 352 cepas de *Salmonella* aisladas de infecciones humanas de las cuales 64 (18%) correspondieron a aislamientos obtenidos de hemocultivos, mientras que según datos del MSP, 114 aislamientos de *Salmonella* de 716 tipificados (16%) en ese mismo período fueron obtenidos de hemocultivos (Dra. T Camou, Departamento de Laboratorios del MSP, comunicación personal).

4.2.- Patogénesis

La infección por *Salmonella* ocurre principalmente por ingestión de alimentos o agua contaminados; una pequeña proporción de las bacterias es capaz de resistir el pH ácido estomacal y alcanzar el intestino delgado que es el sitio de interacción de *Salmonella* con la mucosa. Al interaccionar con el epitelio intestinal, las cepas de SNT son capaces de invadir los enterocitos por un mecanismo de endocitosis mediado por la bacteria y desencadenan una reacción inflamatoria aguda caracterizada por la secreción de citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias por parte de las células epiteliales, pérdida de iones cloro, reclutamiento de neutrófilos, transmigración de los mismos a través del epitelio, activación de macrófagos, los cuales contribuyen a aumentar la

respuesta inflamatoria, y secreción de péptidos antimicrobianos al lumen intestinal (Winter *et al.*, 2010^A). Todos estos procesos conllevan a un daño tisular, pasaje de fluidos hacia el lumen intestinal, y consecuentemente, diarrea (Haraga *et al.*, 2008; Thiennimitr *et al.*, 2012). Está aceptado que la inducción de una fuerte respuesta inflamatoria a nivel intestinal cumple un rol importante en prevenir la diseminación bacteriana a sitios sistémicos (Raffatellu *et al.*, 2008; Wangdi *et al.*, 2012). Un factor bacteriano que desencadena la respuesta del hospedador a nivel intestinal es el flagelo. Éstos son apéndices extracelulares requeridos para la movilidad y la quimiotaxis bacterianas; se ha visto que la movilidad contribuye a la invasión de *S. Typhimurium* en células epiteliales al aumentar el contacto con las células hospedadoras. Por otra parte, la proteína FliC o flagelina (principal componente estructural del flagelo) es uno de los principales patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y el ligando específico del receptor de tipo Toll 5 (TLR5) ubicado en la superficie basolateral de los enterocitos; su interacción desencadena una respuesta transcripcional mediada por NFκB, que conduce a la secreción de citoquinas y quemoquinas, causando inflamación (Hayashi *et al.*, 2001; Gewirtz *et al.*, 2001). Otro receptor que reconoce flagelina es el Naip5 en conjunto con NLRC4, ambos localizados intracelularmente en la célula hospedadora, proceso que desencadena la activación de inflammasoma (Winter *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2010). En epitelios intestinales humanos modelo (células derivadas de enterocitos en cultivo), se ha demostrado que la unión de FliC de *S. Typhimurium* a TLR5 desencadena una respuesta proinflamatoria caracterizada por el aumento en la expresión de Interleuquina 8 (IL-8), CCL20 (proteína inflamatoria del macrófago 3 (MIP-3)) y varias otras quemoquinas proinflamatorias que reclutan neutrófilos y células dendríticas en el compartimento subepitelial (Gewirtz *et al.*, 1999; Gewirtz *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2003; Siervo *et al.*, 2001). Se ha reportado que, en el modelo *in vivo* de ratones pretratados con estreptomina, mutantes aflagelados de *S. Typhimurium* generan una inflamación intestinal disminuida a tiempos tempranos (10 - 24 horas) comparada con la generada por bacterias salvajes (Stecher *et al.*, 2004; Vijay-Kumar, *et al.*, 2006). Hallazgos similares fueron obtenidos en los modelos de asas ligadas del íleon de bovino y en pollos (Schmitt *et al.*, 2001; Winter *et al.*, 2009; Iqbal *et al.*, 2005). Asimismo, se ha reportado que el serotipo tifoideo e invasivo *S. Typhi* es capaz de modular activamente la respuesta inmune innata del hospedero, generando una inflamación intestinal modesta con un escaso infiltrado de neutrófilos en el intestino, lo cual permitiría la diseminación

activa de las bacterias a sitios sistémicos a través de células fagocíticas del sistema retículo endotelial (Raffatellu *et al.*, 2008 ; Wangdi *et al.*, 2012). Interesantemente, ha sido descrito un mecanismo en el que la expresión de *fliC* de *S. Typhi* es reprimido cuando la bacteria encuentra condiciones de osmolaridad del tejido (pero no las de osmolaridad alta presente en el lumen intestinal), permitiéndole así evitar la barrera de la mucosa intestinal y evadir la inmunidad innata (Winter *et al.*, 2010^B).

Otros factores de virulencia que cumplen un rol importante en la respuesta inflamatoria intestinal son los efectores del sistema de secreción tipo III (SST3), codificados en las islas de patogenicidad de *Salmonella*-1 y 2 (SPI-1 y SPI-2). Estos sistemas median la transferencia de proteínas efectoras de virulencia desde la bacteria hacia el citosol de la célula huésped alterando diversas funciones celulares (estructura del citoesqueleto, transducción de señales, expresión de citoquinas), para promover la internalización, supervivencia y replicación bacterianas (Haraga *et al.*, 2008). El SST3 codificado por SPI-1 es esencial para inducir la internalización bacteriana por células no fagocíticas, para inducir inflamación a nivel intestinal y para la colonización intestinal, mientras que el SST3 SPI-2 es fundamental para la persistencia intracelular en macrófagos y para el establecimiento de infección sistémica en el modelo murino (Wangdi *et al.*, 2012; Thiennimitr *et al.*, 2012).

4.3.- Flagelo bacteriano

La movilidad bacteriana se presenta en diferentes formas, como nado, “swarming”, deslizamiento, movimientos bruscos o flotación. El flagelo, una de las maquinarias de movilidad más distribuidas en las bacterias, es un apéndice helicoidal que rota gracias a un motor rotatorio reversible que le confiere a la bacteria la capacidad de nadar (Jarrell, 2008). Es un complejo molecular con diversos roles en patogénesis bacteriana, como movilidad a lugares óptimos en el hospedero mediante sistemas de quimiorreceptores, colonización o invasión, permanencia en sitios de infección y dispersión post-infección.

Una vez ubicada la bacteria en el sitio de infección, el flagelo colabora a la adherencia a superficies, diferenciación en biofilms, secreción de efectores moleculares, penetración a través de estructuras tisulares, o inactivar la fagocitosis para permitir la entrada a células eucariotas. Por lo tanto, la expresión flagelar debe estar adaptada para enfrentarse a los sistemas de defensa

inmune del hospedero, ya sea reduciendo o alterando su expresión, o mediante modificaciones estructurales del flagelo (Chaban *et al.*, 2015).

De aproximadamente 60 genes involucrados en la expresión y ensamblaje del flagelo, alrededor de 30 codifican para componentes estructurales del flagelo. El flagelo consta del cuerpo basal, conformado por el motor, el gancho o codo, y el filamento flagelar. El motor flagelar puede ser dividido en varios dominios morfológicos: el anillo MS (Membrana-Supramembrana), conformado por FliF, base para el motor flagelar; el anillo C (citoplásmico), conformado por FliG, FliM y FliN, complejo regulador de la rotación del motor; el aparato secretor, el cilindro (que conecta al anillo MS con el gancho); los anillos L (Lipopolisacáridos) y P (Peptidoglicano), que aparentemente funcionan como soportes del cilindro en la membrana externa y capa de peptidoglicano respectivamente; y el complejo Mot, generador de fuerza motora, embebido en la membrana citoplasmática (Zhao *et al.*, 2014, Guo *et al.*, 2014) (Figura 1).

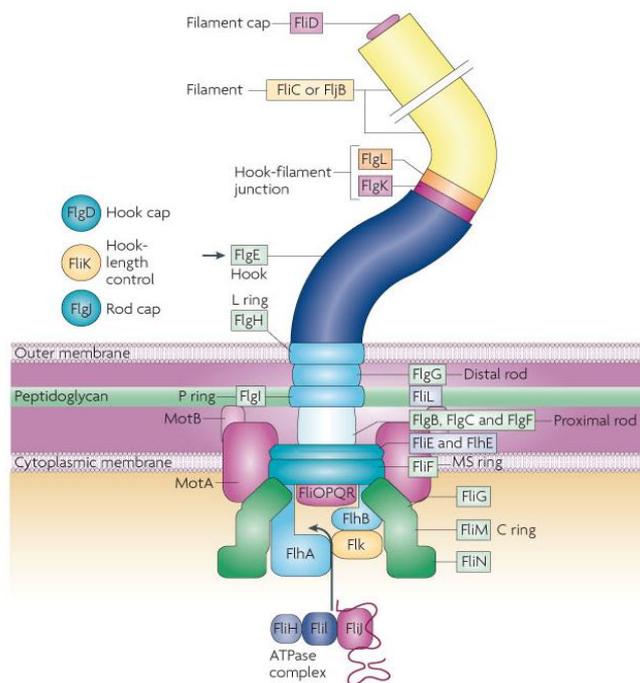


Figura 1.- Componentes flagelares de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. (Tomado de Chevance *et al.*, 2008)

La regulación de la expresión de genes flagelares en *Salmonella* involucra 26 operones que se encuentran organizados en una jerarquía transcripcional, de manera que la expresión de los genes motores está coordinada con el ensamblaje del flagelo (Chevance *et al.*, 2008; Macnab, 2003, Tanabe *et al.*, 2011). Así, se distinguen tres clases de genes: el operón de clase 1 codifica para

flhDC, el regulador central que activa la transcripción de los operones de clase 2 (Figura 2). Las señales medioambientales que controlan la síntesis del flagelo actúan a través de este regulador central. Entre los genes de clase 2 se encuentran genes estructurales de la base del flagelo y del gancho, así como también *fliA*, que codifica para el factor Sigma específico para la transcripción de los operones de clase 3 (σ^{28}) y *flgM* (de clase 2 y 3), que actúa como factor anti-Sigma de FliA. A su vez, *fliA* constituye, junto con *fliZ*, un operón que presenta 2 promotores, de clase 2 y de clase 3, es decir, se activa por su mismo producto. Entre los genes de clase 3 se encuentran *motAB* que codifican para el motor del flagelo, *flgKL* que codifican para las proteínas que unen el gancho con el filamento y *fliC* que codifica para la proteína estructural del filamento flagelar, el cual no comienza a transcribirse hasta que la estructura flagelar ha alcanzado una determinada etapa de ensamblaje. Esto se consigue a través de un mecanismo de control en el cual FlgM, el factor anti-sigma que se une a FliA previniendo la asociación de ésta con la RNA polimerasa, se secreta al exterior celular a través del propio sistema de secreción del flagelo sólo cuando el ensamblaje del cuerpo basal y del gancho se han completado, pudiéndose activar entonces la transcripción de los genes de clase 3 mediada por FliA (Wozniak *et al.*, 2010; Chilcott *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2014; Tanabe *et al.*, 2011). En este proceso, FIK está involucrada evitando la secreción prematura de FlgM al periplasma (Aldridge *et al.*, 2006). Así, todas las subunidades que van a componer el gancho, la unión de éste al filamento, el filamento y la tapa del mismo se van secretando al exterior secuencialmente a través del propio sistema de secreción flagelar, consistente en un sistema de secreción tipo III (SST3).

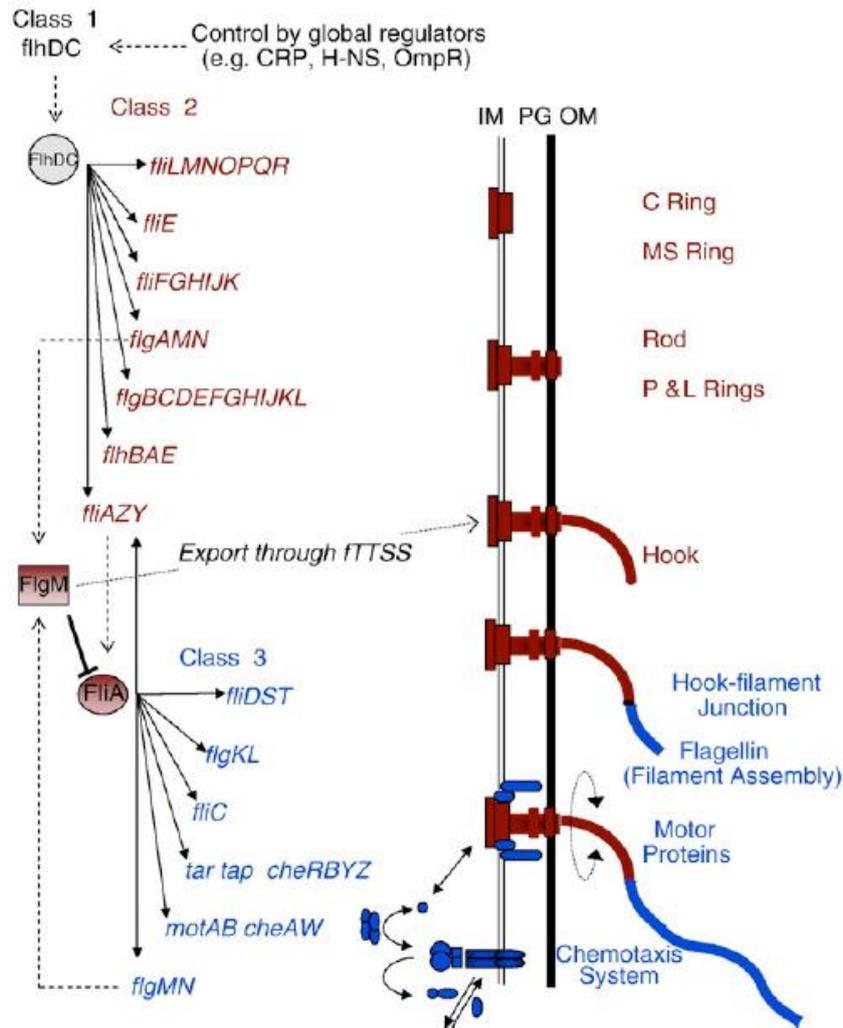


Figura 2. Esquema mostrando el orden temporal de transcripción de genes flagelares. Tomado de Apel, D. and Surette, M., 2008.

4.4.- Modelos experimentales *in vivo* para el estudio de la respuesta inflamatoria intestinal a la infección por *Salmonella*

La falta de un modelo animal de laboratorio adecuado representó una limitante importante para el estudio de los mecanismos moleculares de la respuesta inflamatoria intestinal causada por *Salmonella* no tifoidea. El modelo murino ha sido el clásicamente utilizado, pero éste no resulta apropiado ya que a diferencia de lo que ocurre en humanos, cuando ratones susceptibles se infectan con *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* u otros serotipos de SNT, desarrollan una enfermedad similar a la fiebre tifoidea humana, caracterizada por presentar infección sistémica sin diarrea y escasa infiltración de neutrófilos en el intestino (Shirai *et al.*, 1979). Un modelo que ha resultado más apropiado es el de las asas intestinales bovinas, que permiten evaluar la infiltración de linfocitos polimorfonucleares y la secreción de citoquinas proinflamatorias en la mucosa,

reproduciendo varios de los síntomas observados durante la salmonelosis humana (Zhang *et al.*, 2003, Laughlin *et al.*, 2014). Sin embargo, este modelo tiene la limitante de requerir infraestructura adecuada para la experimentación con bovinos y mayores restricciones éticas. Más recientemente, se ha comenzado a utilizar un modelo de ratón pre-tratado con estreptomicina descrito por Barthel *et al.* 2003, en el cual ratones C57/Bl6 se tratan con estreptomicina previamente a la infección con *Salmonella*. De esta manera, una vez alterada la microbiota intestinal normal mediante el tratamiento con el antibiótico, la infección con *Salmonella* por la ruta oral induce muchos de los síntomas de una enterocolitis observada en humanos, incluidos edema, daño epitelial y un influjo importante de neutrófilos en el ciego. Todos estos procesos se pueden evaluar mediante un análisis histológico de los tejidos, concretamente de la mucosa del ciego, que es donde las alteraciones patológicas se hacen más evidentes (Barthel *et al.*, 2003). Asimismo, el proceso inflamatorio local se puede revelar mediante el estudio transcripcional de genes proinflamatorios, como quemoquina derivada del queratinocito (Kc, homóloga murina de la IL-8 en humanos), Interleuquina 17a (IL17a), Interferón gamma (IFN γ), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y Mip-3A (CCL20), así como de péptidos antimicrobianos, como Lipocalina 2 (Lcn2), Calprotectina (S100A9), los cuales se ven dramáticamente inducidos a consecuencia de la infección (Raffatellu *et al.*, 2009).

4.5.- Antecedentes del grupo de trabajo

Nuestro grupo de investigación lleva varios años abocado al estudio de los factores bacterianos involucrados en la invasividad de *Salmonella* no tifoidea, utilizando como modelo cepas uruguayas de los serovares Enteritidis y Dublin, y realizando estudios comparativos entre ambos grupos de cepas. Como se comentó anteriormente, estas dos serovariedades comparten propiedades antigénicas y están filogenéticamente muy relacionadas. A pesar de esto, difieren significativamente en su potencial patogénico y sus comportamientos epidemiológicos (Selander *et al.*, 1992; Porwollik *et al.*, 2004). S. Enteritidis es un serotipo altamente prevalente como causa de enfermedad transmitida por alimentos en todo el mundo produciendo cuadros de gastroenteritis autolimitada. S. Dublin en cambio, infecta generalmente al ganado vacuno produciendo abortos e infección sistémica, aunque ocasionalmente alcanza al hospedador humano. Cuando ocurren casos de salmonelosis humana por el serovar Dublin, con frecuencia se trata de casos de

enfermedad invasiva con aislamiento del microorganismo a partir del hemocultivo, produciendo cuadros con altas tasas de morbi-mortalidad (Fierer y Guiney, 2001). En este sentido, se comparó el comportamiento de 13 aislamientos uruguayos de *S. Enteritidis* y 4 de *S. Dublin* obtenidos de diferentes períodos y orígenes, en un modelo murino de infección oral. Se corroboró que *S. Dublin* es significativamente más invasiva que *Enteritidis* y causa mayor letalidad, reproduciendo este resultado lo observado para estos serotipos en humanos (Figura 3) (Betancor *et al.*, 2009).

Este mismo conjunto de cepas fue evaluado mediante análisis de genómica comparativa encontrándose que en el genoma de *S. Dublin* existen 200 genes inactivos (o pseudogenes) que son activos en *Enteritidis*, y a la inversa, 70 genes activos en *Dublin* son pseudogenes en *Enteritidis*. Este resultado es muy interesante dado que re-afirma datos previos de nuestro grupo y de otros investigadores, que indican que aquellos serovares de *Salmonella* que presentan rango de hospedero reducido y consecuentemente mayor invasividad, poseen una degradación genómica mayor que aquellos serovares de amplio rango de hospedador (Betancor *et al.*, 2012).

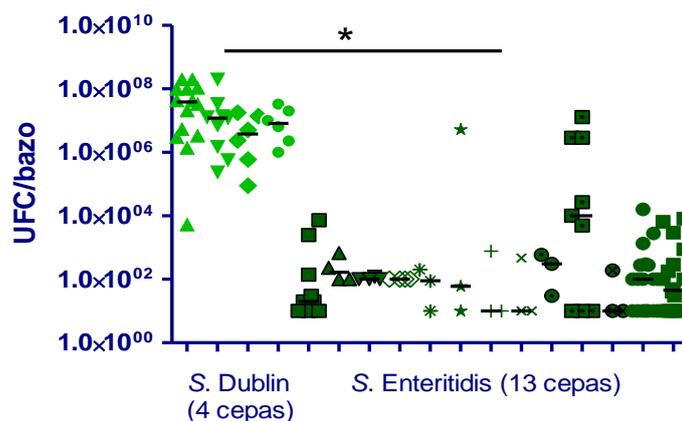


Figura 3. Grupos de ratones BALB/C fueron inoculados con $2-5 \times 10^6$ UFCs de *S. Dublin* (verde claro) o *S. Enteritidis* (verde oscuro) por vía oral. 5-7 días p/i se sacrificaron los animales y se cuantificaron UFCs en homogeneizados de bazos. *diferencia significativa entre grupos (Mann Whitney test $p < 0,05$).

Al comienzo de este trabajo había disponibles en el CNS 7 aislamientos clínicos de *S. Dublin* (SDu1 - SDu7) de los cuales 5 eran derivados de infecciones sistémicas y 2 de gastroenteritis (Tabla 1). El análisis de la movilidad de estos aislamientos sugirió una segregación entre los derivados de infección sistémica y los derivados de gastroenteritis. Se observó que 3 de 7 aislamientos eran no móviles (Figura 4A), los cuales fueron originados de hemocultivo (Tabla 1, Apartado 5.1.- Cepas, medios de cultivo y crecimiento), mientras que los 2 derivados de gastroenteritis presentaron movilidad similar a una cepa móvil del serovar *Enteritidis* usada como

referencia (*S. Enteritidis* P125109). Además, estudios de qRT-PCR de células epiteliales intestinales humanas infectadas con aislamientos de *S. Dublin* de ambos orígenes revelaron que aquellos que carecían de movilidad eran capaces de generar una respuesta pro-inflamatoria significativamente menor que aquellos móviles (Figura 4B). El estudio del perfil de proteínas de superficie demostró ausencia de flagelina en los 3 aislamientos no móviles (Figura 4C) (Sasías *et al.*, 2010). Los 3 aislamientos aflagelados presentaban una fórmula antigénica 9,12:-:-, y, basados en la secuencia de *fliC* y análisis de *Multilocus Sequence Type* (MLST) se confirmó que eran *S. Dublin*.

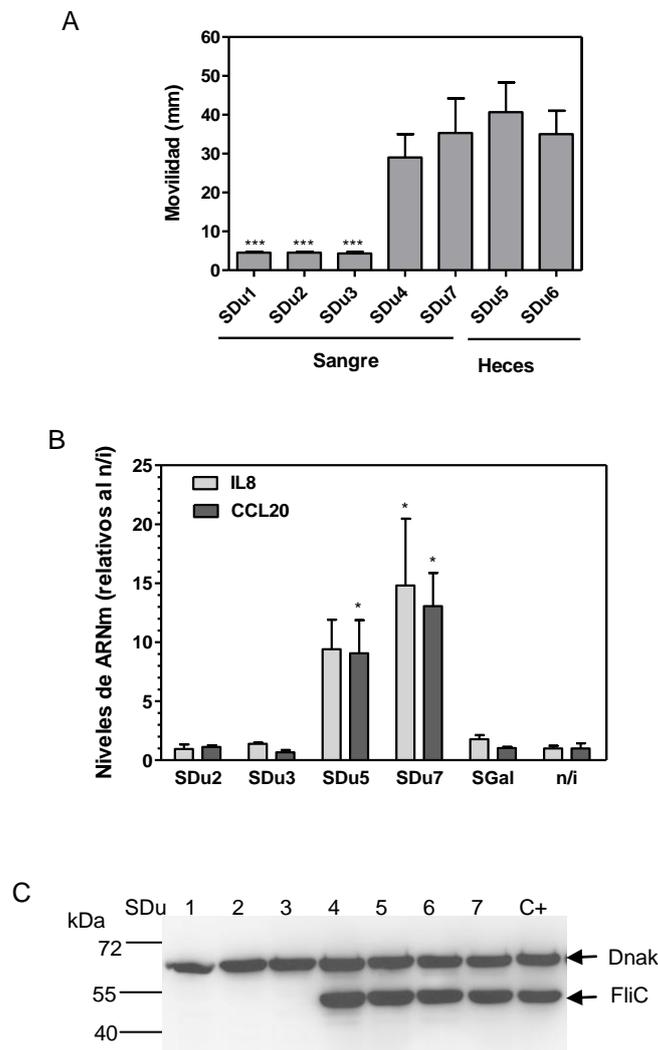


Figura 4 (A) Medición de la movilidad de aislamientos *S. Dublin*. Se graficó el diámetro del halo de crecimiento (en mm) luego de 6 horas a 37°C de cada aislamiento. Se muestran los resultados (media y desviación estándar) de 3 experimentos independientes. *** Diferencia significativa respecto a SDu5 ($P < 0,001$). La cepa SDu4 presentó movilidad ligeramente inferior al resto de las cepas móviles, pero esta diferencia no resultó significativa. Se indica en el eje de las X el origen de los aislamientos, siendo sangre indicativo de una infección invasiva y heces una gastroenteritis localizada (B) Análisis de la respuesta transcripcional de Caco-2 a la infección por *S. Dublin*. Se infectó la línea celular Caco-2 (derivada de epitelio

intestinal humano) con aislamientos SDu2, SDu3, SDu5 o SDu7, luego de 3 horas p.i. se midieron los niveles de ARNm para CCL20 e IL8 por qRT-PCR. (SGal) Cepa del serovar aflagelado *S. Gallinarum*. (n/i) células no infectadas. * Diferencia estadística respecto a células no infectadas ($P < 0,05$). Se muestran Medias y Desviación estándar de 2 experimentos independientes. (C) Análisis de western blotting de extractos de proteínas totales usando antisuero anti-FliC. Se utilizaron anticuerpos específicos monoclonales contra DnaK como control de carga. Se muestra a la izquierda el marcador de peso molecular en kDa.

Además, en la búsqueda de posibles mutaciones que pudieran estar causando la ausencia de flagelina, se compararon las secuencias nucleotídicas de los genes *fliA*, *flgM*, *flk* y *fliC* de los aislamientos móviles y no móviles y no se encontraron diferencias. No solo se secuenciaron las regiones codificadoras, sino también las regiones reguladoras corriente arriba.

5.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a estos datos y antecedentes podemos hipotetizar que la ausencia del flagelo podría ser un mecanismo mediante el cual cepas del serotipo Dublin consiguen evadir la respuesta inflamatoria local intestinal del hospedero promoviendo así su diseminación a sitios sistémicos. Consideramos importante elucidar el mecanismo molecular implicado en la ausencia de flagelo observada en cepas derivadas de enfermedades invasivas de este serotipo, para poder así evaluar las posibilidades de reversión del mismo.

Por lo tanto, en este trabajo nos planteamos el siguiente objetivo general:

- Estudiar la respuesta inflamatoria generada por aislamientos aflagelados versus flagelados de *S. enterica* serovar Dublin a nivel intestinal en un modelo animal. Asimismo, nos planteamos elucidar los mecanismos moleculares responsables del fenotipo aflagelado en cepas derivadas de enfermedades invasivas de dicho serovar y determinar si dicho fenotipo es reversible.

Los objetivos específicos son:

- 1- Verificar si los aislamientos aflagelados de *S. Dublin* mantienen su fenotipo *in vivo* y evaluar la respuesta inflamatoria generada a nivel de ciegos de ratones infectados con una cepa flagelada versus una carente de flagelo.
- 2- Cuantificar los niveles de expresión del gen *fliC* en los aislamientos aflagelados comparados con los flagelados.
- 3- Estudiar la expresión de los genes *fliA* y *flgM*, así como también la localización y niveles celulares de estas proteínas reguladoras en cepas flageladas y aflageladas.
- 4- Verificar si los aislamientos aflagelados de *S. Dublin* tienen la capacidad intrínseca de expresar el fenotipo móvil mediante pasajes sucesivos en agar de movilidad.
- 5- Identificar posibles reguladores negativos de la expresión del flagelo mediante el análisis comparativo de los genomas completos de las cepas en estudio, así como también de cepas de *S. Dublin* cuyos genomas completos se encuentran disponibles en las bases de datos públicas.
- 6- Analizar el fenotipo de movilidad y presencia de flagelina en una colección de aislamientos de *S. Dublin* obtenidos de ganado bovino.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Cepas, medios de cultivo y crecimiento

Los aislamientos de *Salmonella* utilizados fueron obtenidos del Centro Nacional de *Salmonella* (Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR) y de la Unidad de Microbiología del Departamento de Laboratorios de Salud Pública (Ministerio de Salud Pública) (Tablas 1 y 2).

Para las construcciones moleculares se empleó como hospedera la cepa de *Escherichia coli* DH5 α y para la producción de proteínas para su purificación la cepa de *E. coli* MC1061. Para transformar aislamientos de *S. enterica* con las construcciones obtenidas en *E. coli* se hizo un pasaje intermedio por la cepa de *S. enterica* ser. Typhimurium SL5338 (r^+m^+) (Tabla 3).

Las cepas se cultivaron en Luria-Bertani con Agar 1,5% (LBA) en aerobiosis a 37°C; para ensayos de movilidad la concentración de Agar fue de 0,3% (Agar blando o semisólido). Para obtener cultivos en fase estacionaria se creció en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C en un agitador orbital a 200rpm durante 14 a 16 horas (Overnight – O/N). Cuando fue requerido, estos medios fueron suplementados con Ampicilina (100 μ g/ml) o Estreptomina (50 μ g/ml).

Tabla 1.- Aislamientos de origen humano de *S. enterica* ser. Dublin empleados en este trabajo

Aislamientos humanos	Año	Origen	Movilidad	Información del paciente
SDu1	1995	Sangre	-	N/D
SDu2	2004	Sangre	-	N/D
SDu3	2006	Sangre	-	Femenino, 41 años, asmática, diabética
SDu4	2008	Sangre	+	Masculino, joven, adicción a drogas
SDu5	2000	Heces	+	N/D
SDu6	2005	Heces	+	Masculino, 40 años
SDu7	2008	Sangre	+	Masculino, 1 año
SDu8	2011	Sangre	+	Masculino, 76 años
SDu9	2011	Sangre	-	Femenino, 50 años
SDu10	2011	Orina	+	Masculino

N/D: no disponible

Tabla 2.- Aislamientos de origen animal de *S. enterica* ser. Dublin empleados en este trabajo

Aislamientos bovinos	Año	Origen
75/95	1995	N/D
56/96	1996	Ternero, linfa
57/96	1996	Ternero, pulmón
69/96	1996	Ternero
72/96	1996	Ternero
73/96	1996	Bilis
74/96	1996	Hígado
75/96	1996	Ternero
76/96	1996	Ternero
79/98	1998	N/D

210/00	2000	Ternero
73/04	2004	Ternero
74/04	2004	Ternero
75/04	2004	Ternero
99/04	2004	Feto

Tabla 3.- Otras cepas utilizadas

Cepa	Características	Referencias
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁻), λ -	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> MC1061	F ⁻ Δ (<i>ara-leu</i>)7697[<i>araD139</i>] _{B/r} Δ (<i>codB-lacI</i>)3 <i>galK16galE15</i> λ ⁻ <i>e14⁻ mcrA0 relA1 rpsL150</i> (strR) <i>spoT1 mcrB1 hsdR2</i> (r ⁺ m ⁺)	Casadaban <i>et al</i> , 1980
MC1061/pGEX	<i>E. coli</i> MC1061 portando el plásmido pGEX4T-1	Presente trabajo
MC1061/pGEXA	<i>E. coli</i> MC1061 portando el gen <i>fliA</i> de SDu5 clonado en el plásmido pGEX4T-1	Presente trabajo
MC1061/pGEXM	<i>E. coli</i> MC1061 portando el gen <i>flgM</i> de SDu5 clonado en el plásmido pGEX4T-1	Presente trabajo
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium SL5338	<i>galE</i> (r ⁺ m ⁺)	Brown <i>et al</i> , 1987
SDu3/pJF	SDu3 portando el plásmido pJF119EH	Presente trabajo
SDu5/pJF	SDu5 portando el plásmido pJF119EH	Presente trabajo
SDu3/pBA	SDu3 portando el gen <i>fliA</i> de SDu5 clonado en el plásmido pBAD22	Presente trabajo
SDu3/pJA	SDu3 portando el gen <i>fliA</i> de SDu5 clonado en el plásmido pJF119EH	Presente trabajo
SDu3/pJAmot+6	SDu3/pJA revertiente del fenotipo de movilidad, al cabo de 6 pasajes	Presente trabajo
SDu3/pJAmot+7	SDu3/pJA revertiente del fenotipo de movilidad, al cabo de 7 pasajes	Presente trabajo
SDu3/pJAmot+8	SDu3/pJA revertiente del fenotipo de movilidad, al cabo de 8 pasajes	Presente trabajo
SDu3/pJAmot+9	SDu3/pJA revertiente del fenotipo de movilidad, al cabo de 7 pasajes	Presente trabajo
SDu3/pBAD	SDu3 portando el plásmido pBAD22	Presente trabajo
SDu5/pBAD	SDu5 portando el plásmido pBAD22	Presente trabajo
SDu5/pBA	SDu5 portando el gen <i>fliA</i> de SDu5 clonado en el plásmido pBAD22	Presente trabajo
SDu5/pJA	SDu5 portando el gen <i>fliA</i> de SDu5 clonado en el plásmido pJF119EH	Presente trabajo
SDu3/pBE	SDu3 portando el gen <i>fliE</i> de SDu5 clonado en el plásmido pBAD22	Presente trabajo
SDu3/pJE	SDu3 portando el gen <i>fliE</i> de SDu5 clonado en el plásmido pJF119EH	Presente trabajo
<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium SL1344	Portadora del gen <i>aadA</i> , responsable de la resistencia a estreptomicina, str ^R	Barthel <i>et al</i> , 2003
SDu3 Str ^R	SDu3 portadora del gen <i>aadA</i> proveniente de <i>S. Typhimurium</i> SL1344, str ^R	Presente trabajo
SDu5 Str ^R	SDu5 portadora del gen <i>aadA</i> proveniente de <i>S. Typhimurium</i> SL1344, str ^R	Presente trabajo
SDu3/pJE Str ^R	SDu3/pJE portadora del gen <i>aadA</i> proveniente de <i>S. Typhimurium</i> SL1344, str ^R	Presente trabajo
PT4 P125109 <i>fliC::kan^R</i>	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis con el gen <i>fliC</i> inactivado por una cassette de resistencia a kanamicina <i>fliC::kan^R</i>	Yim <i>et al</i> , 2010
SDu5 Str ^R <i>fliC::kan^R</i>	SDu5 resistente a estreptomicina portadora de gen <i>aadA</i> y el cassette <i>fliC::kan^R</i> , str ^R	Presente trabajo

6.2.- Ensayos de Movilidad y pasajes sucesivos

Para los diferentes ensayos de movilidad se sembraron 2µl de cultivo O/N en forma de spot sobre la superficie de una placa de Agar semisólido y se incubó por 6 horas a 37°C. Los valores, expresados en mm, corresponden al diámetro del halo a las 6 hs, siendo 4mm equivalente a que la cepa no presentó fenotipo móvil. Para los ensayos con las cepas portadoras de los plásmidos pBAD22 o pJF119EH fue necesario agregar a todos los medios Ampicilina (100ug/ml) y el inductor correspondiente, Arabinosa o IPTG, respectivamente.

Para los pasajes sucesivos en los que se buscaba revertir el fenotipo inmóvil de la cepa SDu3, se realizó un ensayo de movilidad con dicha cepa pero dejando incubar las placas a 37°C por 24 horas, luego se repicaba del borde del spot y resuspendía en 100µl de LB para sembrar nuevamente 2µl en placa de agar semisólido y volver a incubar 24 horas más.

En los experimentos con la cepa SDu3 transformada con los plásmidos que expresaban de forma inducible el gen *fliA* de una cepa móvil, para preparar el agar semisólido con un gradiente de concentración del inductor correspondiente (de 0 a 0,02% Arabinosa y 0 a 0,05mM IPTG) se vertía en la placa Petri 10ml de agar semisólido suplementado con 0,02% Arabinosa o 0,05mM IPTG y se lo dejaba solidificar con una leve pendiente. Luego se le agregaba encima 10ml de agar semisólido sin inductor con la placa en posición horizontal. Se sembraban 5 spots de cultivos O/N de forma que la distancia entre un spot y otro fuese similar (enumerados del 1 al 5). Cada 24 horas se repicaban los spots a una nueva placa sembrándolos en la misma posición para que tuvieran una concentración de inductor similar en cada pasaje.

En otro experimento se prepararon placas con agar semisólido con una serie de concentraciones específicas de inductor. En este caso se sembraron 2µl de cultivo en fase exponencial. Para esto se partió de un cultivo O/N, que se diluyó 1/50 en 3ml de caldo LB suplementado con 0,005% Arabinosa o 0,01mM IPTG, respectivamente, e incubó 2 horas a 37°C en agitación, previamente a sembrar las placas de movilidad.

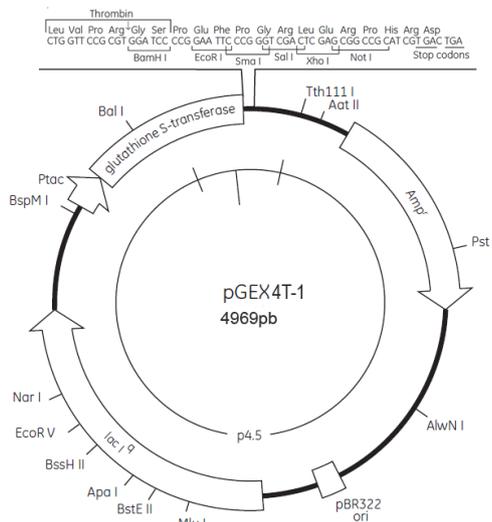
6.3.- Plásmidos

Los vectores utilizados en este trabajo, pBAD22, pJF119EH y pGEX4T (Figura 5), son detallados en la tabla 4, así como las construcciones obtenidas.

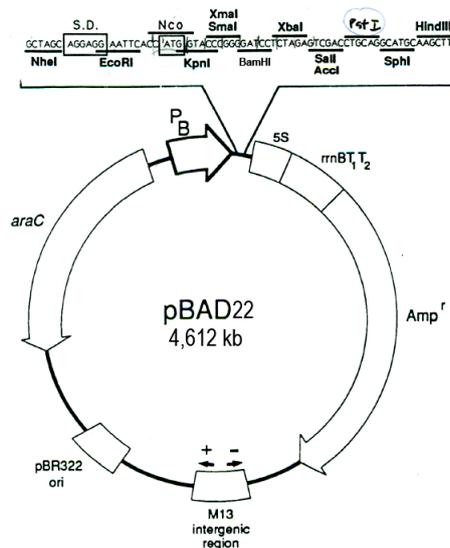
Tabla 4. Plásmidos y construcciones

Plásmidos y construcciones	Características	Referencia
pBAD22	Vector de expresión bajo control del promotor P _{BD} y <i>araC</i> , inducible por L-arabinosa, Amp ^R	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pJF119EH	Vector de expresión bajo control del promotor P _{Tac} y <i>lacI^f</i> , inducible por IPTG, Amp ^R	Fürste <i>et al.</i> , 1986
pGEX4T-1	Vector de expresión, expresa la proteína fusionada al extremo Ct de GST (Glutathione-S-transferasa), bajo control del promotor P _{Tac} y <i>lacI^f</i> , inducible por IPTG, Amp ^R	Kaelin <i>et al.</i> , 1992
pBA	pBAD22 conteniendo el gen <i>fliA</i> de SDu5 bajo control del promotor P _{BD}	Presente trabajo
pJA	pJF119EH conteniendo el gen <i>fliA</i> de SDu5 bajo control del promotor P _{TAC}	Presente trabajo
pBE	pBAD22 conteniendo el gen <i>fliE</i> de SDu5 bajo control del promotor P _{BD}	Presente trabajo
pJE	pJF119EH conteniendo el gen <i>fliE</i> de SDu5 bajo control del promotor P _{TAC}	Presente trabajo
pGEXA	pGEX4T-1 conteniendo el gen <i>fliA</i> de SDu5 fusionado a GST bajo control del promotor P _{TAC}	Presente trabajo
pGEXM	pGEX4T-1 conteniendo el gen <i>flgM</i> de SDu5 fusionado a GST bajo control del promotor P _{TAC}	Presente trabajo

[A]



[B]



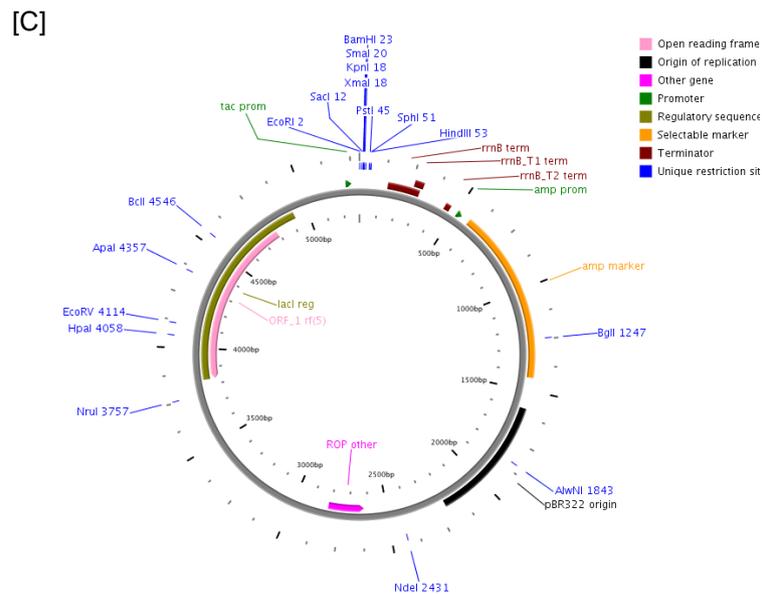


Figura 5. Mapas de los plásmidos pGEX4T-1 [A], pBAD22 [B], pJF119EH [C].

6.4.- Obtención de las construcciones moleculares

6.4.1.- Construcción de pBA y pJA

El gen *fliA* proveniente de una cepa móvil fue clonado en los plásmidos pBAD22 y pJF119EH, para luego ser transformados en una cepa no móvil (SDu3). Para ésto se partió de ADN genómico de la cepa flagelada SDu5. Se lo extrajo utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). Se centrifugó 0,5 ml de cultivo O/N a 6000g durante 10 minutos. El precipitado obtenido fue procesado según instrucciones del fabricante. El ADN resultante se cuantificó al Nanodrop y se conservó a -20°C.

A partir del ADN genómico se amplificó por PCR el gen *fliA*. Los cebadores *fliA3-F* y *fliA3-R* usados (tabla 5) fueron diseñados conteniendo los sitios de restricción *MfeI* y *HindIII*, respectivamente. La concentración final de cada reactivo en la mezcla fue 2mM MgCl₂, 0,3mM dNTPs, 0,5µM de cada primer, en un volumen final de 50µl. La amplificación se llevó a cabo usando 0,3µl de una mezcla de polimerasas Taq:Pfu en una proporción 10U:1U y 2µl de ADN. Las condiciones de ciclado fueron: una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 94°C seguida de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos. El producto de la PCR (738pb) se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% (p/v) en *buffer* TBE 0,5X y posterior tinción con bromuro de etidio. Luego fue purificado utilizando el kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen).

Todas las digestiones enzimáticas en este trabajo fueron realizadas a 37°C en baño maría durante

3 horas y siguiendo las indicaciones del fabricante en cuanto a la elección del buffer a utilizar.

Para las construcciones pBA y pJA, el inserto fue digerido con 1µl (10U) de las enzimas *MfeI* (Fermentas) y *HindIII* (Invitrogen). 5µg de los plásmidos pBAD22 o pJF119EH se digirieron con 1µl (10U) de la enzima *HindIII* (Invitrogen). Luego fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y los plásmidos linealizados extraídos de banda usando el kit QiaExII Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, fueron digeridos con 1µl (10U) de la enzima *EcoRI* (Fermentas), la cual deja extremos cohesivos compatibles con los dejados por *MfeI*.

La ligación fue realizada con 1U de T4 DNA ligase (Invitrogen) a 16°C O/N y una relación vector – inserto de 1:10 moléculas.

6.4.2.- Transformación de las construcciones moleculares

La mezcla de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5α obtenidas por el método del CaCl₂. Estas fueron obtenidas a partir de un cultivo O/D (a una DO_{600nm} ~ 0,4-0,6) en 100ml de LB. Luego de algunos minutos en baño de hielo, se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y 6000g, descartó el sobrenadante y resuspendió el precipitado en 50ml (mitad del volumen del cultivo) de CaCl₂ 50mM frío. Se centrifugó y descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 2,5ml (1/40 partes del volumen del cultivo) de CaCl₂ 50mM frío con 10% de glicerol y se repartió en alícuotas de 100µl.

A cada alícuota de células DH5α se le agregó 10µl de la mezcla de ligación y se incubaron 20 minutos en hielo, 2 minutos a 42°C y 1 minuto en hielo. Se agregaron 900µl de LB precalentado, se incubó durante 1 hora a 37°C y agitación y se sembró en LBA suplementado con Ampicilina e incubó a 37°C hasta la mañana siguiente.

Para identificar células transformadas con el plásmido recombinante se utilizó el método de Toothpick. Brevemente, se reaislaron en forma de estrías, en LBA suplementado con Ampicilina, una determinada cantidad de colonias correctamente identificadas con una cuadrícula numerada. Al día siguiente se realizó una extracción rápida de plásmido resuspendiendo una punta de tip de estría en una solución de lisis compuesta por NaOH 50mM, glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5mM, azul de bromofenol 0,025%. Las mezclas fueron incubadas a 65°C por 10 minutos, agitadas en vortex y centrifugadas. Luego se las separó por electroforesis en gel de Agarosa 0,8%. Como

referencia se cargó en el gel los plásmidos sin inserto. Finalmente se seleccionaron 2 o 3 colonias que mostraron tener un tamaño de plásmido superior al vector religado. Fueron crecidas en LB suplementado con Ampicilina O/N para posteriormente extraer los plásmidos utilizando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos recombinantes se verificaron por análisis de restricción usando las mismas enzimas empleadas para el clonaje y otra que sólo linearizara el constructo, y finalmente la correcta inserción e identidad de los insertos se verificó por secuenciación con cebadores que hibridan en el plásmido de clonaje, a ambos lados del polylinker (Unidad de Biología Molecular del IPMont).

Antes de ser electroporados en el aislamiento destino de *S. enterica*, los plásmidos recombinantes obtenidos en *E. coli* se electroporaron en la cepa *S. Typhimurium* SL5338 (r-m+), para luego ser extraídos y electroporados en la cepa destino. De esta manera se evita que el sistema de restricción de *S. enterica* reconozca como ajenas las construcciones obtenidas en *E. coli*.

Para obtener las células electrocompetentes de *S. enterica* se partió de 250ml de cultivo O/D. Luego de incubar en baño de hielo por 20 minutos se centrifugó 10 minutos a 1500g y 4°C. Se lavó el precipitado 3 veces en agua MQ fría estéril y una vez en glicerol frío al 10%. Finalmente, se centrifugó, se resuspendió el precipitado en 400µl de glicerol 10% y se repartió en alícuotas de 60µl. Aquellas alícuotas que no iban a ser utilizadas fueron guardadas a -80°C.

Las electroporaciones se realizaron siempre con 1µl (aproximadamente 100ng) de cada construcción. Inmediatamente después del pulso eléctrico (1750V, 50mA, 89W, 40µF, 500Ω), mediante electroporador (Bio-Rad), se le agregó 1ml de LB precalentado y se incubó 1 hora a 37°C y 200rpm de agitación. Finalmente se plaquearon 100µl en LBA con Ampicilina. Luego se extrajeron los plásmidos de la forma descrita anteriormente y se electroporaron en las cepas destino SDu3 y SDu5 electrocompetentes.

6.4.3.- Construcción de pBE y pJE

También se clonó el gen *fliE* de SDu5 en los plásmidos pBAD22 y pJF119EH y se los transformó en SDu3. Para ésto se amplificó el gen usando los cebadores *fliE2-F* y *fliE2-R* (tabla 5) diseñados con los sitios de corte para *EcoRI* y *HindIII*, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50µl, con 1,75mM MgCl₂, 0,3mM dNTPs, 0,5µM de cada primer, 0,4µl una mezcla de polimerasas Taq:Pfu en una proporción 10U:1U y 2,5µl de ADN genómico. Las condiciones de

ciclado fueron: una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 48°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. El producto de la PCR (333pb) fue purificado utilizando el kit PCR Purification (Qiagen).

El producto de PCR purificado fue digerido con 1µl (10U) de las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. El inserto fue ligado a los plásmidos pBAD22 o pJF119EH previamente digeridos con las mismas enzimas en una relación de 5 moléculas de inserto con 1 de plásmido. La mezcla de ligación fue transformada en células CaCl₂ competentes de DH5α. Se seleccionó por toothpick colonias transformadas con los plásmidos recombinantes y se realizó la extracción plasmídica utilizando el kit Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen). Luego de los análisis de restricción correspondientes y análisis de la secuencia del inserto, los plásmidos fueron electroporados en *S. Typhimurium* SL5338 y de ahí obtenidos para su electroporación en la cepa destino SDu3.

6.4.4.- Construcción de pGEXA y pGEXM

En este trabajo fue necesario obtener antisueros anti-FliA y anti-FlgM para poder detectarlas mediante análisis de western blotting. Para ésto se clonaron los genes *fliA* y *flgM* de un aislamiento móvil de *S. Dublin* (SDu5) en el plásmido pGEX4T-1, el cual produce la proteína fusionada al extremo Ct de la GST (Glutation-S-transferasa), bajo control del promotor P_{Tac} y el represor *lacI^q*, inducible por IPTG.

Primeramente, del ADN genómico de la cepa SDu5 se amplificaron por PCR los genes *flgM* y *fliA*. Los cebadores usados fueron, para *flgM*, flgM3-F y flgM3-R, diseñados con los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *XhoI*, respectivamente, y, para *fliA*, fliA3-F y fliA4-R, conteniendo los sitios para *MfeI* y *XhoI*, respectivamente (tabla 5). A su vez, los cebadores forward se diseñaron considerando el marco de lectura de la secuencia codificante para la GST. Las concentraciones de los reactivos y condiciones de ciclado fueron las mismas que para la amplificación de *fliA* descritas previamente. A *fliA* se lo digirió con las enzimas *MfeI* y *XhoI*, y a *flgM* con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* y se los clonó en el plásmido pGEX4T-1 previamente digerido con *EcoRI* y *XhoI*. Para las ligaciones, en 10µl de volumen final de las reacciones, se colocaron el plásmido e inserto en una relación de 1:10 moléculas para *fliA* y 1:16 moléculas para *flgM*. Las ligaciones fueron transformados por *heat-shock* en la cepa de *Escherichia coli* DH5α. Por el método de toothpick se identificaron colonias sospechosas de portar las construcciones recombinantes, se crecieron en

caldo LB y se realizó extracción de plásmidos. Luego se realizaron análisis de restricción y de secuencia.

6.4.5.- Construcción de las cepas resistentes a estreptomicina para su evaluación en el modelo de colitis en ratón

En los experimentos *in vivo* se utilizaron cepas resistentes a estreptomicina, dado que a los animales se les administraba estreptomicina previamente a su inoculación con las bacterias (ver apartado de modelo de colitis en ratón, Barthel *et al*). Para obtener las cepas SDu3 y SDu5 resistentes a estreptomicina, se les realizó una transducción con el fago P22 portador del gen *aadA* usando un lisado proveniente de la cepa *S. Typhimurium* SL1344, resistente a estreptomicina (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/>). Las cepas resultantes fueron capaces de crecer en presencia de 0,5mg/ml de estreptomicina y se les testeó la movilidad y aglutinación por suero Anti-O. Además, se realizaron curvas de crecimiento para verificar que la manipulación genética no hubiese afectado las propiedades de crecimiento de los aislamientos originales.

6.4.6.- Construcción de la cepa SDu5 *fliC::kan^R* resistente a estreptomicina para su evaluación en el modelo de colitis en ratón

Mediante transducción por el fago P22 portando un cassette *fliC::kan^R* de la cepa PT4 P125109 *fliC::kan^R* de *S. Enteritidis*, se obtuvo la cepa SDu5 *fliC::kan^R* derivada de la SDu5 resistente a estreptomicina previamente construida (Yim *et al.*, 2010). La cepa resultante fue resistente a kanamicina y estreptomicina y carente de movilidad como se verificó mediante plaqueo en agar semisólido y visualización microscópica; la tasa de crecimiento y la aglutinación en presencia de suero anti-O se mantuvieron sin cambio comparadas a la cepa parental.

Para los experimentos de infección en ratones, las bacterias se crecían O/N a 200 rpm y 37°C en caldo LB con 50mg/ml de estreptomicina; estos cultivos se diluían 1:20 en un medio igual con 0.3M NaCl y se subcultivaba por 4 horas con aireación media (100 rpm).

Tabla 5.- Cebadores empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Tamaño amplicón (pb)	Aplicación/Características
icdA-F icdA-R	TGGTATCGGTGTTGATGTCACCTC CATCCTGGCCGTAAACCTGTGTG	140	qRT-PCR en cultivo bacteriano, normalizador gen

fliC-F fliC-R	AGATCACCTTAGCTGGCAAACC CCCCAGAGAAGAACGAAGCTGC	164	qRT-PCR en cultivo bacteriano
fliA-F fliA-R	GCATCGAACTGGTGAAGAAC GAGCTCTTCCTGGTAATACAGCGT	149	qRT-PCR en cultivo bacteriano
flgM-F flgM-R	CTTTGAAACCCGTTAGCACTGTC GATAGCCGTTTTTAATGCTTCGAC	188	qRT-PCR en cultivo bacteriano
motB1-F motA3-R	TTTATGACGGCGATGATGGC CGGCGTACGAAAATATTCGGC	99	Para cuantificar <i>motB</i> por qRT-PCR en cultivo bacteriano
fliN1-F fliM3-R	TTGAATTCGCTGAATGAGGAAC TCCTGCATAGCACCGCTGACATC	187	Para cuantificar <i>fliN</i> por qRT-PCR en cultivo bacteriano
fliE1-F fliE1-R	AGGGGATTGAAGGGTTATTAGCCA ACGATCCAGCGCAGCATGTAG	Variable según delección	Detección de delección en gen <i>fliE</i>
fliA3-F fliA3-R	TATCAATTGGTGAATTCAGTATACCGC TATAAGCTTCTATAACTTACCCAGTTTGGTG	738	Para clonar en pBAD22 o pJF119EH. Subrayado: sitios de restricción para <i>MfeI</i> y <i>HindIII</i> . Cursiva: codón inicio y stop
fliE2-F fliE2-R	GGGAATTCCATGGCAGCAATACAGGG AGCAAGCTT TTAACCTGCATAGACATCACTT	333	Para clonar en pBAD22 o pJF119EH. Subrayado: sitios de restricción para <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> . Cursiva: codón inicio y stop
flgM3-F flgM3-R	TATGAATTCATGAGCATTGACCGTACCTC TATCTCGAG T TATTACTCTGTAAGTAGCTCTG	312	Para clonar en pGEX4T-1. Subrayado: sitios de restricción para <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> . Cursiva: codón inicio y stop
fliA3-F fliA4-R	TATCAATTGGTGAATTCAGTATACCGC TATCTCGAGCTATAACTTACCCAGTTTGGTG	738	Para clonar en pGEX4T-1. Subrayado: sitios de restricción para <i>MfeI</i> y <i>XhoI</i> . Cursiva: codón inicio y stop
mB-actin-F mB-actin-R	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT CGTCATCCATGGCGAACTG	68	qRT-PCR en ratones, gen normalizador
mCXCL1-F mCXCL1-R	CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAAA ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT	84	qRT-PCR en ratones
mIL17a-F mIL17a-R	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC GGGTCTTCATTGCGGTGG	69	qRT-PCR en ratones
mIFNg-F mIFNg-R	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA CCGCTTCCTGAGGCTGGAT	143	qRT-PCR en ratones
mTNFa-F mTNFa-R	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA CCTCCACTTGGTGGTTTGCT	63	qRT-PCR en ratones
mCCL20-F mCCL20-R	TTTTGGGATGGAATTGGACAC TGCAGGTGAAGCCTTCAACC	69	qRT-PCR en ratones
mLcn2-F mLcn2-R	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT TCTGATCCAGTAGCGACAGC	89	qRT-PCR en ratones
mS100A9-F mS100A9-R	CACCTTGAGCAAGAAGGAAT TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT	95	qRT-PCR en ratones

6.5.- PCR cuantitativa en Tiempo Real para la cuantificación de los niveles de ARNm bacterianos

6.5.1.- Extracción de ARN

Para extraer el ARN bacteriano se empleó el Kit RNeasy (Qiagen). A partir de cultivos O/N, se realizó una dilución 1/100 en caldo LB y se incubó 2 horas a 37°C y 200rpm, hasta una OD_{600nm} de aproximadamente 0,4. En los casos en que se quería cuantificar los niveles de ARNm en condiciones de inducción, el cultivo se incubó durante dos horas a 37°C con agitación en

presencia de inductor (arabinosa o IPTG, según se indica) antes de proceder a la extracción de ARN total. Se mezclaron 250µl de cultivo con 500µl de RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen), y se incubaron 5 minutos a Temperatura Ambiente (TA). Se centrifugó 10 minutos a 5000g. Se continuó el tratamiento del precipitado según instrucciones del fabricante.

Para determinar la concentración y calidad de los ARN extraídos se midió la absorbancia a 260nm (A260) y la relación entre A260/A280, respectivamente, con un espectrofotómetro Nanodrop, dicha relación brinda una medida de la contaminación de los ácidos nucleicos con proteínas.

6.5.2.- Tratamiento con DNAsa

Luego de extraer el ARN total se procedió a degradar el ADN contaminante. A 1µg de ARN de cada muestra, se le agregó 0,4UI de DNAsa I (Invitrogen), se incubó a TA 15 minutos y se inactivó la enzima agregando 2,5 mM de EDTA (concentración final) e incubando a 65°C durante 10 minutos.

6.5.3.- Transcripción reversa

Posteriormente se procedió a sintetizar el ADN copia (cADN) usando la enzima M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase (Invitrogen). Al 1µg de ARN de cada cepa tratado con DNAsa se le agregó una mezcla conteniendo 0,2µg de Random Hexamer primers, 0,5mM dNTPs, 10mM DTT (ditiotreitól), 40 UI RNase OUT y 200 UI de la enzima M-MLV reverse transcriptase, en un volumen total de 20µl. La mezcla de reacción fue incubada por un ciclo de 10 minutos a 25°C, seguido de un ciclo de 50 minutos a 37°C y finalmente 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima. El ADN copia generado se diluyó 1/32 en H₂O libre de nucleasas.

6.5.4.- PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Los cebadores utilizados para cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm) de los diferentes genes fueron diseñados con ayuda del algoritmo Primer-BLAST a partir de las secuencias disponibles en la base de datos GENBANK. Se describen previamente en la tabla 5. Como gen normalizador se usó el gen *icdA*, que codifica para la enzima isocitrato deshidrogenasa (Cummings, 2006), el cual previamente se verificó que no varía sus niveles de mensajero entre las distintas cepas analizadas. Asimismo, se verificó que la eficiencia de las PCRs para los distintos

genes en estudio así como para el gen normalizador, fueran cercanas al 100% y similares entre sí (datos no mostrados), requisito esencial para poder aplicar el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$.

La PCR en tiempo real se llevó a cabo empleando el *kit* comercial QuantiTech SYBR Green PCR (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l conteniendo 5 μ l de QuantiTech SYBR Green mix, 0,3 μ M de ambos cebadores y 2 μ l de una dilución 1/32 del cADN. Las reacciones de PCR se realizaron en el Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences) y en la plataforma ABI 7900HT (Applied Biosystems). Las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a 95°C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos para la cuantificación de *fliC*, *fliA*, *flgM*. Para la cuantificación de *fliN* y *motB* la temperatura de annealing fue de 60°C. Al finalizar la reacción se realizó una curva de disociación a 70°C incrementando 1°C cada 5 segundos hasta alcanzar una temperatura de 99°C.

Luego se llevó a cabo la cuantificación relativa de los ARNm presentes en cada muestra siguiendo el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, 2001). Brevemente, se obtuvo el valor de C_T para el gen normalizador y para los genes problema; se determinó el ΔC_T para cada cepa ($C_{T \text{ Gen problema}} - C_{T \text{ lcdA}}$) y finalmente se calculó el valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ como: $2^{-\Delta CT} (\text{cepa problema}) / 2^{-\Delta CT} (\text{cepa referencia})$. Así, los resultados expresan el número de veces que variaron los niveles de ARNm de cada gen en las diferentes cepas con respecto a la cepa de referencia (*fold change*).

6.6.- Análisis de la producción de proteínas

Para estudiar la producción de proteínas mediante western blot se partió de cultivos en fase exponencial, con el agregado de inductor en los casos indicados. Para identificar FliC se utilizó un anticuerpo de ratón anti- antígeno flagelar Hg (Bio-stat). Se utilizó como control de carga de muestra el anticuerpo monoclonal anti-DnaK (Abcam). Al no conseguirse en plaza los anticuerpos contra FliA y FlgM, fueron producidos en el laboratorio.

6.6.1.- Obtención de antisueros Anti-FliA y Anti-FlgM

Las cepas *E. coli* DH5 α transformadas con los plásmidos pGEXA y pGEXM fueron crecidas O/N en LB suplementado con Ampicilina, al día siguiente se hicieron diluciones 1/100 de estos cultivos, se crecieron durante 2 horas hasta una DO_{600} de 0,4 a 0,6 y, luego de agregar 0,5mM de IPTG, 2

horas más hasta alcanzar una DO_{600} aproximada de 1. Se obtuvieron extractos proteicos celulares para analizarlos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Para obtener estos extractos, se centrifugó el cultivo y resuspendió el precipitado en PBS conteniendo 0,15mM PMSF, 5mM EDTA y lisozima 0,1mg/ml, luego se sonicó con 6 pulsos de 15 segundos (separados por intervalos de 1 minuto en hielo) hasta la completa ruptura de las bacterias (verificada por análisis al microscopio de contraste de fases), se le agregó Triton X-100 a una concentración final de 0,5% y se centrifugó durante 30 minutos a 4°C y 9500g para separar la fracción soluble (sobrenadante) de la insoluble o cuerpos de inclusión (precipitado). Como se observaba que las proteínas de interés formaban cuerpos de inclusión, se usó como hospedera para la producción de las mismas la cepa de *E. coli* MC1061 y se consiguieron niveles de proteína en la fracción soluble.

Para purificar las proteínas se incubó el extracto proteico soluble con una resina de Glutatió agarosa (Sigma) (sustrato de la GST) O/N a 4°C en agitación orbital en una columna de policarbonato, y posteriormente se recogió el flow through (o fracción no unida a la resina). Se realizaron 3 lavados con 10ml de PBS conteniendo 0,5% de T X-100 frío para eliminar proteínas unidas inespecíficamente. A continuación la resina se resuspendió en buffer trombina (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2,5mM $CaCl_2$) y la mezcla se digirió durante 1 hora a temperatura ambiente con 20 unidades de trombina (Sigma), con agitación orbital. Finalmente se recolectaron 4 fracciones eluidas de la columna y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Las bandas de PAGE conteniendo las proteínas purificadas fueron cortadas de los geles, troceadas en partes iguales y guardadas a -80°C. Posteriormente cada trozo se pulverizó con nitrógeno líquido, se resuspendió en 700µl de PBS y cuantificó por el método de Bradford, dando una concentración aproximada de 0,4µg/µl. Finalmente, a cada suspensión se le agregó 233µl de alúmina como adyuvante. Se inmunizaron ratones hembras de la cepa BALB/C de 8-10 semanas de edad. Primero se realizaron 3 inmunizaciones (150µl por ratón, 2 ratones por vía subcutánea y 2 por vía intraperitoneal) cada 7 días. Posteriores inmunizaciones fueron hechas al día 28 y 46 post-inmunización (P.I.), sumando 5 inmunizaciones y siendo el día 1 P.I. el primer día de inmunización. Se realizaron extracciones de sangre al día 21, 35, 53 P.I. Luego de cada extracción de sangre y obtención de suero se realizaron western blots usando estos sueros para determinar la presencia de los anticuerpos contra FliA y FlgM. En la 2ª extracción, los sueros obtenidos de 2

ratones fueron positivos para el reconocimiento de FliA y los sueros obtenidos de 2 ratones fueron positivos para el reconocimiento de FlgM, estos dieron una mejor señal en la 3ª extracción y fueron sacrificados. Los otros 4 ratones fueron mantenidos vivos para posteriores obtenciones de sueros. Se los volvió a inmunizar al día 308, 315 y 331 P.I., se les extrajo suero en los días 322 y 337 P.I y fueron sacrificados. Solamente un suero dio positivo para el reconocimiento de FliA, los otros 3 sueros dieron un reconocimiento inespecífico. Los sueros que reconocieron de manera correcta las proteínas dianas fueron utilizados para los análisis de western blotting.

6.6.2.- Obtención de extractos proteicos

-Proteínas celulares

Se diluyó 1/100 un cultivo O/N en LB y se lo incubó 2 horas hasta llegar a DO_{600} de 0,4. Se centrifugó 10 minutos a 4°C y 1900g, se lavó el precipitado con 1 ml de PBS frío y volvió a centrifugar. Se resuspendió el precipitado en 0,5ml de PBS conteniendo 0,15mM PMSF y 5mM EDTA. Se sonicó con 6 a 10 pulsos de 5 segundos con intervalos de 1 minuto de incubación en hielo, hasta la completa ruptura de las células bacterianas. Se centrifugó 15 minutos a 4°C y 9500g y recuperó el sobrenadante.

-Proteínas de superficie (*Heat extract*)

A partir de un cultivo en fase estacionaria, se obtuvo un cultivo en fase exponencial diluyéndolo 1/50 en 10ml de LB e incubando a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600} aproximada de 0,4. Se centrifugó 15 minutos a 1600g y 4°C. Se separó el sobrenadante para recuperar las proteínas secretadas, se resuspendió el sedimento en 0,2ml de PBS e incubó 1 hora a 65°C en baño maría. Se centrifugó durante 15 minutos a 1000g y 15°C y recuperó el sobrenadante.

-Proteínas secretadas

Se filtraron 4 ml del sobrenadante obtenido del proceso de obtención de proteínas de superficie con un filtro de 0,2µm. Se lo incubó (¿este filtrado?) 15 minutos en hielo con 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Se fraccionó en tubos eppendorf y centrifugó 30 minutos a 4°C, 14000g. Posteriormente se eliminaron los sobrenadantes, lavaron los precipitados 3 veces, usando Acetona fría y centrifugando 5 minutos a 4°C y 14000g. Se secaron en termobloque a 65°C y resuspendieron con PBS.

Todos los extractos proteicos se cuantificaron usando el método de Bradford (Sigma).

6.6.3.- SDS-PAGE

Para fraccionar el contenido de las muestras por peso molecular, fueron corridas en geles de poliacrilamida en presencia de detergente para desnaturalizarlas. En caso de querer identificar FliC, la composición del gel de separación fue 0,5M Tris-HCl pH 8,8 (Sigma), 0,1% SDS (Sigma), 12% acrilamida (solución al 30% acrilamida/bis-acrilamida, Sigma), 0,1% persulfato de amonio (APS, Sigma) y 0,05% TEMED (Sigma). El gel concentrador fue de 4% acrilamida, con 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS y 0,05% TEMED. Se cargaron cantidades constantes de proteínas de cada muestra, las cuales fueron incubadas con el buffer de carga por 5 minutos a 100°C. Las corridas se realizaron a amperaje constante (20 mA/gel), en buffer de corrida (Tris-glicina). Para identificar FlgM y FliA se utilizaron geles de tricina debido a que se obtiene mejor resolución para proteínas de bajo peso molecular (Schägger, 2006). La composición del gel separador fue 1M Tris-HCl pH 8,45, 0,1% SDS, 16% acrilamida/bis-acrilamida (48/1,5), 0,05% APS y TEMED, del gel concentrador fue 1M Tris-HCl pH 8,45, 0,1% SDS, 4% acrilamida/bis-acrilamida (48/1,5), 0,08% APS y TEMED. Los buffers de corrida se diferenciaban entre sí. El Buffer Ánodo tenía una concentración de 0,1M Tris y 0,0225M HCl (pH 8,9) y el Buffer Cátodo 0,1M Tris, 0,1M Tricina y 0,1% SDS (pH 8,25). Las corridas se realizaron a un voltaje de 30 V hasta que las muestras entraban al gel separador y luego 200 V, hasta la mitad, y 300 V la segunda mitad.

Las proteínas separadas en los geles fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Sigma), en caso de querer identificar FliC, o de polifluoruro de vinilideno (Immobilon-P PVDF, Sigma), en caso de querer identificar FliA y FlgM. Esta transferencia fue realizada O/N a 4°C y 80mA en buffer conteniendo 25mM Tris, 190mM Glicina y 20% Metanol. Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul de Coomasie para verificar proteínas remanentes en el gel y las membranas con rojo Ponceau para verificar la correcta separación y transferencia.

6.6.4.- Western Blot

A las membranas se les realizó un bloqueo con TBS con 0,05% triton X-100 (TBST), 5% leche en polvo descremada, por 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se diluyeron los anticuerpos anti-Dnak (1/50000), anti-FliC (1/1000), suero anti-FliA (1/200) y suero anti-FlgM (1/50) en TBST/leche, y se las incubó a 37°C por 1 hora en agitación. Luego de lavarlas con TBST, fueron incubadas con anticuerpo anti-mouse IgG conjugado a peroxidasa, diluido 1/5000 en

TBST/leche por 1 hora a TA en agitación. Finalmente fueron revelados por quimioluminiscencia con el reactivo Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (General Electric) realizando exposiciones a diferentes intervalos de tiempo en un analizador de imágenes (Gbox Chemi XT, Syngene).

6.7.- Secuenciación y análisis de secuencias

Luego de concretar una colaboración con el Sanger Institute (Cambridge, UK), se obtuvieron las secuencias del genoma completo de los primeros 7 aislamientos en estudio (SDu1-SDu7). El ADN_g fue extraído por el kit de Qiagen DNAeasy blood and tissue kit y secuenciado por el método *Illumina*.

Se compararon las regiones flagelares (aproximadamente 60 kb) de todos los aislamientos entre sí y con la región flagelar de un aislamiento flagelado de referencia (*S. Dublin* CT_02021853) disponible en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para esto se utilizó la herramienta bioinformática libre Bioedit, disponible en internet.

6.7.1.- Screening de la delección *fliEΔ42* por PCR

Para verificar la presencia de la delección *fliEΔ42* en los aislamientos de *S. Dublin* para los cuales no se disponía de la secuencia genómica, a partir de las secuencias obtenidas se diseñaron cebadores que flanquean la delección para detectarla por PCR. Estos cebadores, *fliE1-F* y *fliE1-R* (tabla 5), fueron diseñados para que amplifique un producto pequeño, que abarque la delección y que sea fácilmente detectable por electroforesis en geles de agarosa. El tamaño del producto amplificado es de 77 pb, en el caso del gen *fliEΔ42*, o 119 pb, en el caso del gen completo. La concentración final de cada reactivo en la mezcla fue 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,4μM de cada primer. Las condiciones de ciclado fueron: una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 95°C seguida de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel agarosa 2,5% en TBE 0,5X.

6.7.2.- Análisis de secuencia nucleotídica de *fliE* en revertientes SDu3/pJA *mot+*

Se decidió analizar la secuencia nucleotídica de *fliE* en los revertientes SDu3/pJA*mot+6*, SDu3/pJA*mot+7*, SDu3/pJA*mot+8* y SDu3/pJA*mot+9* obtenidos. Para esto, se obtuvo el DNA genómico como se describió previamente. Para amplificar *fliE* por PCR, se usaron los cebadores

diseñados para el clonaje fliE2-F y fliE2-R y las condiciones descritas previamente. Luego los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit PCR Purification (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron secuenciadas en el Servicio de Secuenciación Automática del IPM, los cebadores utilizados fueron los diseñados para el screening de la delección fliE1-F y fliE1-R.

6.8.- Tinción fluorescente de flagelos

La tinción fluorescente de flagelos en bacterias vivas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Turner *et al* 2000, con las modificaciones indicadas en Yim *et al* 2014.

Brevemente, se diluyó 1/100 un cultivo O/N en 10 ml de caldo LB y se incubó hasta llegar a una $DO_{600} = 0,4 - 0,6$. Se centrifugó 10 minutos a 2000g, descartó el sobrenadante y resuspendió suavemente en buffer fosfato (0,01M KPO_4 , 0,067M NaCl, 0,1mM EDTA). Luego se lavó 2 veces, resuspendió el precipitado en 250 μ l de dicho buffer y repartió en tubos Eppendorf.

Se resuspendió 1mg del fluoróforo Alexa Fluor 594-carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen), un colorante fluorescente específico de grupos aminos, en 300 μ l de buffer fosfato y agregó 50 μ l de éste a la resuspensión de bacterias. Además se agregó 10 μ l de Bicarbonato de Sodio 1M. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave de 100rpm en oscuridad. Se lavó 3 veces con buffer fosfato conteniendo Brij al 0,0001% (Buffer/Brij) y se resuspendió el precipitado en 1 ml de buffer. Esta resuspensión fue diluida 1/25 en buffer/Brij y glucosa 0,1M. Se montaron 10 μ l en un portaobjetos, cubrió con cubreobjetos y se selló con esmalte. Finalmente se observó inmediatamente empleando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i, objetivo de inmersión 100x, software NIS Elements BR 3.0. Se analizaron al menos 10 campos para cada muestra.

6.9.- Ensayos en ratones (modelo de colitis). Recuento en órganos, histología, qRT-PCR

El modelo de infección in vivo utilizado en este trabajo es el descrito por Barthel *et al* 2003. Brevemente, grupos de 5 hembras de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas (DILAVE) fueron pretratadas por vía intragástrica con 25mg de estreptomycin 24 horas antes de la infección con 5×10^7 CFU de las diferentes cepas vía oral.

A las 24 horas post-infección los animales fueron sacrificados. Un trozo del ciego distal de cada animal, fue congelado en nitrógeno líquido embebido en *Tissue-Tek® Opmtimum Cutting*

Temperature (O.C.T.) y luego almacenado a -80°C . Se evaluó la citopatología en cortes realizados en criostato (5 a 8 μm de espesor) y teñidos con Hematoxilina-Eosina, se utilizó el método ciego de observación, el esquema de puntaje fue el descrito por Stecher *et al* 2004. Los parámetros evaluados fueron: destrucción del epitelio, edema de la submucosa, reducción del número de células de Goblet o caliciformes e infiltración de células polimorfonucleares. También se analizaron por qRT-PCR los niveles de ARNm para la quemoquina derivada del queratinocito (Kc), homóloga murina de la IL-8 en humanos, Interleuquina 17a (IL17a), Interferón gamma (IFN γ), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), Mip-3A (CCL20), Lipocalina 2 (Lcn2), Calprotectina (S100A9). Para ésto se extrajo una fracción de la porción media del ciego de cada ratón y almacenó a -80°C embebida en TRIzol (Invitrogen). Posteriormente, las muestras se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Ultraturrax, se extrajo el ARN siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificó utilizando el Nanodrop. Para obtener el cADN se trató 1 μg de ARN con DNAsa y se realizó la retrotranscripción de la misma forma que con el ARN bacteriano descrito previamente. Los cebadores (Tabla 5) fueron utilizados en una concentración final de 0,9 μM . Las condiciones de ciclado fueron: una etapa de desnaturalización de 15 minutos a 95°C seguida de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Se utilizó como gen normalizador la B-actina, el cual se verificó previamente que no variasen sus niveles entre las distintas muestras analizadas. Para calcular las variaciones en los niveles de ARNm para los genes problema, se aplicó el método del $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ya descrito.

Además, se analizó la carga bacteriana en contenido de ciego y bazo. Se colectó una parte de aproximadamente 0,15ml de contenido del ciego, se pesó y resuspendió en 0,5ml de PBS con tergitol. Luego se plaqueó en MacConckey con estreptomycin. Los bazos se homogeneizaron en PBS con Tergitol al 0,5% y se plaquearon diluciones en agar MacConckey con estreptomycin a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y en LBA sin antibiótico.

6.10.- Análisis estadísticos

Para realizar el análisis estadístico de todos los ensayos se utilizó el software Graphpad Prism. En los ensayos de qRT-PCR para genes flagelares se utilizó el método One Way ANOVA, tomando en cuenta a $P < 0.05$ como estadísticamente significativo. En los ensayos de qRT-PCR para genes proinflamatorios en ciego de ratones se utilizó el test Mann-Whitney.

7.- RESULTADOS

7.1.- Evaluación de la capacidad inflamatoria de aislamientos salvajes *in vivo*

A diferencia de lo que sucede en humanos, al infectar ratones susceptibles con SNT desarrollan una enfermedad similar a la fiebre tifoidea humana. Es por ésto que se ha comenzado a utilizar un modelo de ratón pre-tratado con estreptomycin, en el cual ratones C57/Bl6 se tratan con estreptomycin previamente a la infección con *Salmonella* spp. De esta manera, una vez alterada la flora intestinal normal mediante el tratamiento con el antibiótico, la infección con *Salmonella* spp por la ruta oral induce muchos de los síntomas de una enterocolitis observada en humanos, incluidos edema, daño epitelial y un influjo importante de neutrófilos en el ciego (Barthel *et al.*, 2003).

Para evaluar si la generación de una respuesta inflamatoria *in vivo* depende de la presencia de flagelo, analizamos la expresión de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias y de proteínas antimicrobianas en el ciego de ratones pretratados con estreptomycin infectados con un aislamiento S. Dublin flagelado (SDu5), uno no-flagelado (SDu3) y el mutante isogénico de SDu5 con el gen *fliC* inactivado por un cassette de kanamicina, todos resistentes a estreptomycin, y los comparamos con los resultados obtenidos en ratones no infectados. Además realizamos un análisis histopatológico de los ciegos de dichos ratones, debido a que se ha reportado que los cambios patológicos inflamatorios son observados mayoritariamente en este órgano (Barthel *et al.*, 2003).

7.1.1.- Análisis de la respuesta transcripcional de citoquinas y proteínas antimicrobianas

Mediante qRT-PCR se analizó la expresión de genes proinflamatorios y péptidos antimicrobianos en ciego de ratones pretratados con estreptomycin, infectados con los aislamientos SDu3 (aflagelado), SDu5 (flagelado) y el mutante SDu5 con el gen *fliC* inactivado.

Mediante recuento bacteriano, verificamos que todas las cepas analizadas colonizaron eficientemente el ciego dentro de las 24 horas p.i. (SDu3 $1,97 \times 10^9 \pm 5,14 \times 10^8$ CFU/g de contenido de ciego, SDu5 $1,32 \times 10^9 \pm 3,24 \times 10^8$ CFU/g de contenido de ciego y SDu5 *fliC::kan^R* $1,09 \times 10^9 \pm 2,86 \times 10^8$ CFU/g de contenido de ciego).

Los ratones infectados con el aislamiento flagelado SDu5, mostraron un incremento estadísticamente significativo en los niveles de ARNm para IL-17a (70 veces), Kc (56 veces), TNF-

α (27 veces) e IFN- γ (470 veces), con respecto a los animales no infectados. La infección con el aislamiento aflagelado SDu3 también demostró una inducción significativa de la expresión de IL-17 (2 veces), Kc (4 veces), TNF- α (3,6 veces) e IFN- γ (15 veces) con respecto a los ratones no infectados, pero estas inducciones fueron significativamente menores que las generadas por el aislamiento SDu5. En el caso del mutante aflagelado SDu5 *fliC::kan^R*, indujo una expresión significativamente menor de IL-17, Kc e IFN- γ comparado con la cepa parental, siendo la respuesta generada similar a la observada para el caso de la cepa SDu3 (no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de ARNm para IFN- γ y Kc) (Figura 6A).

Los niveles de transcritos para Lcn2 fueron significativamente superiores en ciegos de ratones infectados con el aislamiento flagelado SDu5 (29 veces) comparado con ratones no infectados, mientras que aquellos animales infectados con los aislamientos aflagelados no mostraron aumento significativo (Figura 6B). Respecto a S100A9, su expresión fue significativamente inducida en los 3 grupos de ratones infectados comparada a la expresión en ratones no infectados, a su vez, la inducción fue significativamente menor con SDu3 (22 veces) que con SDu5 (1441 veces). En el caso del grupo infectado con el mutante SDu5 *fliC::kan^R*, no presentó diferencias respecto al grupo de infectados con SDu3.

A diferencia de lo observado en ensayos en cultivo celular (Figura 4B), en estos ensayos *in vivo* la expresión de Mip-3a (CCL20) no fue significativamente inducida (Figura 6A).

Estos resultados indican que, a pesar de la ausencia de flagelo, el aislamiento SDu3 y el mutante SDu5 con el flagelo inactivado, fueron capaces de generar una respuesta inmune innata sugiriendo que existen otros factores bacterianos implicados en el desencadenamiento de respuesta proinflamatoria por parte del hospedero. Sin embargo, los incrementos en los niveles de ARNm en ciegos de las 4 citoquinas y las 2 proteínas antimicrobianas fueron significativamente menores que aquellos generados por la infección de SDu5, indicando que el flagelo es el principal factor proinflamatorio de *S. Dublin* a nivel intestinal.

Es importante destacar que las bacterias SDu3 recuperadas del contenido de ciegos y de los bazos de ratones infectados permanecieron carentes de movilidad (resultados no mostrados), indicando que el fenotipo aflagelado no revierte luego del pasaje por los tejidos del hospedero.

Por otro lado, si bien se observaron respuestas inflamatorias diferentes entre SDu3 y SDu5 a nivel intestinal, la capacidad de invadir y colonizar órganos internos por parte de ambos aislamientos,

no mostró diferencias significativas (SDu5 $2,00 \times 10^5 \pm 6,94 \times 10^4$ CFU/bazo; SDu3 $7,93 \times 10^4 \pm 3,06 \times 10^4$ CFU/bazo, a día 3 p.i.). Este fenómeno ya fue descrito por Stecher *et al* 2004, quienes demostraron que un mutante *fliC* de *S. Typhimurium* generaba respuestas proinflamatorias intestinales menores que la cepa salvaje a tiempos tempranos p.i., pero sin embargo los números de bacterias recuperadas de órganos internos fueron similares.

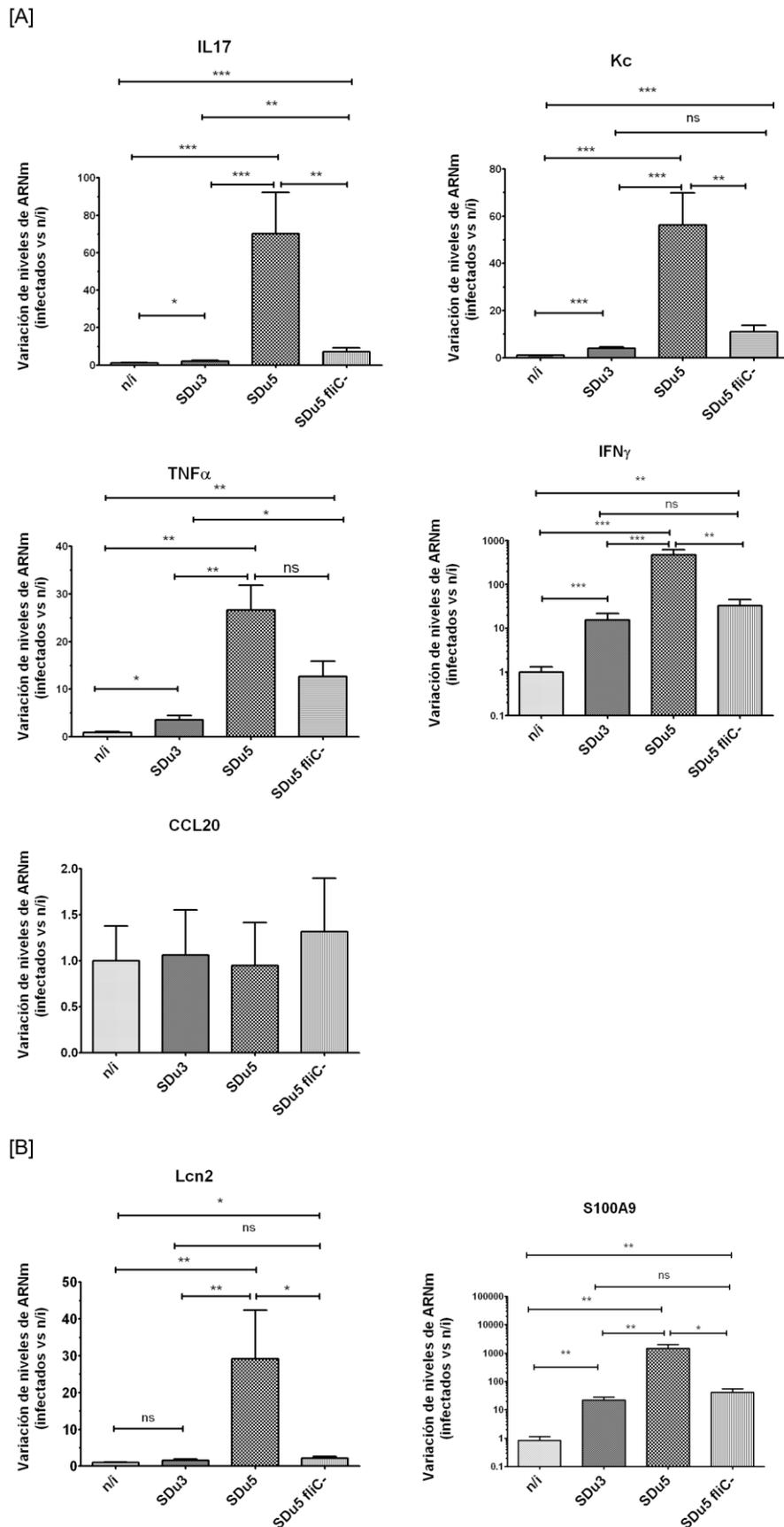
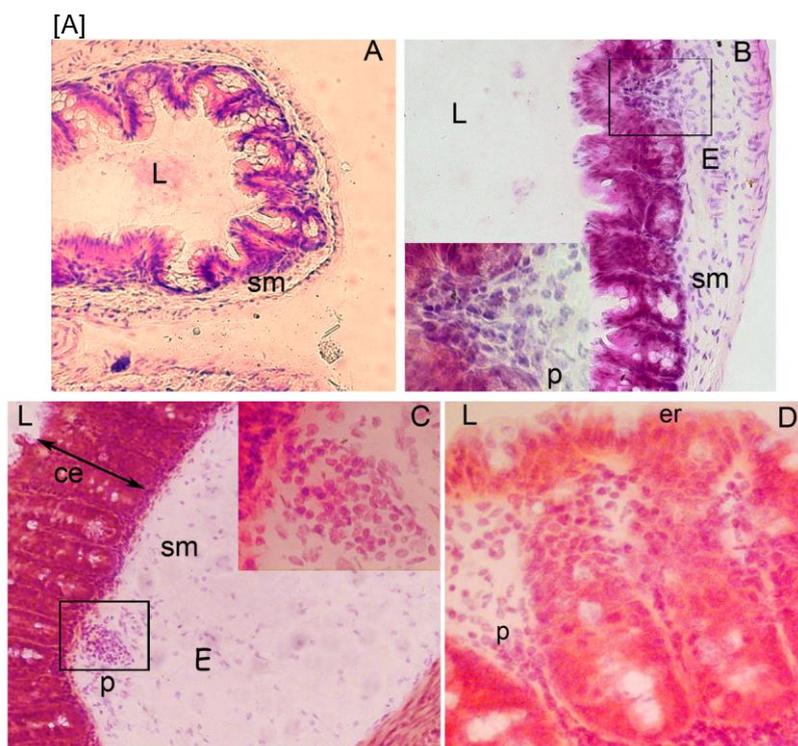


Figura 6. Variación de los niveles de ARNm a las 24 hs p.i. en la mucosa de ciego de ratones infectados con *S. Dublin*, determinados por qRT-PCR. Los valores se expresan en cambio de niveles de ARNm de los genes indicados, comparados con los niveles en ratones no infectados. IFN- γ y S100A9 están expresados en escala logarítmica. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, estadísticamente no significativo. (Test Mann-Whitney) (A) Cuantificación de ARNm de genes que codifican para citoquinas y quemoquinas proinflamatorias. (B) Cuantificación de ARNm de genes que codifican para proteínas antimicrobianas.

7.1.2.- Análisis histopatológico de ciegos

Para analizar las alteraciones histopatológicas asociadas a inflamación en los ciegos de los ratones infectados, observamos en microscopio cortes en criostato teñidos con Hematoxilina-Eosina. Los parámetros evaluados fueron: destrucción del epitelio, edema de la submucosa, reducción del número de células de Goblet o caliciformes e infiltración de células polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos, procesos ya descritos como desencadenados a consecuencia de la infección por *Salmonella Typhimurium* flagelada en ciegos de ratones pretratados con estreptomicina (Stecher *et al.*, 2004).

En los ciegos de los ratones infectados con SDu5 se observaron a las 24hs p.i. signos patológicos indicativos de una inflamación aguda, incluyendo una mayor extensión de edema en la submucosa, así como mayor infiltración de células PMN y erosión del epitelio, comparado con lo observado en ciegos de ratones infectados con SDu3, los cuales mostraron signos de inflamación más leves (Figura 7A). El score de los daños patológicos indicó que sólo los ratones infectados con la cepa SDu5 mostraron cambios significativamente diferentes respecto a los ratones control (Figura 7B). A su vez, los ciegos de ratones infectados con el mutante SDu5 *fliC::kan^R* no revelaron cambios patológicos significativos comparados a los ciegos de ratones infectados con SDu3 y no infectados (Figura 7B).



[B]

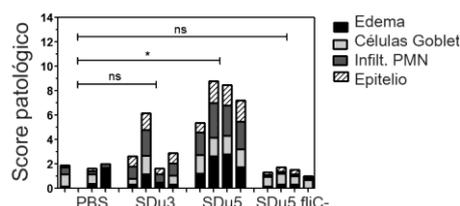


Figura 7. Análisis histopatológico de ciego, criosecciones de tejido de ratones pretratados con estreptomicina infectados con *S. Dublin* a 24hs p.i. [A] Histología representativa del ciego de un ratón no infectado (A), ratón infectado con SDu3 (B) y ratón infectado con SDu5 (C y D). (L) lumen intestinal, (sm) submucosa, (E) edema, (p) células PMN (ce) elongaciones de criptas, (er) erosión del epitelio. Se observa una mayor extensión de edema en la submucosa, así como infiltración de células PMN y erosión del epitelio en el ciego de los ratones infectados con SDu5, comparado con los observados en ratones infectados con SDu3 y no infectados. (A, B y C) Aumento x200. (D y partes amplificadas en B y C) Aumento x400. [B] Score de cambios histológicos en ciegos. Se estudiaron el edema de la submucosa, reducción en el número de células Goblet, infiltración de células PMN y descamación y erosión del epitelio. Cada barra corresponde a un animal. PBS corresponde a los ratones no infectados. Se muestran los resultados de los análisis estadísticos de los scores para cada grupo de ratones comparados con el grupo no infectado (Test Mann-Whitney). * $P < 0,05$, ns, estadísticamente no significativa.

Estos resultados muestran que la presencia de flagelo es la principal propiedad que influye en las diferencias en la habilidad de los aislamientos de *S. Dublin* de inducir respuesta inmune en mucosa. Sin embargo, el mutante SDu5 *fliC::kan^R* y SDu3 demostraron niveles significativamente diferentes de expresión de IL-17 y TNF- α , sugiriendo que otros factores podrían también contribuir a las propiedades proinflamatorias de *S. Dublin*.

7.2.- Expresión de genes flagelares

Para determinar si la ausencia de flagelo se debe a una falta de expresión de *fliC*, comparamos su expresión entre aislamientos flagelados y aflagelados, mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando cebadores específicos contra dicho gen (Figura 8). Observamos que la expresión de *fliC* (gen de clase 3) en los aislamientos aflagelados es 100 veces menor que en los flagelados, lo que se correlaciona con la ausencia de flagelina. Para comparar la expresión de los genes reguladores entre aislamientos flagelados y aflagelados, analizamos la expresión de los genes *fliA* (Clase 2-3) y *flgM* (Clase 2-3) (Figura 8), y para determinar si la disminución en la expresión de *fliC*, es general para los genes de clase 3 analizamos la expresión de otros genes estructurales: *motB* (clase 3) y *fliN* (clase 2) (Figura 9).

Los resultados muestran que los niveles de ARNm para *motB* y *flgM* están significativamente disminuidos 10 y 5 veces, respectivamente, en las cepas aflageladas respecto a las flageladas, mientras que los niveles de ARNm para *fliA* y *fliN* no se ven afectados. Esto sugiere que sólo la expresión de genes de clase 3 está afectada. Dado que *flgM* es un gen de clase 2 y 3, su expresión permanecería activada por el regulador central *flhDC*, haciendo que haya niveles de

FlgM suficientes para inhibir FliA. Las causas, entonces podrían ser una menor estabilidad del ARNm de *fliA*, nivel insuficiente de FliA debido a una menor traducción o estabilidad de la proteína, alguna alteración en la interacción entre FliA y FlgM o en la activación de la expresión de los genes de clase 3 por parte de FliA.

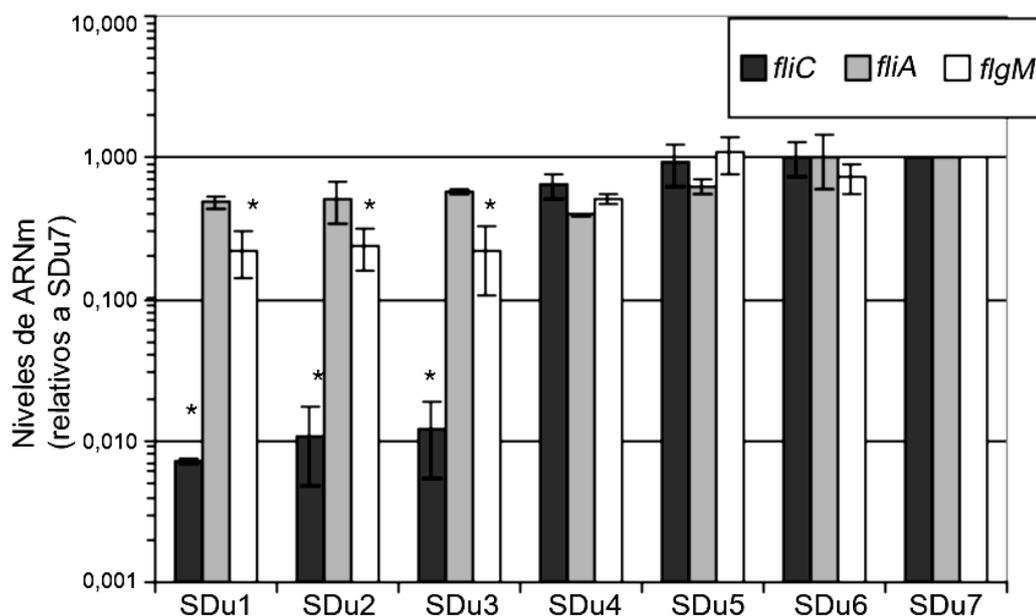


Figura 8. qRT-PCR para genes flagelares *fliC*, *fliA* y *flgM*. * diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a SDu7 (One Way ANOVA). Resultados (medias y desviaciones estándar) de 2 experimentos independientes.

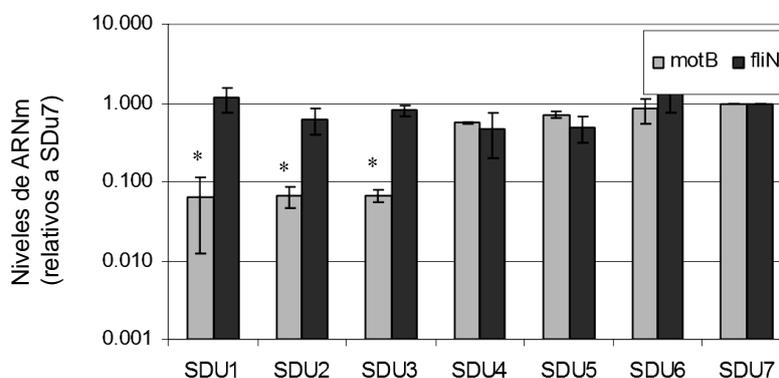


Figura 9. qRT-PCR para genes flagelares *motB* y *fliN*. * diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a SDu7 (One Way ANOVA). Resultados (medias y desviaciones estándar) de 2 experimentos independientes.

7.3.- Análisis de niveles y localización celulares de FliA y FlgM

Luego de observar que la expresión de *fliA* es similar entre aislamientos flagelados y aflagelados, y en el caso de *flgM*, a pesar de haber una diferencia significativa, los niveles son muy parecidos, estudiamos la localización y niveles de las proteínas FliA y FlgM. Como ya lo vimos, FlgM es secretada, liberando FliA para que active la transcripción de los genes de clase 3. En este sentido, analizamos la presencia de estas proteínas en extractos de proteínas secretadas y celulares

mediante western blotting. Para ésto produjimos los anticuerpos en el laboratorio, ya que no se conseguían comercialmente.

7.3.1.- Producción y purificación de FliA y FlgM recombinantes

Se clonaron los genes *flgM* y *fliA* de un aislamiento móvil (SDu5) en el plásmido pGEX4T-1. Posteriormente fueron transformados por *heat-shock* en la cepa *E. coli* MC1061. Las cepas resultantes fueron cultivadas en presencia de inductor para expresar las proteínas recombinantes. En los extractos inducidos se puede observar claramente la presencia de las proteínas de fusión GST-FliA y GST-FlgM del tamaño esperado (55kDa y 37 kDa, respectivamente). FliA se observa en mayor cantidad en la fracción insoluble y FlgM en la fracción soluble (Figura 10). Si bien FliA se observa mayoritariamente en la fracción insoluble, la cantidad que queda en forma soluble fue suficiente para purificar la proteína y administrarla a los ratones.

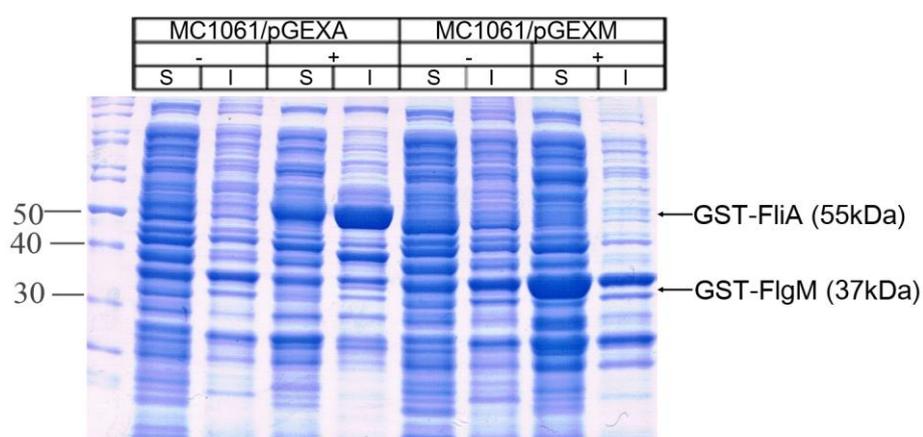


Figura 10. SDS-PAGE de extractos proteicos solubles (S) e insolubles (I) de cepas MC1061/pGEXA y MC1061/pGEXM crecidos en presencia de inductor (+) y ausencia de inductor (-). Se observa la producción de las proteínas FliA y FlgM fusionadas a GST. Tinción Azul de coomasie. Se muestra a la izquierda el marcador de peso molecular en kDa.

Para purificar las proteínas, se incubó el extracto proteico soluble de las cepas MC1061/pGEXA y MC1061/pGEXM, con una resina de Glutación agarosa. A continuación, la resina se digirió con trombina. Finalmente se recolectaron 4 fracciones eluidas de la columna y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figuras 11 y 12). Si bien la pureza no fue la deseada, se prosiguió con la purificación. Las fracciones eluidas fueron separadas por electroforesis en un gel preparativo y se recortó la banda del gel conteniendo la proteína de interés.

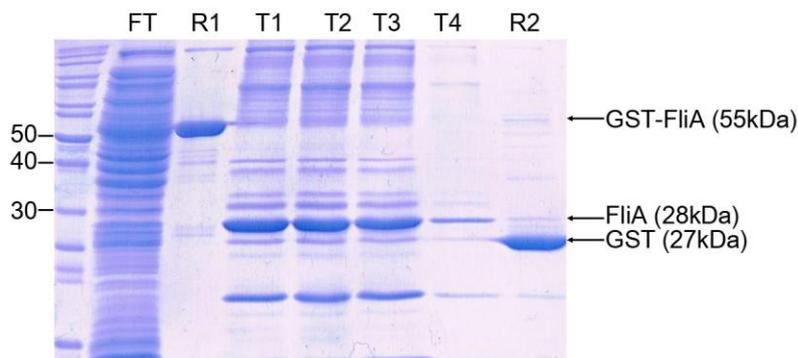


Figura 11. SDS-PAGE de fracciones del proceso de purificación de FliA a partir de extractos proteicos de cultivo de la cepa MC1061/pGEXA. FT: Flow Through o fracción no unida a la resina, R1: fracción unida a la resina, T1-T4: Fracciones eluidas luego del tratamiento con trombina, R2: Resina obtenida luego del tratamiento con Trombina. Se muestra a la izquierda el marcador de peso molecular en kDa.

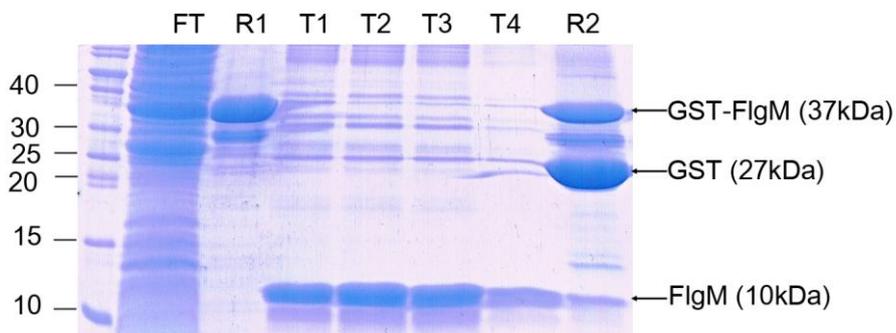


Figura 12. SDS-PAGE de fracciones del proceso de purificación de FlgM a partir de extractos proteicos de cultivo de la cepa MC1061/pGEXM. FT: Flow Through o fracción no unida a la resina, R1: fracción unida a la resina, T1-T4: Fracciones eluidas luego del tratamiento con trombina, R2: Resina obtenida luego del tratamiento con Trombina. Se muestra a la izquierda el marcador de peso molecular en kDa.

7.3.2.- Producción de anticuerpos anti-FliA y anti-FlgM

Las proteínas FliA y FlgM purificadas fueron inoculadas en ratones BALB/C. Se realizaron cuatro extracciones periódicas de sangre y se determinó por western blotting la presencia de anticuerpos anti-FliA y anti-FlgM en el suero obtenido de los ratones 2, 3, 7 y 8, respectivamente (Figura 13).

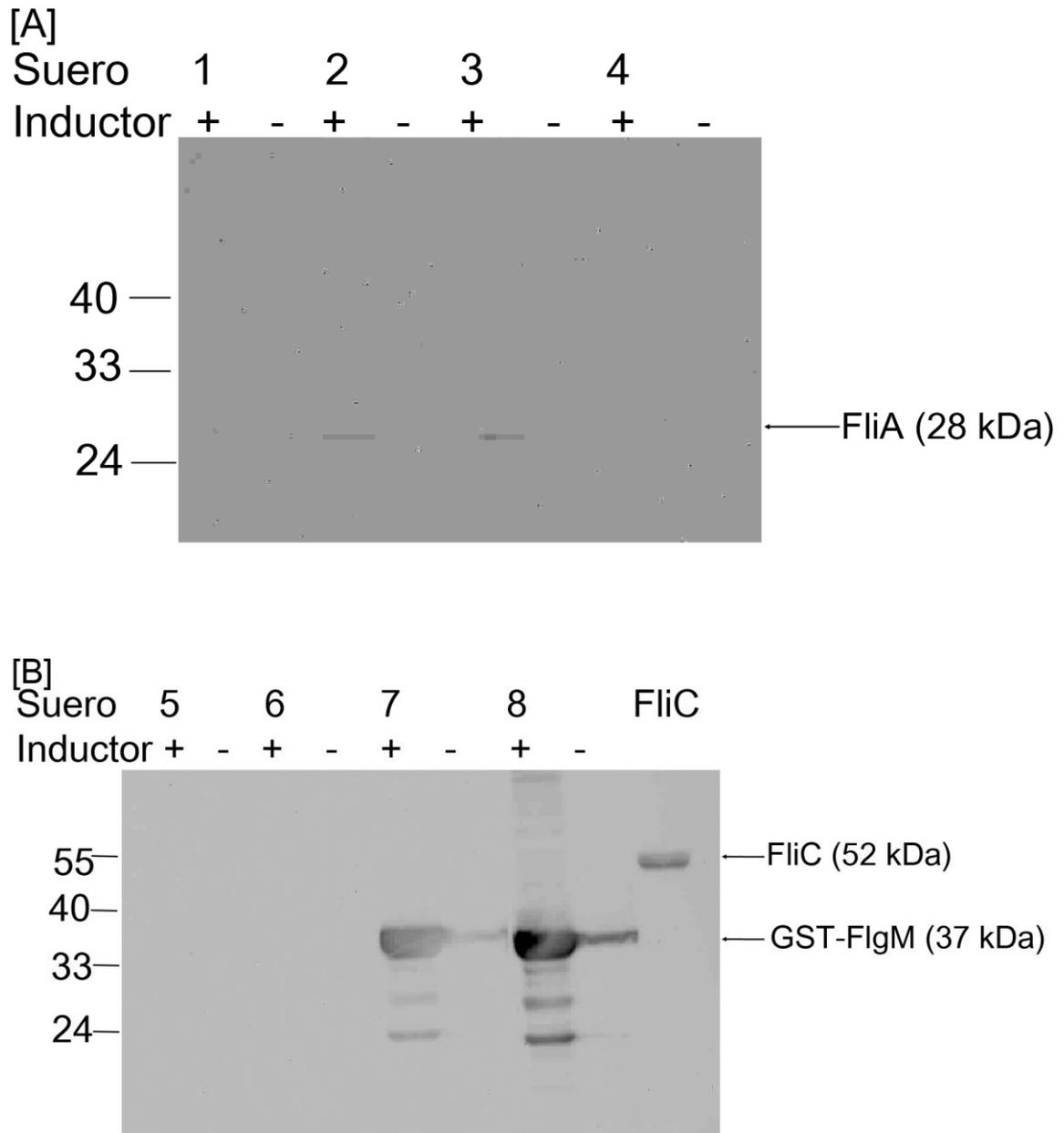


Figura 13. Western Blot usando sueros de ratones inmunizados con FliA (A, 1 - 4) y FlgM (B, 5 - 8). Se utilizaron extractos proteicos de cepas que expresan la proteína bajo control de un promotor inducible SDu3/pBA y MC1061 portadora de pGEX4T-1/*flgM*. Se muestra a la izquierda el marcador de peso molecular en kDa.

7.3.3.- Estudio de la localización y niveles celulares de FliA y FlgM

Determinamos mediante Western blotting, los niveles de FliA y FlgM en extractos de proteínas secretadas y proteínas celulares (Figura 14), usamos los sueros obtenidos de ratones con anticuerpos anti-FliA (Ratón 2) y anti-FlgM (Ratón 8). Como control de carga, se utilizó anticuerpo anti-Dnak.

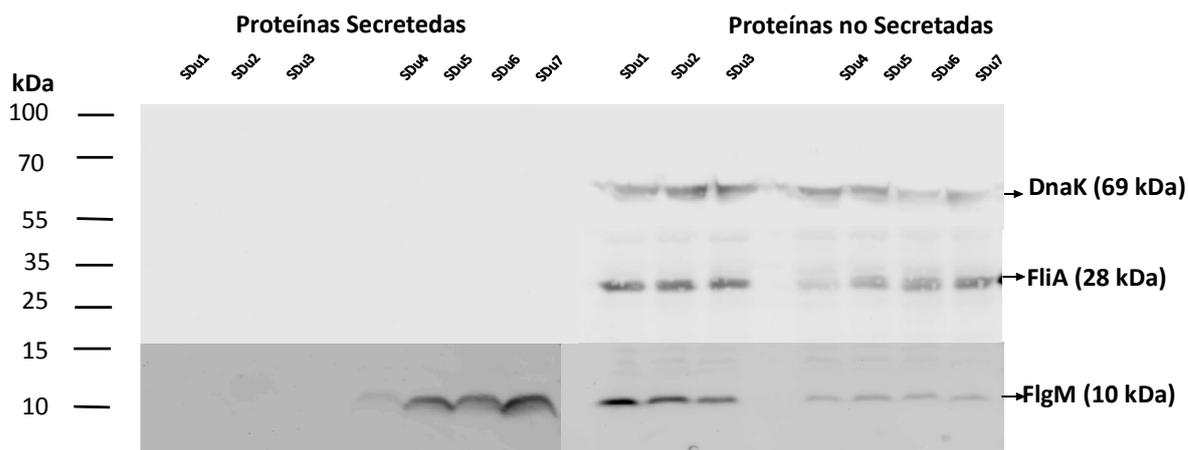


Figura 14. Western Blotting de proteínas secretadas y celulares de cultivos de aislamientos *S. Dublin* usando antisueros anti-FlgM, anti-FliA obtenidos y como control de carga anti-DnaK. Se observa ausencia de FlgM en proteínas secretadas de aislamientos aflagelados. Se muestra a la izquierda el marcador de peso molecular en kDa.

Los resultados muestran que FlgM no se detecta entre las proteínas secretadas en los aislamientos aflagelados y, en las proteínas que permanecen en las células, se encuentra en mayor cantidad en los aislamientos aflagelados respecto a los aislamientos flagelados. Al no ser secretada, FlgM permanecería en el citosol unida a FliA e inhibiéndola, impidiendo que se active la expresión de genes de clase 3.

7.4.- Reversión del fenotipo aflagelado

7.4.1.- Pasajes sucesivos de cepa aflagelada en agar de movilidad

Para comprobar si las cepas aflageladas son capaces de expresar flagelo y revertir este fenotipo por si solas, realizamos pasajes sucesivos en agar blando (LB Agar 0.3%), el cual induce la movilidad bacteriana. Luego de repicar sucesivamente la cepa SDu3 salvaje (invasiva, aflagelada) 12 veces cada 24h, en dos experimentos independientes, no se observó reversión del fenotipo aflagelado (Figura 15). Esto indica que la cepa aflagelada no es capaz de revertir este fenotipo *per se in vitro*.

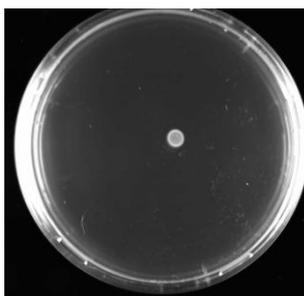


Figura 15. Ensayo de movilidad de SDu3, 12° pasaje.

7.4.2.- Complementación en trans de cepas aflageladas con el gen *fliA* de cepa flagelada, análisis de la expresión de genes de clase 3, síntesis de FliC y movilidad

Para averiguar si sobre-expresando *fliA* en un aislamiento aflagelado y, por lo tanto, consiguiendo niveles elevados de FliA, se consigue activar la expresión de los genes de clase 3 y luego el ensamblaje del flagelo, complementamos en trans una cepa aflagelada de origen sistémico (SDu3) con el gen *fliA* proveniente de un aislamiento flagelado (SDu5). Luego estudiamos la expresión de *fliC* y *motB* por qRT/PCR y la síntesis de FliC por western blotting.

Para esto se clonó el gen *fliA* de la cepa SDu5 en vectores de expresión (plásmidos pBAD22 y pJF119EH) y transformó en la cepa SDu3, obteniendo las cepas SDu3/pBA (transformada con pBA) y SDu3/pJA (transformada con pJA). Además se transformaron los plásmidos portando el gen en la cepa SDu5, obteniendo la cepa SDu5/pJA, para ser usada como control.

En primer lugar estudiamos los niveles de expresión de genes *fliC* y *motB* en las cepas SDu3/pBA y SDu3/pJA por PCR cuantitativa en tiempo real. Observamos que al inducir la expresión de *fliA*, estas cepas presentan niveles de ARNm para dichos genes, mayores a los niveles de la cepa inmóvil SDu3, incluso mayores a los de la cepa móvil salvaje SDu7. Los niveles de ARNm para *fliC* y *motB* en SDu3/pBA crecida en presencia del inductor fueron de 6 y 10 veces más que en SDu7, respectivamente. En el caso de los niveles en SDu3/pJA en presencia de inductor, los niveles fueron de 1,7 y 1,5 veces más que en SDu7, respectivamente (Figura 16). Luego de observar que las cepas SDu3/pBA y SDu3/pJA expresan *fliC* y *motB*, se comprobó mediante western blotting que, al inducir la expresión del gen *fliA*, son capaces de sintetizar FliC (Figura 17).

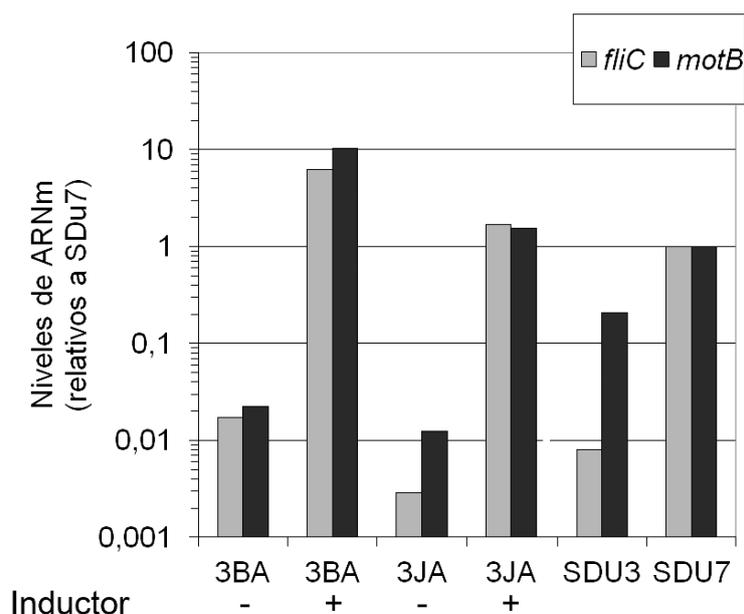


Figura 16. qRT-PCR para *fliC* y *motB* de cepas SDu3 complementadas con el gen *fliA*, respecto a SDu7. Se observa que en presencia de inductor se expresan en cantidad superior a cepa flagelada. Resultados de 1 experimento.

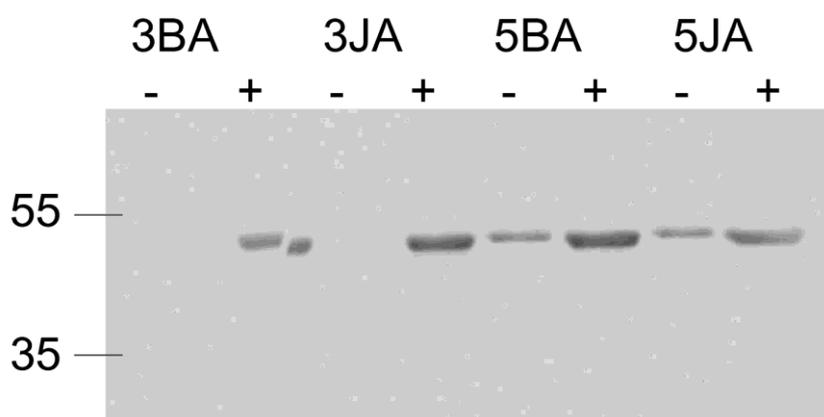


Figura 17. Western blotting para FliC, en extractos de proteínas celulares de cepas SDu3 suplementadas en trans con el gen *fliA*, crecidas en ausencia (-) o presencia (+) de inductor.

Para determinar si estas cepas ensamblan el flagelo y recuperan la movilidad realizamos ensayos de movilidad en agar blando con inductor, arabinosa o IPTG según corresponda. Ninguna de las cepas revirtió el fenotipo inmóvil. Estos resultados no descartan que estas cepas complementadas sean capaces de ensamblar el flagelo, ya que podrían estar ensamblando un flagelo no-funcional. Para probar esta hipótesis realizamos una tinción con anticuerpos fluorescentes de la cepa SDu3/pJA inducida con IPTG y como control las cepas SDu3 y SDu5 (Figura 18). No observamos flagelo ensamblado en la cepa SDu3/pJA (Figura 18A). Este nuevo resultado confirma que las

cepas complementadas, a pesar de sintetizar FliC, no son capaces de ensamblar flagelos.

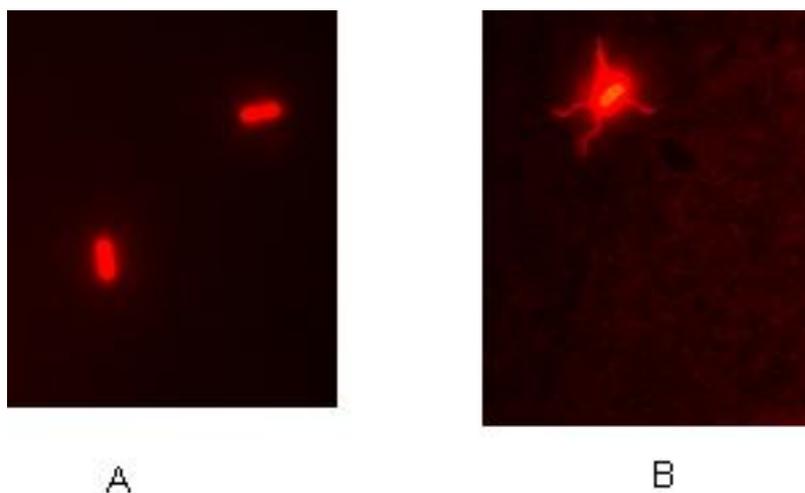


Figura 18. Tinción fluorescente de flagelos de las cepas SDu3/pJA en presencia de IPTG (A) y SDu5 (B)

7.4.3.- Pasajes sucesivos de cepas SDu3/pBA y SDu3/pJA

Para determinar si las cepas SDu3/pBA y SDu3/pJA, capaces de sintetizar FliC, consiguen ensamblar el flagelo al ser forzadas a sintetizar de forma abundante dicha proteína y luego de varias generaciones, realizamos pasajes sucesivos en agar blando conteniendo ampicilina y un gradiente de concentración de arabinosa e IPTG, respectivamente.

Los primeros dos experimentos fueron hechos en placas de agar blando con gradiente de concentración de arabinosa (0 a 0,02%) e IPTG (0 a 0,05mM). Se sembraron 5 spots de cultivos en fase estacionaria de las cepas SDu3/pBA y SDu3/pJA, de forma que la distancia entre un spot y otro sea similar (enumerados del 1 al 5, ubicados a concentraciones crecientes de inductor). Cada 24 horas repicamos los spots a una nueva placa sembrándolos en la misma posición para que tengan una concentración de inductor similar en cada pasaje.

La cepa SDu3/pBA luego de 10 pasajes, en ninguno de los experimentos consiguió revertir su fenotipo aflagelado (Figura 19).

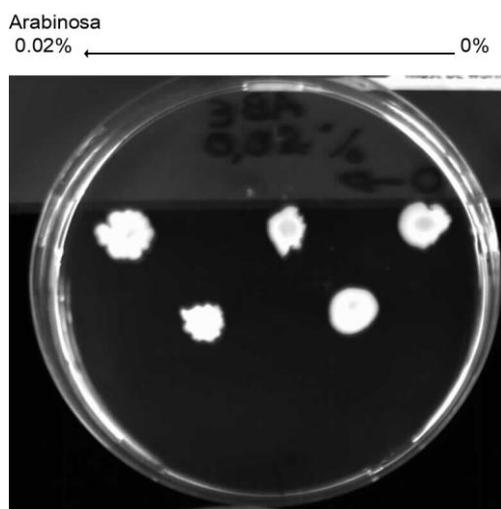


Figura 19. Ensayo de movilidad de cepa SDu3/pBA en agar con gradiente de concentración de Arabinosa, de derecha a izquierda, gradiente desde 0 hasta 0,02% de Arabinosa, spots 1 al 5. 10^o Pasaje.

En el caso de la cepa SDu3/pJA, en el primer experimento, al cabo del octavo pasaje, el spot N°2 presentó un halo de movilidad. Se aisló e identificó como SDu3/pJAmot+8. En el segundo experimento, en el sexto pasaje de la cepa SDu3/pJA, el spot N°3 presentó un halo de movilidad. Se la aisló e identificó como SDu3/pJAmot+6 (Figura 20). Se repicaron los demás spots (1, 2, 4 y 5) y en el siguiente pasaje, o sea en el séptimo, el spot N°1 presentó movilidad, se aisló e identificó como SDu3/pJAmot+7.

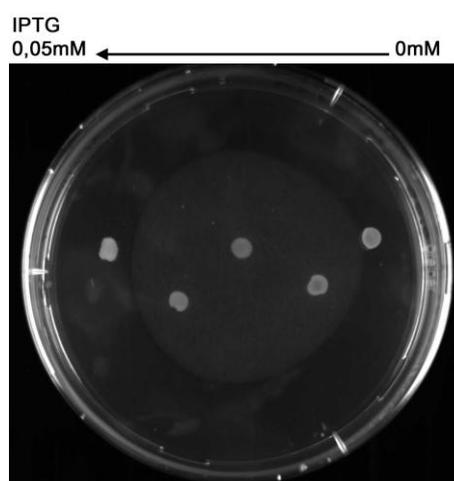


Figura 20. Ensayo de movilidad de cepa SDu3/pJA en agar semisólido con gradiente de IPTG, de derecha a izquierda, gradiente desde 0mM hasta 0,05mM IPTG, spots 1 al 5. 6^o Pasaje. Se observa un halo de movilidad alrededor del spot N°3

Para el tercer experimento se volvió a transformar el plásmido pJF119EH portando el gen *fliA* en SDu3. Los pasajes sucesivos se realizaron en agar blando con IPTG (0,025mM) y sin IPTG. En el

séptimo pasaje, el spot sembrado en la placa con IPTG presentó un halo de movilidad. Esta cepa revertiente fue aislada e identificada como SDu3/pJAmot+9. A estas cepas revertientes se les realizó una tinción con anticuerpo fluorescente y se observó la formación de flagelo en ellas (Figura 21), notándose un fenotipo de hiperflagelación.

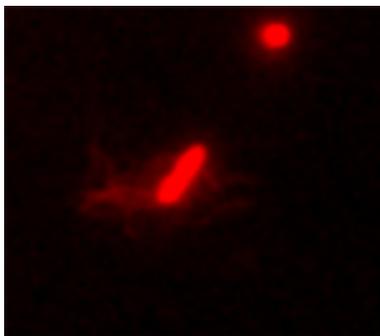


Figura 21. Tinción fluorescente de flagelos de la cepa revertiente SDu3/pJAmot+9

7.5.- Análisis comparativo de las secuencias completas de los operones flagelares

Se concretó una colaboración con el Sanger Institute (Cambridge, UK) y se obtuvieron las secuencias del genoma completo de los primeros 7 aislamientos en estudio (SDu1-SDu7). Comparamos las regiones flagelares y encontramos una delección en el gen *fliE*. Al complementar en trans una cepa aflagelada, con el gen *fliE* entero (de una cepa flagelada), recupera la movilidad.

7.5.1.- Comparación de la secuencia nucleotídica de la región de genes flagelares

Comparamos las regiones flagelares (aproximadamente 60 kb) de los aislamientos flagelados y aflagelados con la región flagelar de un aislamiento flagelado disponible en la base de datos del NCBI (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin str. CT_02021853, numero de ref NC_011205.1). Utilizamos la herramienta bioinformática libre Bioedit, disponible en internet.

Observamos una sola diferencia entre las secuencias de las regiones flagelares de aislamientos flagelados y aflagelados. En el gen *fliE* de los aislamientos aflagelados SDu1 a SDu3, detectamos una delección de 42 nucleótidos (correspondientes a 14 residuos aminoacídicos, del residuo 18 al 31) denominado en adelante *fliEΔ42* (Figura 22). Este gen, que en los aislamientos flagelados tiene un tamaño de 315 pb (en adelante denominado *fliE+*), codifica para una proteína de 104 aa que forma parte del cuerpo basal del flagelo, integrando el sistema de secreción tipo III flagelar. Interesantemente, se ha reportado que FliE actuaría como un adaptador entre el anillo MS y el

cilindro del cuerpo basal, y en mutantes *fliE* se ve afectada la secreción de otros sustratos flagelares (Minamino *et al.*, 1999). Al ser una delección de 42 nucleótidos, no se altera el marco de lectura, pudiéndose eventualmente sintetizar una proteína 14 aminoácidos más corta que la salvaje.

[A]

```

fliE_SDu_CT      ATGGCAGCAATACAGGGGATTGAAGGGGTTATTAGCCAGTTACAGGCGACGGCGATGGCC 60
fliE_SDu5       ATGGCAGCAATACAGGGGATTGAAGGGGTTATTAGCCAGTTACAGGCGACGGCGATGGCC 60
fliE_SDu1       ATGGCAGCAATACAGGGGATTGAAGGGGTTATTAGCCAGTTACAGGCGACGG----- 52
*****

fliE_SDu_CT      GCGCGCGGGCAAGACACGCACTCGCAGTCGACGGTGAGTTTTGCCGGCCAGCTACATGCT 120
fliE_SDu5       GCGCGCGGGCAAGACACGCACTCGCAGTCGACGGTGAGTTTTGCCGGCCAGCTACATGCT 120
fliE_SDu1       -----TGAGTTTTGCCGGCCAGCTACATGCT 78
*****

fliE_SDu_CT      GCGCTGGATCGTATTAGCGACAGACAGACGGCGGCGCGCTTCAGGCGGAAAAATTCACT 180
fliE_SDu5       GCGCTGGATCGTATTAGCGACAGACAGACGGCGGCGCGCTTCAGGCGGAAAAATTCACT 180
fliE_SDu1       GCGCTGGATCGTATTAGCGACAGACAGACGGCGGCGCGCTTCAGGCGGAAAAATTCACT 138
*****

fliE_SDu_CT      CTGGGTGAGCCGGGCATTGCGCTTAATGACGTGATGGCCGATATGCAAAAAGCGTCCGTC 240
fliE_SDu5       CTGGGTGAGCCGGGCATTGCGCTTAATGACGTGATGGCCGATATGCAAAAAGCGTCCGTC 240
fliE_SDu1       CTGGGTGAGCCGGGCATTGCGCTTAATGACGTGATGGCCGATATGCAAAAAGCGTCCGTC 198
*****

fliE_SDu_CT      TCCATGCAAATGGGGATTTCAGGTGCGCAACAAGCTGGTCGCCGCTATCAGGAAGTGATG 300
fliE_SDu5       TCCATGCAAATGGGGATTTCAGGTGCGCAACAAGCTGGTCGCCGCTATCAGGAAGTGATG 300
fliE_SDu1       TCCATGCAAATGGGGATTTCAGGTGCGCAACAAGCTGGTCGCCGCTATCAGGAAGTGATG 258
*****

fliE_SDu_CT      TCTATGCAGGTTTAA 315
fliE_SDu5       TCTATGCAGGTTTAA 315
fliE_SDu1       TCTATGCAGGTTTAA 273
*****

```

[B]

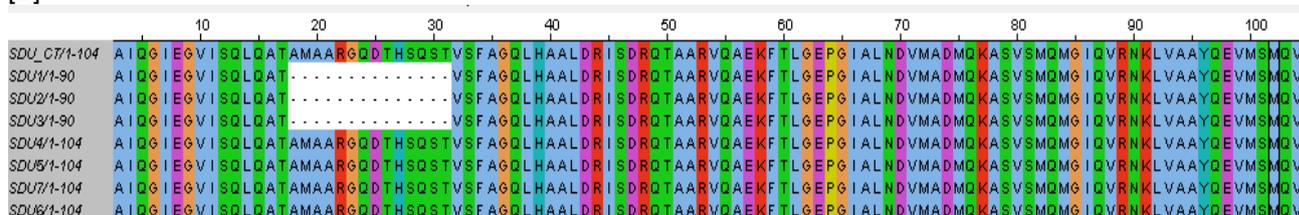


Figura 22. Alineamiento de la secuencia nucleotídica (A) y de aminoácidos (B) de FliE usando el software Bioedit. SDU_CT corresponde a FliE de la cepa S. Dublin CT_02021853 cuyo genoma completo se encuentra disponible en la base de datos de NCBI. Resaltado en amarillo la región delecionada de 42 nucleótidos.

Analizando la secuencia de las proteínas FliE de diversas subespecies de *Salmonella enterica*, incluyendo diversos serovares dentro de *S. enterica* subsp. *enterica* (Figura 23A), se observa que la región delecionada en los aislamientos uruguayos de S. Dublin no flagelados corresponde a una región de relativamente baja homología entre las diferentes proteínas analizadas. Lo mismo se observa analizando la secuencia de FliE de diversas especies bacterianas dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 23B)

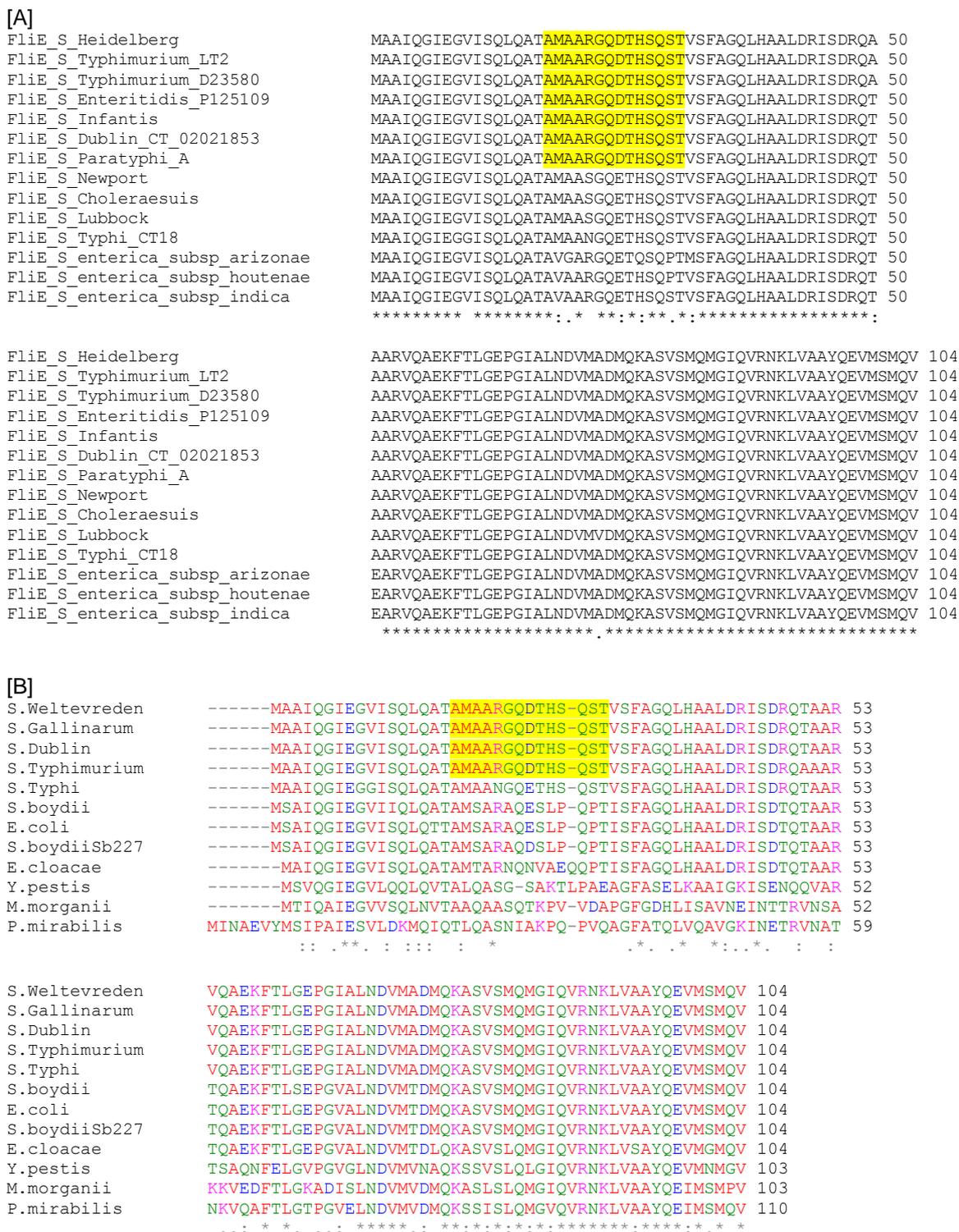


Figura 23 Alineamiento de secuencias aminoacídicas de FliE de *Salmonella enterica* (A) o de diversas especies bacterianas dentro de las enterobacterias (B). *S. boydii*: *Sigella boydii*, *E. coli*: *Escherichia coli*, *E. cloacae*: *Enterobacter cloacae*, *Y. pestis*: *Yersinia pestis*, *M. Morganii*: *Morganella morganii*, *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis*. En amarillo se resalta la región delecionada en los aislamientos uruguayos aflagelados de *S. Dublin*.

7.5.2.- Screening de *fliE*Δ42 por PCR en últimos aislamientos clínicos obtenidos

Durante el desarrollo del presente trabajo se obtuvieron 3 aislamientos nuevos de *S. Dublin* de

origen clínico, aislados durante el año 2011, denominados SDu8, SDu9 y SDu10. De estos aislamientos, únicamente SDu9 no presentaba movilidad (tabla 1). Además, por análisis de western blotting de extractos totales proteicos, se observó ausencia de FliC en la cepa SDu9 (datos no mostrados). Para corroborar si existía la misma delección en *fliE*, diseñamos cebadores que hibridan a ambos lados de la delección para detectarla por PCR (Figura 24). Como controles utilizamos las cepas SDu3 y SDu5. El tamaño del producto amplificado es de 77 pb, en el caso del gen *fliE* Δ 42, o 119 pb, en el caso del gen completo.

En los 2 aislamientos móviles (SDu8 y SDu10) se observó una banda de un poco más de 100 pb, del mismo tamaño que la observada en SDu5, correspondiente al gen *fliE*⁺. En el aislamiento no móvil (SDu9) se observó una banda menor de 100 pb de tamaño similar a la observada en SDu3, correspondiente a *fliE* Δ 42.

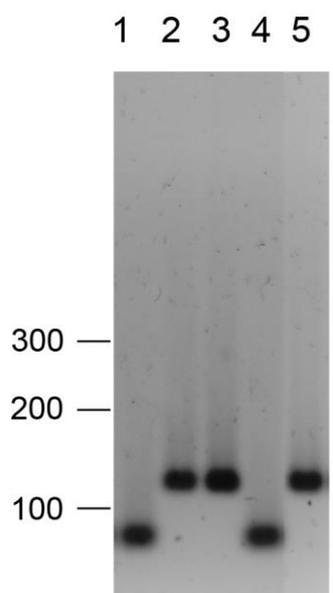


Figura 24. PCR para detección del tamaño de *fliE*. Cepas SDu3 (Carril 1), SDu5 (Carril 2), SDu8 (Carril 3), SDu9 (Carril 4), SDu10 (Carril 5).

Estos resultados indican que en el nuevo aislamiento clínico aflagelado obtenido de *S. Dublin*, existe una delección similar en el gen *fliE* a la observada en los aislamientos aflagelados obtenidos varios años atrás, la cual sea probablemente la causa de su ausencia de flagelo. Además, sugieren que en los aislamientos aflagelados se estaría sintetizando una proteína FliE de menor tamaño que no permitiría terminar de formar el cuerpo basal del flagelo o que, a pesar de formarse el cuerpo basal, no permitiría una correcta secreción de FlgM.

7.5.3.- Complementación de SDu3 con *fliE* de SDu5

Para constatar que la delección de 42 nucleótidos en el gen *fliE* de los aislamientos aflagelados sea la causa de dicho fenotipo, complementamos en trans una cepa aflagelada con el gen *fliE* entero de una cepa flagelada y probamos su movilidad en agar blando.

Para ésto, procedimos de la misma forma que en la complementación con *fliA*. Amplificamos por PCR el gen *fliE* del ADN genómico de SDu5, lo clonamos en los plásmidos pBAD22 y pJF119EH (vectores de expresión, inducibles por arabinosa e IPTG, respectivamente) y los transformamos en SDu3. En adelante se las llamarán SDu3/pBE (SDu3 transformada con pBE) y SDu3/pJE (SDu3 transformada con pJE). Como control también se transformaron los plásmidos vacíos en SDu3 y SDu5 (SDu3/pBAD, SDu5/pBAD, SDu3/pJF y SDu5/pJF).

Realizamos estudios de movilidad en agar blando sin inductor, con inductor en diferentes concentraciones (a las cepas SDu3/pBE y SDu3/pJE) y con Glucosa, inhibidor de la expresión del gen clonado en el plásmido (a la cepa SDu3/pBE). Observamos que ambas cepas recuperaron la movilidad de forma inmediata, la cual aumenta conforme aumenta la concentración de inductor (Figura 25). En el caso de SDu3/pBE, la movilidad en presencia de glucosa es igual a la movilidad sin inductor (6mm). Con la cepa SDu3/pJE el resultado fue similar, es decir, la movilidad fue dependiente de la concentración de inductor (datos no mostrados).

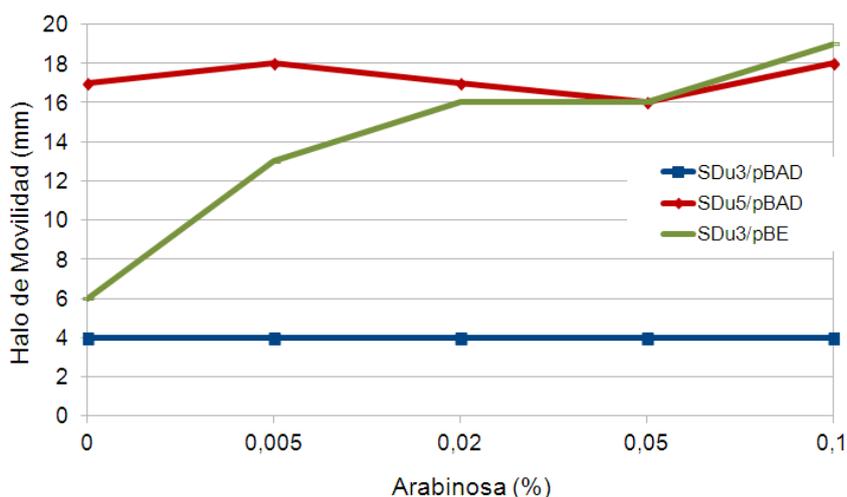


Figura 25. Ensayo de movilidad a diferentes concentraciones de inductor, cepas SDu3/pBE, SDu3/pBAD y SDu5/pBAD

Estos resultados confirman que la delección en *fliE* es la causa de la falta de flagelo en los

aislamientos clínicos no móviles de *S. Dublin*. Para determinar si el cuerpo basal no se termina de ensamblar por la falta de incorporación de la proteína FliE, o si éste se ensambla con la proteína FliE deletada, la cual carece de funcionalidad en el proceso de secreción de los productos flagelares, se necesitarían otros estudios más específicos, como por ejemplo determinación de la localización de FliE por microscopía de inmunofluorescencia. En cualquier caso, se puede concluir que en las cepas portadoras del gen *fliEΔ42*, la secreción de productos flagelares a través del sistema de secreción tipo III flagelar está afectada, no realizándose de manera correcta la secreción de FlgM (y en consecuencia permaneciendo silenciados todos los genes de clase 3), y tampoco la secreción del resto de los productos flagelares (dado que, aunque se libere la inhibición de FliA por sobreproducción de la misma, la cepa se mantiene aflagelada, debido a que a pesar de que los genes de clase 3 se están produciendo, no pueden secretarse a través del SST3 flagelar, y en consecuencia no se puede ensamblar el flagelo).

7.5.4.- Evaluación de la capacidad inflamatoria de la cepa SDu3 complementada con *fliE+*

Para analizar si la cepa complementada SDu3/pJE presentaba capacidad proinflamatoria *in vivo* similar a la observada en SDu5 realizamos ensayos de infección en el modelo de colitis en ratón. Primero se transformó el plásmido pJE en la cepa SDu3 resistente a estreptomicina y se verificó la reversión del fenotipo inmóvil. Además, se constató que incluso en ausencia de inductor, el escape basal del promotor era suficiente para permitir movilidad a la cepa. Se hicieron estudios de estabilidad plasmídica *in vitro* (crecimiento por varias generaciones en LB sin ampicilina, que es el antibiótico que selecciona la presencia del plásmido pJE) y el plásmido no se perdía (datos no mostrados). Una vez verificado esto, se infectaron ratones previamente tratados con estreptomicina con la cepa SDu3 str^R pJE y analizamos la expresión en ciego de genes proinflamatorios IL17, IFN- γ , TNF- α y CXCL1, y péptidos antimicrobianos Lcn2 y S100A9. Como controles se utilizaron las cepas SDu3 y SDu5, y ratones no infectados.

Como se observa en la figura 26, los niveles alcanzados en los ciegos infectados por la cepa SDu3/pJE de los diferentes genes proinflamatorios y de péptidos antimicrobianos son mayores a los alcanzados en los infectados con la cepa aflagelada SDu3, llegando a ser similares, e incluso mayores, a los alcanzados en los infectados con la cepa flagelada SDu5. Esto indica que la respuesta proinflamatoria disminuida, observada al infectar con SDu3, se debe a la presencia del

gen *fliE* deletado y por lo tanto a la ausencia de flagelo

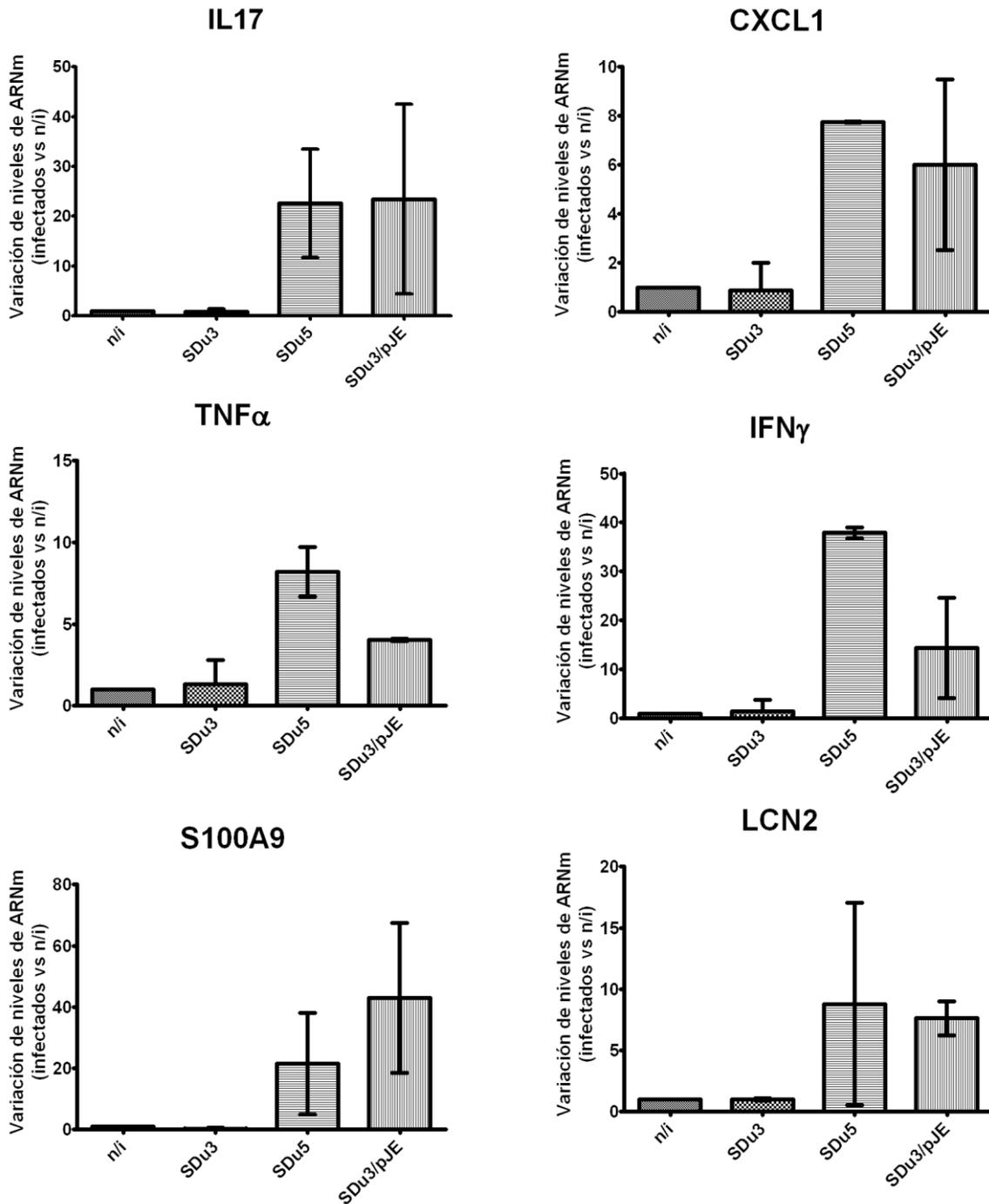


Figura 26. Variación de los niveles de ARNm a las 24 hs p.i. en la mucosa de ciego de ratones infectados con *S. Dublin*, determinado por qRT-PCR. Los valores se expresan en cambio de niveles de ARNm de los genes indicados, comparados con los niveles en ratones no infectados. Resultados de un experimento con grupos de 3 ratones.

7.5.5.- Análisis de la secuencia nucleotídica de *fliE* de SDu3/pJA *mot+*

Para determinar cómo pudo ensamblarse el flagelo en las cepas SDu3 sobreexpresando *fliA* que

revertieron el fenotipo aflagelado luego de varios pasajes en agar de movilidad, luego de corroborar que una delección en *fliE* es la causante de dicho fenotipo, analizamos la secuencia nucleotídica de este gen en las cepas SDu3/pJAmot+6, SDu3/pJAmot+7, SDu3/pJAmot+8 y SDu3/pJAmot+9.

Al realizar la PCR para detectar la delección y separar el producto obtenido por electroforesis en un gel de agarosa, observamos que *fliE* de las cepas revertientes tenían un tamaño similar al tamaño de *fliE*+ (SDu5) (Datos no mostrados).

Comparando las secuencias de *fliE* obtenidas, con las secuencias de SDu3 y SDu5, encontramos que *fliE* de todas las cepas SDu3 complementadas con *fliA* revertientes en su movilidad, presentaban fragmentos repetidos de secuencias de 21 o 30 nucleótidos en diferentes patrones haciendo que el tamaño del gen se pareciera al gen entero salvaje (Figura 27). Las secuencias nucleotídicas de *fliE* de SDu3/pJAmot+6 y SDu3/pJAmot+8 resultaron idénticas entre sí, mientras que las de SDu3/pJAmot+7 y SDu3/pJAmot+9 resultaron muy parecidas entre si y parecidas a las de SDu3/pJAmot+6 y SDu3/pJAmot+8. Estas repeticiones de secuencia no alteran el marco de lectura ni insertan un codón stop, lo que sugiere que codificarían para una proteína funcional de tamaño similar al salvaje (100 y 107 aa comparado con 104 de la salvaje) que se insertaría en el cuerpo basal y permitiría continuar con el ensamblado del flagelo.

[A]

```

fliE5          ATGGCAGCAATACAGGGGATTGAAGGG-----GTTATTAGCCAGTTACAG 45
fliE3JA+6     ATGGCAGCAATACAGGGGATTGAAGGGGCAATACAGGGGATTGAAGGGGTTATTAGCCAGTTACAG 66
fliE3JA+7     ATGGCAGCAATACAGGGGATTGAAGGG-----GTTATTAGCCAGTTACAG 45
fliE3JA+8     ATGGCAGCAATACAGGGGATTGAAGGGGCAATACAGGGGATTGAAGGGGTTATTAGCCAGTTACAG 66
fliE3JA+9     ATGGCAGCAATACAGGGGATTGAAGGG-----GTTATTAGCCAGTTACAG 45
*****
fliE5          GCGACGGCGATGGCCGGCGCGGGGCAAGACACGCACCTCGCAGTCGACGGTGAGTTTTGCCGGCCAGCTACAT 117
fliE3JA+6     GCGACGGTGAGTTTTGCCGGCCAGTTACAGGCCACGG-----TGAGTTTTGCCGGCCAGCTACAT 126
fliE3JA+7     GCGACGGTGAGTTTTGCCGGCCAGTTACAGGCCACGG-----TGAGTTTTGCCGGCCAGCTACAT 105
fliE3JA+8     GCGACGGTGAGTTTTGCCGGCCAGTTACAGGCCACGG-----TGAGTTTTGCCGGCCAGCTACAT 126
fliE3JA+9     GCGACGGTGAGTTTTGCCGGCCAGCTACATCGACGG-----TGAGTTTTGCCGGCCAGCTACA 105
*****
fliE5          GCTGCGCTGGATCGTATTAGCGACAGACAGACGGCGCGCGCTTCAGGCGGAAAAATCACTCTGGGTG 187
fliE3JA+6     GCTGCGCTGGATCGTATTAGCGACAGACAGACGGCGCGCGCTTCAGGCGGAAAAATCACTCTGGGTG 196
fliE3JA+7     GCTGCGCTGGATCGTATTAGCGACAGACAGACGGCGCGCGCTTCAGGCGGAAAAATCACTCTGGGTG 175
fliE3JA+8     GCTGCGCTGGATCGTATTAGCGACAGACAGACGGCGCGCGCTTCAGGCGGAAAAATCACTCTGGGTG 196
fliE3JA+9     GCTGCGCTGGATCGTATTAGCGACAGACAGACGGCGCGCGCTTCAGGCGGAAAAATCACTCTGGGTG 175
*****
fliE5          AGCCGGGCATTGCGCTTAATGACGTGATGGCCGATATGCAAAAAGCGTCCGTCTCCATGCAAATGGGG 255
fliE3JA+6     AGCCGGGCATTGCGCTTAATGACGTGATGGCCGATATGCAAAAAGCGTCCGTCTCCATGCAAATGGGG 264
fliE3JA+7     AGCCGGGCATTGCGCTTAATGACGTGATGGCCGATATGCAAAAAGCGTCCGTCTCCATGCAAATGGGG 243
fliE3JA+8     AGCCGGGCATTGCGCTTAATGACGTGATGGCCGATATGCAAAAAGCGTCCGTCTCCATGCAAATGGGG 264
fliE3JA+9     AGCCGGGCATTGCGCTTAATGACGTGATGGCCGATATGCAAAAAGCGTCCGTCTCCATGCAAATGGGG 243
*****
fliE5          ATTCAGGTGCGCAACAAGCTGGTCGCCGCGTATCAGGAAGTGATGTCTATGCAGGTTTAA 315
fliE3JA+6     ATTCAGGTGCGCAACAAGCTGGTCGCCGCGTATCAGGAAGTGATGTCTATGCAGGTTTAA 324
fliE3JA+7     ATTCAGGTGCGCAACAAGCTGGTCGCCGCGTATCAGGAAGTGATGTCTATGCAGGTTTAA 303
fliE3JA+8     ATTCAGGTGCGCAACAAGCTGGTCGCCGCGTATCAGGAAGTGATGTCTATGCAGGTTTAA 324
fliE3JA+9     ATTCAGGTGCGCAACAAGCTGGTCGCCGCGTATCAGGAAGTGATGTCTATGCAGGTTTAA 303
*****

```

[B]

```

FliE3JA+6/8  MAAIQGIIEGAIQGIIEGVISQLQATVSFAG----QLQATVSFAGQLHAALDRISDRQTAAR 56
FliE3JA+7    MAAIQGIIEG-----VISQLQATVSFAG----QLQATVSFAGQLHAALDRISDRQTAAR 49
FliE3JA+9    MAAIQGIIEG-----VISQLQATVSFAGQLH----ATVSFAGQLHAALDRISDRQTAAR 49
FliE3        MAAIQGIIEG-----VISQLQATVSFAG-----QLHAALDRISDRQTAAR 39
FliE5        MAAIQGIIEG-----VISQLQATAMAARGQDTHSQSTVSFAGQLHAALDRISDRQTAAR 53
              *****          *****          *          *****

FliE3JA+6/8  VQAEKFTLGEFGIALNDVMADMQKASVSMQMGIQVRNKLVAAYQEVMSMQV 107
FliE3JA+7    VQAEKFTLGEFGIALNDVMADMQKASVSMQMGIQVRNKLVAAYQEVMSMQV 100
FliE3JA+9    VQAEKFTLGEFGIALNDVMADMQKASVSMQMGIQVRNKLVAAYQEVMSMQV 100
FliE3        VQAEKFTLGEFGIALNDVMADMQKASVSMQMGIQVRNKLVAAYQEVMSMQV 90
FliE5        VQAEKFTLGEFGIALNDVMADMQKASVSMQMGIQVRNKLVAAYQEVMSMQV 104
              *****

```

Figura 27. (A) Alineamiento de la secuencia nucleotídica de los genes *fliE* de SDu5 y cepas SDu3 revertientes. (B) Alineamiento de secuencia de aminoácidos de proteína FliE de SDu3, SDu5 y de las cepas revertientes. En ambos alineamientos, el fragmento resaltado en amarillo corresponde a la delección de 42 nucleótidos, el fragmento resaltado en celeste es el duplicado del fragmento azul, los fragmentos resaltados en rojo son duplicados de los fragmentos naranja, el fragmento resaltado en verde claro es duplicado del fragmento resaltado en verde oscuro.

7.6.- Análisis de la movilidad en aislamientos de S. Dublin obtenidos de ganado bovino

Luego de elucidar la causa de la ausencia de flagelo en los aislamientos clínicos de S. Dublin, analizamos el fenotipo de movilidad en aislamientos obtenidos de bovinos, el hospedero natural de este serovar. Contamos con una colección de 15 aislamientos identificados como SDuG1 a SDuG15 (Tablas 2 y 6) disponibles en el CNS y aislados entre los años 1995 y 2004.

7.6.1.- Estudio de la movilidad de aislamientos S. Dublin de ganado bovino

Primeramente analizamos la movilidad en agar blando de los 15 aislamientos obtenidos de ganado bovino. Encontramos una elevada proporción de cepas carentes de movilidad, dado que 10 de ellos (66,7%) resultaron no móviles (Figura 28).

Tabla 6. Movilidad de los aislamientos obtenidos de ganado bovino

Aislamiento	Cepa	Movilidad
75/95	SDuG1	+
56/96	SDuG2	-
57/96	SDuG3	-
69/96	SDuG4	+
72/96	SDuG5	-
73/96	SDuG6	-
74/96	SDuG7	-
75/96	SDuG8	-
76/96	SDuG9	-
79/98	SDuG10	-
210/00	SDuG11	+
73/04	SDuG12	-
74/04	SDuG13	+
75/04	SDuG14	+
99/04	SDuG15	-

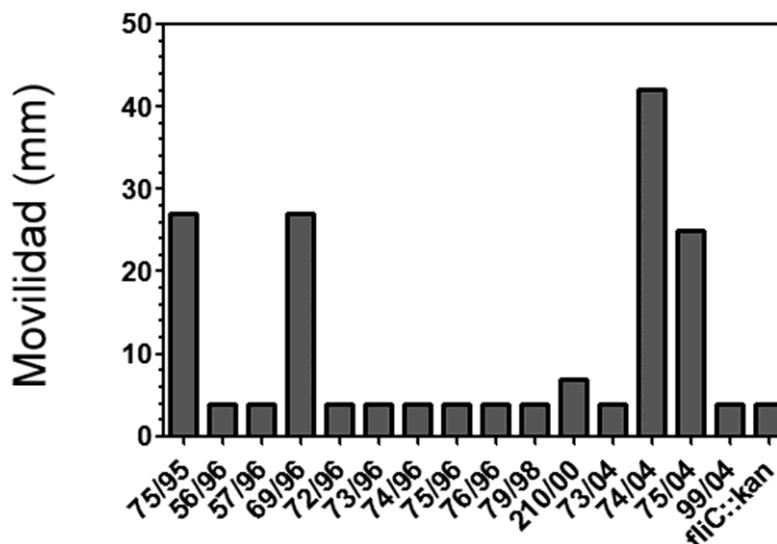


Figura 28. Ensayo de movilidad de los 15 aislamientos *S. Dublin* obtenidos de ganado bovino. Se utilizó un mutante SDu5 con el gen *fliC* silenciado (*fliC::kan^R*) como control negativo.

7.6.2.- Screening de *fliE*Δ42 en aislamientos no móviles de ganado bovino

Con el objetivo de determinar si en los aislamientos inmóviles derivados de bovinos, *fliE* presenta una deleción similar a la encontrada en *fliE*Δ42 de los aislamientos obtenidos de humanos, realizamos una búsqueda de la misma por PCR, de la forma descrita en el apartado 4.5.2. (Figura 29). Encontramos que 4 de los 10 aislamientos inmóviles (SDuG2, SDuG3, SDuG6 y SDuG7) presentaban una deleción de un tamaño similar a la encontrada en los aislamientos humanos. Además, observamos que las bandas correspondientes a los productos de PCR de los otros 6 aislamientos, tenían un tamaño similar a la del control positivo SDu5, lo que corrobora que no se encuentra esta deleción, aunque no confirma que *fliE* sea idéntico en estas cepas. Este resultado se debería haber confirmado, mediante análisis de la secuencia nucleotídica de *fliE* de dichas cepas.

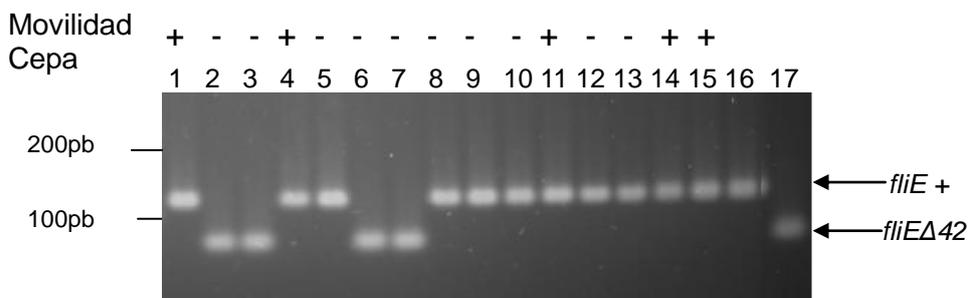


Figura 29. PCR para *fliE* de *S. Dublin* aisladas de ganado bovino. Carriles 1 – 15: SDuG1 - SDuG15, carril 16: SDu5 (*fliE*+), 17: SDu3 (*fliE*Δ42). + cepas móviles, – cepas no móviles.

Estos resultados sugieren que una delección en *fliE* similar a la encontrada en *fliE* Δ 42 en las cepas SDuG2, SDuG3, SDuG6 y SDuG7, podría ser la causa del fenotipo inmóvil. Además encontramos cepas carentes de movilidad que no presentan dicha delección, lo que indica que hay otros mecanismos que determinan un fenotipo inmóvil en estos aislamientos.

7.6.3.- Análisis de síntesis y localización de FliC en aislamientos no móviles de ganado bovino

Para determinar si el fenotipo inmóvil estaba causado por ausencia de FliC o por la presencia de un flagelo no funcional, realizamos análisis de Western blotting de extractos proteicos celulares y de superficie. Observamos que en los 4 aislamientos inmóviles que presentan una delección en *fliE* similar a la encontrada en *fliE* Δ 42 no se detecta FliC en los extractos celulares de proteínas (Figura 30, carriles 1 al 4), lo que indica que carecen de flagelo como era de esperar. Además, observamos que, de los 6 aislamientos inmóviles que presentan un tamaño de *fliE* similar al salvaje, en 3 no se detecta FliC en los extractos de proteínas celulares (Figura 30, carriles 5, 6 y 7), mientras que en los otros 3 aislamientos, si se detecta FliC (Figura 30, carriles 8, 9 y 10) y también en extractos de proteínas de superficie (Figura 31, carriles 1, 2 y 3).

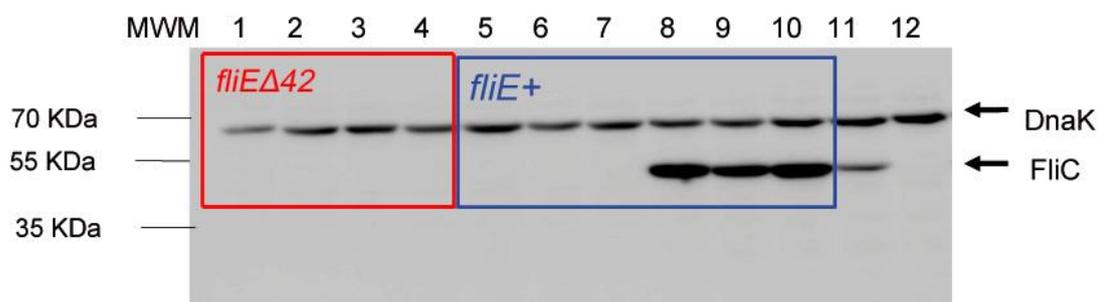


Figura 30. Análisis de western blotting (usando anticuerpos específicos contra FliC) de extractos proteicos celulares de *S. Dublin* no móviles aisladas de ganado. Carriles 1: SDuG2, 2: SDuG3, 3: SDuG6, 4: SDuG7, 5: SDuG5, 6: SDuG8, 7: SDuG9, 8: SDuG10, 9: SDuG12, 10: SDuG15. Control FliC+ (Carril 11), FliC- (Carril 12). Control de carga: DnaK. Se indica con un recuadro rojo las cepas que presentan la delección en *fliE* y en azul las que presentan *fliE* con tamaño similar al gen salvaje.

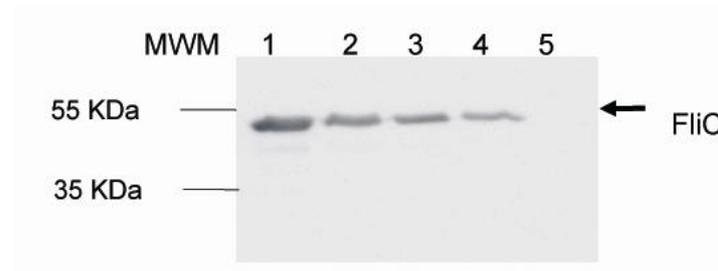


Figura 31. Análisis de western blotting (usando anticuerpos específicos contra FliC) de extractos proteicos de superficie de *S. Dublin* no móviles aisladas de bovinos, que sintetizan FliC. Carriles 1: SDuG10, 2: SDuG12, 3: SDuG15, 4: Control FliC+, 5: FliC-. Se muestra a la izquierda el marcador de peso molecular en kDa.

Estos resultados demuestran que la presencia de la delección en *fliE* no es exclusiva de aislamientos humanos de *S. Dublin*, sino que también se encuentra en aislamientos provenientes de muestras alimentarias, en las cuales también generan un fenotipo de ausencia de producción de flagelina. Además, indican que existen otros mecanismos que resultan en un fenotipo aflagelado, distintos a la presencia de delecciones en *fliE*, y que existen también cepas que si bien producen flagelina, carecen de movilidad, probablemente debido a otros defectos en genes flagelares (quizá se esté ensamblando un flagelo no funcional, que carece de rotación debido a alteraciones en las proteínas motoras).

8.- DISCUSIÓN

8.1.- El flagelo en *Salmonella enterica* serovar Dublin

El flagelo bacteriano ha sido clásicamente considerado como un importante factor de virulencia porque confiere movilidad a la bacteria para trasladarse a medios más favorables y colonizar tejidos de los hospederos. Más recientemente, se ha demostrado que el flagelo también participa en otros procesos como adhesión, formación de biofilms y modulación de los sistemas inmune innato y adaptativo (Duan *et al.*, 2013). La flagelina, codificada por el gen *fliC* y principal componente estructural del flagelo, es una de las moléculas bacterianas reconocidas por el sistema inmune innato. Este proceso ocurre a través de la unión a receptores de reconocimiento de patrones como TLR5 y Naip5 en conjunto con NLRC4 (Hayashi *et al.*, 2001; Gewirtz *et al.*, 2001; Winter *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2010). En el caso de *Salmonella* Typhimurium, se ha demostrado que el flagelo y la quimiotaxis son esenciales para generar una respuesta inflamatoria eficiente a nivel intestinal en el modelo murino de colitis, en gran medida por proveer de movilidad a las bacterias (Stecher *et al.*, 2004). Asimismo, se ha demostrado que un mutante de *S. Typhimurium* deficiente en *flgM*, que sobreproduce flagelina de manera constitutiva, resultó atenuado en el modelo murino (Schmitt *et al.*, 1994). Más recientemente, se reportó que estas cepas mutantes de *S. Typhimurium* que sobreexpresan *fliC*, son atenuadas debido al reconocimiento de flagelina por el sistema inmune innato (Lai *et al.*, 2013). Por otra parte, Winter y col (2009) reportaron que el reconocimiento de la flagelina de *S. Typhimurium* por los receptores de la inmunidad innata contribuye a iniciar respuestas inflamatorias en la mucosa del ileon en bovinos, pero no en ratones. Finalmente, la flagelina de *Salmonella* constituye un potente antígeno generador de respuesta adaptativa tanto celular como humoral.

Todos estos datos indican que, si bien el flagelo actúa como un factor de virulencia también puede tener un rol negativo para la bacteria durante el proceso de infección de los tejidos del hospedero, dado que el reconocimiento por parte del sistema inmune innato desencadena una fuerte respuesta inflamatoria destinada a eliminar el patógeno infectante. De hecho, se ha reportado que la expresión de *fliC* en *S. Typhimurium* durante la infección de ratones está anatómicamente restringida a la fase intestinal de la infección cuando las bacterias invaden las placas de Peyer, pero se reprime una vez que *S. Typhimurium* se encuentra en los nódulos mesentéricos y en los órganos internos como el bazo (Cummings *et al.*, 2006).

Está generalmente aceptado que una respuesta inflamatoria aguda a nivel de la mucosa intestinal caracterizada por un importante influjo de neutrófilos, inducción de citoquinas, quemoquinas y péptidos antimicrobianos, contribuye a mantener la infección localizada impidiendo que se produzca diseminación bacteriana más allá del tracto gastrointestinal (Wangdi *et al.* 2012). En este sentido, a diferencia de los serovares no tifoideos que generan una gastroenteritis localizada, las infecciones por serovares restringidos a hospedero que causan infecciones invasivas, como Typhi o Gallinarum, cursan con nula o escasa inflamación intestinal en la fase aguda de la infección (Santos *et al.*, 2009, Raffatellu *et al.*, 2008). Asimismo, Raffatellu *et al.* (2008) reportaron en simios, un modelo experimental similar al hospedero humano, que la deficiencia en la respuesta de tipo TH17 en la mucosa de íleon debida a la infección por el virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), rinde a los animales más susceptibles a la infección sistémica por parte de *S. Typhimurium* que simios no infectados. Esta mayor susceptibilidad se correlacionó con menores respuestas de citoquinas y péptidos antimicrobianos a nivel del íleon, incluyendo IL17, IL22, IL8, Mip3 α (CCL20) y Lcn2, lo que favorecía una mayor diseminación bacteriana a sitios sistémicos (Raffatellu *et al.*, 2008).

A su vez, está descrita en los serovares de hospedero restringido Typhi (exclusivo de humanos) y Gallinarum (exclusivo de aves), la represión de la expresión de flagelo en la fase intestinal para el caso de Typhi y la ausencia de flagelo para el caso de Gallinarum. En este sentido, De Freitas Neto *et al.* demostraron que una cepa de *S. Gallinarum* modificada genéticamente para expresar flagelo, generó cambios patológicos inflamatorios en intestino de aves y resultó menos patogénica que la parental naturalmente aflagelada (De Freitas Neto *et al.*, 2013). Es interesante destacar también que el estudio de un conjunto de cepas de *S. Typhimurium* pertenecientes al genotipo de MLST ST313, secuenciotipo que emergió recientemente en África subsahariana y presenta niveles inusualmente elevados de invasividad comparado con el secuenciotipo ST19 (el tipo circulante en el resto del mundo y de baja invasividad), reveló en los primeros una menor producción de flagelina y menor actividad proinflamatoria que en los segundos (Ramachandran *et al.*, 2015).

En otras especies bacterianas patógenas se han descrito también mecanismos de represión del flagelo cuando infectan al hospedero. Tal es el caso del género *Yersinia*, bacteria que o bien reprime la expresión del flagelo a 37°C, temperatura encontrada en los tejidos de sus hospederos mamíferos (*Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*), o bien ha perdido

permanentemente la capacidad de expresarlo debido a mutaciones (*Yersinia pestis*) (Minnich and Rohde, 2007). El bloqueo en la síntesis del flagelo en el caso de *Yersinia* enteropatógena se debe a la inhibición de la expresión del factor sigma flagelar *fliA*, generando la represión de los genes estructurales del flagelo cuya transcripción depende de dicho factor sigma. Por su lado, *Y. pestis* porta numerosas mutaciones en genes flagelares, incluyendo una mutación que genera un cambio en el marco de lectura del gen *flhD*, componente del regulador maestro de todos los operones flagelares. Minnich y Rohde sugieren que la represión de la flagelina en el entorno del hospedero podría ser crucial para el éxito de la infección por parte de *Yersinia*, dado que esta proteína es un potente inductor de la inmunidad innata. Además, tal como se describió para *Salmonella* Typhimurium, la expresión artificial de *fleB* (gen que codifica para flagelina) en *Y. enterocolitica* atenúa completamente su virulencia en el modelo murino, apoyando la hipótesis de que la movilidad podría ser una función no esencial en el hospedero mamífero.

A pesar de que a nivel mundial es reportado con un elevado índice de invasividad, en pocos trabajos se aborda el estudio específico de *S. enterica* serotipo Dublin como agente de ETA en humanos y de sus propiedades patogénicas. Además, la inmensa mayoría de los trabajos que abordan el estudio del rol del flagelo como factor de virulencia y modulador del sistema inmune en *Salmonella*, están realizados con cepas del serovar Typhimurium, en muchos casos manipuladas genéticamente para anular o bien aumentar la expresión de genes flagelares, pero muy poco se ha reportado sobre aislamientos naturales que porten alteraciones a nivel del sistema flagelar.

En la presente tesis, reportamos una elevada frecuencia de cepas aflageladas pertenecientes al serovar Dublin, un serotipo adaptado al hospedero bovino pero capaz de infectar humanos con una inusual invasividad para tratarse de un serovar no tifoideo. Remarcablemente, dichas cepas aflageladas se aislaron a lo largo de diferentes períodos de tiempo y provenían de diversos orígenes. De los 10 aislamientos de *S. Dublin* de origen humano disponibles en las colecciones del CNS y del Departamento de Laboratorios del MSP, 4 mostraron ausencia de flagelo y consecuentemente de movilidad. Por otro lado, de los 15 aislamientos de origen bovino disponibles, 10 demostraron ausencia de movilidad, de los cuales 7 carecían de flagelina en extractos de proteínas totales. Considerando todos los aislamientos utilizados en este trabajo en su conjunto, concluimos que 11 de un total de 25 (44%) presentan un fenotipo de ausencia de flagelo, lo cual indica una elevada frecuencia de cepas aflageladas en este serovar. En trabajos

previos de nuestro grupo, en los cuales se analizó la movilidad en una colección de 266 aislamientos de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, un serotipo estrechamente relacionado al serotipo Dublin a nivel filogenético pero sin embargo altamente prevalente en humanos y un índice de invasividad muy bajo, se encontró que un 27% de los mismos eran no móviles, pero dentro de este porcentaje se encontraban numerosas cepas portadoras de flagelos paralizados, por tanto la proporción de cepas carentes de flagelo en el serovar Enteritidis es sensiblemente menor que en el serovar Dublin (Yim *et al.*, 2011).

Los aislamientos aflagelados del serovar Dublin reportados en esta tesis presentan la fórmula antigénica 9,12:-:-, a diferencia de las cepas flageladas de *S. Dublin* que poseen la fórmula 1,9,12 [Vi]:g,p:-. Sin embargo, los asignamos a este serotipo dado que presentan la secuencia de la región hipervariable del gen *fliC* idéntica a la de las cepas de *S. Dublin* disponibles en la base de datos de GenBank y pertenecen al mismo secuenciotipo (ST10) que la mayoría de los aislamientos de *S. Dublin* a nivel mundial cuando se analizan por Multilocus Sequence Typing (MLST). Finalmente, la secuencia completa de los genomas de los aislamientos aflagelados confirmó su pertenencia al serovar Dublin.

El fenotipo aflagelado en *S. Dublin* no parece ser un fenómeno aislado de las cepas circulantes en nuestro país. Selander y colaboradores reportaron que 113 aislamientos de 114 recuperados de ganado bovino y suino en Estados Unidos entre 1988 y 1989 poseían la fórmula antigénica 1,9,12:-:-, y se les asignó al serovar Dublin en base a análisis de multi locus enzimático por electroforesis (Multi Locus Enzyme Electrophoresis, MLEE) (Selander *et al.*, 1992). Asimismo, Franklin y col. reportaron que 5 aislamientos con la fórmula 1,9,12:-:- recuperados a partir de ganado bovino en Suecia fueron identificados como serotipo Dublin en base a sus perfiles de restricción plasmídica (Franklin *et al.*, 1990). Una posible limitación a la identificación de cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes al serovar Dublin carentes de flagelo es justamente que la definición de serovar se basa en las propiedades antigénicas de la cepa, tanto de los antígenos somáticos como los flagelares. Por tanto a nivel mundial, a un aislamiento de *Salmonella* que presente la fórmula 1,9,12:-:- se le asignaría el serotipo Gallinarum, o en caso de derivar de un hospedero no aviar se le asignaría el serotipo 1,9,12:-:-, pero no necesariamente se las identificaría como serotipo Dublin.

Considerando todos estos datos, podemos sugerir que el flagelo no desempeña un rol esencial en

el ciclo de infección de *S. Dublin*. En concordancia con esto, Olsen y colaboradores reportaron, usando un mutante portando el gen *fliC* inactivado por un transposón, que el flagelo ejerce un rol despreciable para la supervivencia extra-animal de *S. Dublin*, una característica considerada importante para el caso de patógenos zoonóticos (Olsen *et al.*, 2012).

Basados en estos resultados, podemos especular que el aparato flagelar en este serovar podría estar sufriendo un proceso de pérdida, de manera similar a lo ocurrido en el serovar Gallinarum, tal vez debido a que su función no sería esencial para procesos infecciosos, o su ausencia sería ventajosa bajo circunstancias específicas.

Es importante destacar que el fenotipo aflagelado observado en los aislamientos de *S. Dublin* estudiados en este trabajo fue irreversible en agar semisólido y se mantuvo durante la interacción con células epiteliales en cultivo y con los tejidos del hospedero, sugiriendo que en la naturaleza dicho fenotipo difícilmente revierte de forma espontánea. De hecho, nuestros resultados demuestran que fue necesario sobreexpresar de forma artificial el gen que codifica para el factor Sigma flagelar (y en consecuencia todos los genes de clase 3 regulados por éste), y combinar esta propiedad con sucesivos pasajes en un medio que fuerza a las bacterias a expresar el fenotipo de movilidad, para lograr la reversión del fenotipo inmóvil.

8.2.- Respuesta inflamatoria intestinal generada por aislamientos de *S. Dublin* flagelados y no flagelados

En trabajos previos de nuestro grupo se había demostrado que los aislamientos clínicos no móviles de *S. Dublin* generaban una respuesta pro-inflamatoria significativamente menor que aquéllos móviles en células epiteliales intestinales humanas en cultivo, probablemente debido a la ausencia de flagelina (Sasías *et al.*, 2010). Asimismo, de la colección de aislamientos clínicos disponible en este trabajo, todos aquellos aflagelados (SDu1-3 y SDu9), derivaron de infecciones invasivas (hemocultivos), mientras que los aislados de casos de gastroenteritis (coprocultivos) u orina (cuyo origen puede derivar por contaminación por heces) poseían flagelo (SDu5, 6, y 10) (Tabla 1). Si bien existen tres aislamientos portadores de flagelo que fueron aislados de infecciones invasivas (SDu4, SDu7-8), los pacientes a partir de quienes fueron aislados poseían rasgos que podrían hacerlos más susceptibles a sufrir infecciones invasivas por *Salmonella* no tifoidea, debido a posibles deficiencias en su sistema inmune (joven drogadicto, o por encontrarse

en los extremos de la vida –niño de 1 año o adulto mayor de 76 años-).

Basándonos en estos antecedentes y en el hecho de que el serovar Dublin presenta a nivel mundial y también en nuestro país índices de invasividad muy elevados, y considerando que los serovares invasivos Typhi y Gallinarum poseen mecanismos de silenciamiento del flagelo, lo que sería la causa de la pobre respuesta inflamatoria intestinal generada por éstos, nos planteamos la hipótesis de que la ausencia del flagelo podría ser un mecanismo mediante el cual cepas del serotipo Dublin consiguen evadir la respuesta inflamatoria local intestinal del hospedero humano promoviendo así su diseminación a sitios sistémicos. Por ello, nos planteamos analizar la respuesta inflamatoria generada a nivel intestinal por los aislamientos aflagelados respecto a los flagelados en ensayos *in vivo* y elucidar el mecanismo molecular implicado en la ausencia de flagelo en los primeros, para poder así evaluar las posibilidades de reversión del mismo.

Los resultados obtenidos en el modelo murino de colitis, demuestran que un aislamiento carente de flagelo (SDu3) genera una respuesta inflamatoria a nivel de ciego significativamente menor que uno flagelado (SDu5), tanto en lo que respecta a la inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos, como a la generación de alteraciones patológicas a nivel histológico. La inactivación del gen *fljC* en SDu5, rindió una cepa con sus capacidades proinflamatorias afectadas, generando respuestas similares a las generadas por el aislamiento naturalmente aflagelado. Asimismo, la complementación de SDu3 con un gen *fljE* salvaje, lo cual revirtió automáticamente el fenotipo inmóvil, resultó en la generación de respuestas inflamatorias significativamente mayores que la cepa parental aflagelada, y similares a la cepa naturalmente flagelada. Todos estos resultados indican que, tal como se describió para el serovar Typhimurium, en el caso de *S. Dublin*, el flagelo es uno de los factores determinantes de la capacidad de generar respuestas inflamatorias en el intestino de ratones. Por tanto es plausible pensar que la ausencia de flagelo puede ser un rasgo que contribuya a la elevada invasividad del serovar Dublin en humanos, mediante la generación de respuestas inmunes atenuadas en el intestino del hospedero. Si la causa de la habilidad proinflamatoria de *S. Dublin* es la capacidad de moverse y por tanto interactuar con la mucosa o si es efectivamente la activación de los receptores de reconocimiento de patrones TLR5 y NLRC4/NAIP5 por unión a flagelina, queda por demostrar.

A pesar de las respuestas de mucosas tan diferentes generadas por SDu3 y SDu5 en el modelo murino de colitis, no se observaron diferencias significativas en su capacidad de colonizar los

órganos internos de los animales infectados. Este resultado concuerda con lo observado por Stecher y col. quienes reportaron que un mutante aflagelado de *S. Typhimurium* causó niveles significativamente menores de inflamación en ciegos de ratones pretratados con estreptomicina, pero no mostró diferencias en los niveles de colonización bacteriana de nódulos linfáticos mesentéricos, bazo e hígado comparado con la cepa salvaje. Estos resultados refuerzan la idea de que el modelo murino de colitis es útil para estudiar las respuestas inmunes de la mucosa intestinal a la infección por *Salmonella* pero no es adecuado para el estudio de la correlación entre éstas y la traslocación bacteriana a órganos internos, dado que cepas de SNT se diseminan rápidamente al bazo e hígado, estableciendo una infección sistémica similar a la fiebre tifoidea, independientemente de la respuesta inflamatoria generada (Stecher *et al.*, 2004, Winter *et al.*, 2010). Para estudiar dicha correlación es preciso emplear modelos animales cuya implementación es más compleja en el laboratorio, como aves o bovinos.

8.3.- Mecanismo molecular responsable del fenotipo aflagelado en las cepas uruguayas de *S. Dublin*

Uno de los objetivos de esta tesis era la elucidación del mecanismo molecular responsable del fenotipo aflagelado observado en ciertos aislamientos de *S. Dublin* derivados de infecciones sistémicas en humanos. Para ello, en primer lugar analizamos los niveles de ARNm para distintos genes flagelares, tanto de clase 2 como de clase 3. Observamos que la expresión de *fliC*, *motB* y *flgM* en los aislamientos aflagelados es significativamente menor que en los flagelados (entre uno y dos órdenes de magnitud), mientras que los niveles de ARNm para *fliA* y *fliN* no se ven afectados. El defecto en la expresión de *fliC* explica la ausencia de flagelina. Estos datos sugieren además, que la expresión de genes de clase 3 está interrumpida pero no la de genes de clase 2, indicando que probablemente exista alguna alteración en la función del factor Sigma FliA (responsable de la expresión de los genes de clase 3) o en su interacción con el factor anti-Sigma FlgM. Por tanto estudiamos los niveles celulares y secretados de ambas proteínas, en los aislamientos flagelados comparados con los aflagelados. Observamos que FlgM se encuentra enriquecido en las proteínas citosólicas de los aislamientos aflagelados respecto a los aislamientos flagelados y no se detecta entre las proteínas secretadas de los primeros. Este resultado indica que existe un defecto en la secreción de FlgM en los aislamientos aflagelados, lo

que explicaría la ausencia de expresión de genes de clase 3, debido al bloqueo impuesto por FlgM sobre FliA.

Nos planteamos entonces sobreproducir FliA en un aislamiento aflagelado para verificar si así se lograba liberar la inhibición causada por el exceso de FlgM en el citosol, y por tanto promover la expresión de genes flagelares tardíos. Al proveer en trans a la cepa aflagelada SDu3 con el gen *fliA* proveniente de un aislamiento flagelado (SDu5) observamos que ésta presentaba niveles de ARNm para *fliC* y *motB*, mayores incluso que los de la cepa móvil parental, y por western blotting verificamos que era capaz de sintetizar la proteína FliC. Sin embargo esta cepa no revirtió el fenotipo inmóvil. Además, mediante tinción fluorescente de flagelos observamos ausencia del mismo, descartando así que se estuviera ensamblando un flagelo no-funcional. Estos resultados indican que habría una interrupción en la secreción de productos flagelares a nivel general, no únicamente de FlgM, a través del Sistema de Secreción Tipo III flagelar. Únicamente luego de varias generaciones (mediante pasajes sucesivos en agar blando con inductor) sintetizando FliA de forma abundante (y por tanto sobreproduciendo también todas las proteínas flagelares de clase 3), se logró reversión del fenotipo aflagelado.

La disponibilidad de las secuencias genómicas completas de los aislamientos clínicos en estudio, reveló una única diferencia a nivel de la secuencia de los operones flagelares entre aislamientos móviles y no móviles: la presencia de una deleción interna de 42 nucleótidos (desde la posición 53 a la 94) en el gen *fliE* en los segundos. Esta deleción, que denominamos *fliE* Δ 42, no altera el marco de lectura y corresponde a 14 residuos aminoacídicos. Dado que el marco de lectura en el gen delecionado no se altera, se podría traducir eventualmente una proteína FliE de menor tamaño que la salvaje. La complementación en trans con el gen *fliE* completo revirtió inmediatamente el fenotipo inmóvil en la cepa SDu3, indicando que la causa del fenotipo aflagelado es únicamente la presencia del gen *fliE* Δ 42.

Está reportado que *fliE* codifica para una proteína que forma parte del cuerpo basal del flagelo (Muller *et al.*, 1992). Se postula que FliE formaría una conexión entre el anillo MS y el cilindro, con una estequiometría de 9 subunidades de FliE por cuerpo basal (Jones *et al.*, 1990; Minamino *et al.*, 2000). Además, se ha descrito que en mutantes nulos de *fliE* en *Salmonella*, se ve afectada la exportación de otros productos flagelares al exterior celular, concretamente los componentes del gancho, FlgE y FlgD, indicando este dato que FliE participa en el aparato de secreción tipo III

flagelar (Minamino *et al.*, 1999). Los resultados reportados en esta tesis son consistentes con los datos reportados por Minamino y col, y nos permiten sugerir que la presencia de FliE deletada generaría un defecto en la secreción de los componentes del gancho flagelar, y dado que la secreción de los componentes flagelares se realiza de forma axial y secuencialmente según la localización que cada uno ocupa en la estructura del flagelo, la falta de ensamblaje del gancho causaría el defecto en la secreción de todas las proteínas posteriores (las implicadas en la unión del gancho y el filamento, las integrales del filamento y las del cabezal del filamento). Además, está reportado que el factor anti-sigma FlgM, no se secreta al exterior celular hasta que se ha completado el ensamblaje del gancho, lo cual explica el defecto en la expresión de los genes de clase 3 en los aislamientos aflagelados de *S. Dublin* estudiados en este trabajo. Asimismo, nuestros resultados refuerzan los obtenidos por Reed y colaboradores, quienes en la búsqueda de mutantes de *S. Typhimurium* incapaces de activar la respuesta de citoquinas proinflamatorias en células epiteliales intestinales humanas en cultivo, identificaron un mutante *fliE* interrumpido por un transposón. Este mutante, si bien mantenía su capacidad de adhesión e invasión del epitelio intestinal modelo, no inducía la secreción de IL8 por parte de éste y fue incapaz de secretar flagelina y de ensamblar flagelo (Reed *et al.*, 2002).

En Minamino *et al.*, 2000, se sugiere que la región N-terminal de FliE es importante para su secreción y la región C-terminal lo es para la interacción con el cilindro. En este sentido, dado que en las cepas aflageladas estudiadas en la presente tesis la delección afecta el extremo Nt de la proteína, podemos especular que la misma no se estaría localizando en el cuerpo basal por tener afectada su propia secreción. Además, el hecho de que al proveer *in trans* con la proteína salvaje se recupere inmediatamente la movilidad, indica que no existe un efecto dominante negativo por parte de la proteína deletada sobre la salvaje, apoyando este dato la hipótesis de que FliE deletada no se estaría localizando en el cuerpo basal. Alternativamente, es posible que no se sintetice FliE o ésta sea inestable debido a la delección que alteraría su estructura. Sin embargo, para confirmar estas hipótesis habría que hacer estudios de western blotting y de inmunolocalización de esta proteína, para lo cual se requieren anticuerpos específicos que no se hallan disponibles comercialmente.

Recientemente, se ha reportado la estructura completa flagelar en la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, revelada mediante tomografía crioelectrónica (Zhao *et al.*, 2013). En ese trabajo, los

autores determinan el ensamblaje secuencial de los distintos componentes a través del SST3 flagelar mediante el uso de mutantes nulos en genes individuales. Los autores demuestran que un mutante nulo en *fliE* presenta el anillo MS, el anillo C, el motor, el aparato de exportación y el collar sin alteraciones respecto a la cepa salvaje, pero carece de cilindro, de gancho y de filamento. Notablemente, el canal central del anillo MS se observa cerrado en el mutante $\Delta fliE$, mientras que se observa abierto en la cepa parental (Zhao *et al.*, 2013), lo que explicaría el defecto en la secreción de sustratos flagelares a través del mismo.

El análisis de la secuencia nucleotídica de *fliE* en las cepas revertientes SDu3/pJAmot+6, SDu3/pJAmot+7, SDu3/pJAmot+8 y SDu3/pJAmot+9, reveló que se habían producido duplicaciones de secuencias de 21 o 30 nucleótidos de las regiones adyacentes a la delección, las cuales “ocuparían” el lugar de los aminoácidos faltantes, y dado que estas repeticiones de secuencia no alteran el marco de lectura ni insertan un codón stop, se obtiene como resultado una proteína de tamaño similar a la salvaje (100 o 107 residuos aminoácidos en las revertientes y 104 residuos en la salvaje). Estos resultados indican que la identidad de la secuencia aminoácida de los residuos 18 al 31, no es esencial para la funcionalidad de la proteína, sino que lo importante es la longitud de dicha región.

Es importante destacar que en 4 de los 15 aislamientos de *S. Dublin* derivados de ganado bovino analizados se encontró una delección similar a la hallada previamente en los aislamientos clínicos aflagelados, indicando este resultado que la delección en *fliE* claramente no es un hecho aislado puntual, dado que se observa en aislamientos de distintos orígenes (humanos, animales) y obtenidos en distintos períodos de tiempo, lo que indicaría que está circulando en la naturaleza. Además, observamos en las cepas de ganado ausencia de flagelina o ausencia de movilidad (aún produciendo flagelina), por mecanismos distintos a la delección en *fliE*, sugiriendo un fenómeno de convergencia funcional.

Varios trabajos describen el fenómeno de degradación genómica o acumulación de pseudogenes en los serovares de *Salmonella* con rango restringido de hospedero, como un mecanismo de adaptación al hospedero en el cual se pierden funciones génicas que no son necesarias en dicho entorno y a la vez se incrementa la virulencia (Kisiela *et al.*, 2012, Thomson *et al.*, 2008, Parkhill *et al.*, 2001, McClelland *et al.*, 2004, Nuccio *et al.*, 2014, Holt *et al.*, 2009, Kingsley *et al.*, 2009). En este trabajo, describimos la inactivación de una proteína flagelar debida a una delección interna,

que resulta en la pérdida completa del apéndice flagelar en el serovar Dublin de *Salmonella enterica*, contribuyendo así al estudio de los mecanismos responsables de su invasividad y posiblemente de su adaptación un hospedero determinado. Los resultados obtenidos en esta Tesis, podrían extrapolarse a otros serovares de *Salmonella* que presentan elevada invasividad, así como a otras especies bacterianas enteropatógenas.

9.- CONCLUSIONES

- En el presente trabajo planteamos la hipótesis de que la ausencia del flagelo en cepas de *Salmonella enterica* serotipo Dublin (serotipo del grupo Salmonella No Tifoideas adaptado al hospedero bovino pero capaz de infectar humanos con invasividad elevada) podría ser un mecanismo mediante el cual consiguen evadir la respuesta inflamatoria local intestinal del hospedero promoviendo así su diseminación a sitios sistémicos. En este sentido, estudiamos la respuesta inflamatoria generada por aislamientos S. Dublin a nivel intestinal en un modelo animal, elucidamos los mecanismos moleculares responsables del fenotipo aflagelado, determinamos si dicho fenotipo es reversible y analizamos este fenotipo de movilidad en aislamientos de S. Dublin obtenidos de ganado bovino.
- Todos los aislamientos clínicos aflagelados estudiados en esta tesis fueron obtenidos de infección invasiva. Los resultados obtenidos en el modelo murino de colitis, demuestran que un aislamiento aflagelado genera una respuesta inflamatoria a nivel de ciego significativamente menor que uno flagelado.
- Considerando todos los aislamientos utilizados en este trabajo en su conjunto, observamos que hay una elevada frecuencia de cepas aflageladas de S. Dublin.
- Los resultados obtenidos indican que, debido a una delección en *FliE* en los aislamientos aflagelados, ocurre un defecto en la secreción del factor anti-Sigma FlgM, con el consecuente silenciamiento de la expresión de los genes flagelares de clase 3 y la interrupción en el ensamblaje del flagelo.
- Cepas aflageladas sobreproductoras de *FliA*, que revirtieron la movilidad luego de varias generaciones, muestran un tamaño de *FliE* similar a la salvaje. Esto ocurrió mediante duplicaciones de secuencias de 21 o 30 nucleótidos de las regiones adyacentes a la delección, las cuales “ocuparían” el lugar de los aminoácidos faltantes.
- La cepa SDu3 complementada en trans con un gen *fliE* salvaje, genera respuestas inflamatorias significativamente mayores que la cepa parental aflagelada, y similares a la cepa naturalmente flagelada.
- Entre los aislamientos obtenidos de ganado bovino, encontramos aislamientos inmóviles que presentan una delección en *fliE*. También encontramos aislamientos inmóviles con el gen *fliE* de tamaño similar al gen completo que sintetizan flagelina y otros que no la sintetizan. Esto indica que

esta delección no es un hecho aislado puntual, dado que también se observa en aislamientos de origen animal.

- En conclusión, podemos sugerir que el flagelo no desempeña un rol esencial en el ciclo de infección de *Salmonella* Dublin y, por lo tanto, podemos especular que el aparato flagelar en este serovar podría estar pasando por un proceso de pérdida.

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Adak GK, Long SM, O'Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*. 2002 Dec;51(6):832-41
- Aldridge P, Karlinsey JE, Becker E, Chevance FF, Hughes KT, Flk prevents premature secretion of the anti-Sigma factor FlgM into the periplasm. *Molecular Microbiology*. 2006. 60(3), 630–642
- Anjum MF, Marooney C, Fookes M, Baker S, Dougan G, Ivens A, *et al*. Identification of core and variable components of the *Salmonella enterica* subspecies I genome by microarray. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):7894-905.
- Apel D, Surette MG. Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1778(9):1851-8.
- Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Russmann H, Hardt WD. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun*. 2003. 71:2839–2858.
- Barton Behravesh C, Jones TF, Vugia DJ, *et al*: Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996-2005. *J Infect Dis* 2011, 04(2):263-267.
- Baumler AJ, Tsois RM, Ficht TA, *et al*. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica* *Infect Immun*. 1998. 66:4579-4587.
- Betancor L, Yim L, Martínez A, Fookes M, Maskell D, Chabalgoity JA. Genomic and pathogenic differences between the closely related *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Dublin. 3rd ASM Conference on Salmonella: Biology, Pathogenesis and Prevention; Aix en Provence, Francia, 2009.
- Betancor L, Yim L, Martínez A, Fookes M, Sasías S, Schelotto F, Thomson N, Maskell D, Chabalgoity JA: Genomic comparison of the closely related *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Dublin. *Open Microbiol J* 2012, 6:5-13.
- Brown A, Hormaeche CE, Demarco de Hormaeche R, Winther M, Dougan G, Maskell DJ, Stocker BA. An attenuated *aroA* *Salmonella* Typhimurium vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned beta-galactosidase in mice. *J Infect Dis* 1987. 155:86-92
- Casadaban MJ, Cohen SN, Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1980. 138(2):179-207.
- Chaban B, Hughes HV, Beeby M, The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more, *Semin Cell Dev Biol*. 2015 Oct;46:91-103.
- Chevance F, Hughes K, Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine, *Nature Reviews, Microbiology*. 2008. 6:455-65
- Chilcott G, Hughes K, Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biololgy Rev*. 2000. 64(4): 694-708
- Cummings LA, Wilkerson WD, Bergsbaken T, Cookson BT. *In vivo*, *fliC* expression by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted. *Mol. Microbiol*. 2006. 61:795–809.
- de Freitas Neto OC, Setta A, Imre A, Bukovinski A, Elazomi A, *et al*. A flagellated motile *Salmonella Gallinarum* mutant elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. *Vet. Microbiol*. 2013. 165:425–433.
- Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. 2013. *J. Basic Microbiol*. 53:1– 8.
- Encheva V, Shah HN, Gharbia SE. Proteomic analysis of the adaptive response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to growth under anaerobic conditions. *Microbiology*. 2009;155 (Pt

7):2429-41.

Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA: Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* 2012, 379

Fierer J y Guiney D, Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest*. 2001 Apr 1; 107(7): 775–780.

FoodNet, CDC. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — 10 States, 2009. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2010 Vol. 59 (14):5.

Franklin A, Linne T, Rehbinder V. 1990. Plasmid profile analysis and restriction enzyme fingerprinting of *Salmonella* DO-group strains. *APMIS* 98:665–668.

Fürste JP, Pansegrau W, Frank R, Blöcker H, Scholz P, Bagdasarian M, Lanka E. Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene*. 1986;48(1):119-31.

Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol*. 2001. 167:1882-1885

Gewirtz AT, Siber AM, Madara JL, McCormick BA. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* Typhimurium can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect. Immun*. 1999. 67:608–617.

Gordon MA: Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease: epidemiology, pathogenesis and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* 2011, 24(5):484-489.

Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields P, Bockemühl J, Grimont P, Weill F, Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 2010 161;26-29

Guo S, Alshamy I, Hughes K, Chevance F. Analysis of factors that affect FlgM-dependent Type III secretion for protein purification with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(13), 2333-2347

Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *Journal of Bacteriology*. 1995. 177: 4121–4130.

Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983. 166:557-80.

Haraga A, Ohlson M, Miller S. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*. 2008. 6; 53-66.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng Akira JKS, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001. 410:1099–1103.

Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM: Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* 2011, 8(8):887-900.

Holt KE, Thomson NR, Wain J, Langridge GC, Hasan R, Bhutta ZA, *et al*. Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics*. 2009;10: 36.

Iqbal M, Philbin VJ, Withanage GS, Wigley P, Beal RK, Goodchild MJ, Barrow P, McConnell I, Maskell DJ, Young J, Bumstead N, Boyd Y, Smith AL. Identification and functional characterization of chicken Toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun*. 2005. 73:2344–2350.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields P,

- Weill FX, Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 2014 Sep;165(7):526-30
- Jarrell K, McBride M. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Jun;6(6):466-76.
- Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, *et al.* Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype J *Infect Dis.* 2008. 198 (109-114).
- Jones CJ, Macnab RM, Okino H, Aizawa S. Stoichiometric analysis of the flagellar hook (basal-body) complex of *Salmonella* Typhimurium. *J Mol Biol.* 1990 Mar 20;212(2):377-87. Erratum in: *J Mol Biol* 1990 Sep 20;215(2):331.
- Kaelin WG Jr, Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, Chittenden T, Li Y, Farnham PJ, Blonar MA, Livingston D, Flemington E. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell.* 1992 Jul 24;70(2):351-64.
- Kennedy M, Villar R, Vugia DJ, Rabatsky-Ehr T, Farley MM, Pass M, *et al.* Hospitalizations and deaths due to *Salmonella* infections, FoodNet, 1996-1999. *Clin Infect Dis.* 2004 Apr 15;38 Suppl 3:S142-8.
- Kingsley RA, Msefula CL, Thomson NR, *et al.* Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Res* 2009, 19(12):2279-2287.
- Kisiela DI, Chattopadhyay S, Libby SJ, Karlinsey JE, Fang FC, Tchesnokova V, Kramer JJ, *et al.* Evolution of *Salmonella enterica* virulence via point mutations in the fimbrial adhesin. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002733.
- Lai MA, Quarles EK, Lopez-Yglesias AH, Zhao X, Hajjar AM, Smith KD. Innate immune detection of flagellin positively and negatively regulates *Salmonella* infection. *PLoS One* 2013 Aug 19;8(8):e72047.
- Langridge GC, Fookes M, Connor TR, Feltwell T, Feasey N, Parsons BN, Seth-Smith HM, Barquist L, *et al.* Patterns of genome evolution that have accompanied hostadaptation in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jan 20;112(3):863-8.
- Langridge GC, Nair S, Wain J. Nontyphoidal *Salmonella* serovars cause different degrees of invasive disease globally *J Infect Dis.* 2009. 199; 602-603.
- Langridge GC, Wain J, Nair S. Invasive salmonellosis in humans. In *Secondary*, Vol. 8.6.2.2. e. a.e. A. Bock, ed. ASM Press, Washington, DC. 2008.
- Laughlin RC, Knodler LA, Barhoumi R, Payne HR, Wu J, Gomez G, Pugh R, Lawhon SD, Bäumlér AJ, Steele-Mortimer O, Adams LG, Spatial segregation of virulence gene expression during acute enteric infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio.* 2014 Feb 4;5(1):e00946-13
- Liu Y, Zhang Q, Hu M, Yu K, Fu J, Zhou F, Liu X. Proteomic Analyses of Intracellular *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Reveal Extensive Bacterial Adaptations to Infected Host Epithelial Cells. *Infect Immun.* 2015 Jul;83(7):2897-906.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta CT) method. *Methods.* 2001. 25:402-408.
- Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol.* 2003. 57:77-100.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM: The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 2010, 50(6):882-889.
- Matthews TD, Schmieder R, Silva GGZ, Busch J, Cassman N, Dutilh BE, *et al.* Genomic Comparison of the Closely-Related *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis, Dublin and Gallinarum. *PLoS ONE.* 2015. 10(6): e0126883.
- McClelland M, Sanderson KE, Clifton SW, *et al.* Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet* 2004, 36(12):1268-1274.

- Miao E, Andersen-Nissen E, Warren S, Aderem A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol.* 2007. 29:275–288
- Miao E, Mao D, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang C, Warren S, Leaf I, Aderem A. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:3076–3080
- Minamino T, Yamaguchi S, Macnab RM. Interaction between FliE and FlgB, a proximal rod component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(11):3029-36.
- Minamino T, Macnab RM. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol.* 1999 Mar;181(5):1388-94.
- Minnich SA, Rohde HN. A rationale for repression and/or loss of motility by pathogenic *Yersinia* in the mammalian host. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 603:298-310.
- Müller V, Jones CJ, Kawagishi I, Aizawa S, Macnab RM. Characterization of the *fliE* genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and identification of the FliE protein as a component of the flagellar hook-basal body complex. *J Bacteriol.* 1992 Apr;174(7):2298-304.
- Nuccio SP, Baumler AJ: Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. *MBio* 2014, 5(2).
- Okoro CK, Kingsley RA, Connor TR, *et al*: Intracontinental spread of human invasive *Salmonella Typhimurium* pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat Genet* 2012, 44(11):1215-1221.
- Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesús J, Thomsen LE. The importance of motility and chemotaxis for extra-animal survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Dublin. *J Appl Microbiol.* 2012 Sep;113(3):560-8
- Parkhill J, Dougan G, James KD, *et al*: Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 2001, 413(6858):848-852.
- Porwollik S, Santiviago CA, Cheng P, Florea L, Jackson S, McClelland M. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. *J Bacteriol.* 2005;187(18):6545-55.
- Pullinger GD, Dziva F, Charleston B, Wallis TS, Stevens MP. Identification of *Salmonella enterica* serovar Dublin specific sequences by subtractive hybridization and analysis of their role in intestinal colonization and systemic translocation in cattle. *Infect Immun.* 2008;76(11):5310-21.
- Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio SP, Paixao TA, Butler BP, Chu H, Santos RL, *et al*. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enteric* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe.* 2009. 5:476–486
- Raffatellu M, Wilson RP, Winter SE, *et al*. Clinical pathogenesis of typhoid fever *J Infect Dev Ctries.* 2008. 2:260-266
- Ramachandran G, Perkins D, Schmidlein P, Tulapurkar M and Tennant S. Invasive *Salmonella Typhimurium* ST313 with Naturally Attenuated Flagellin Elicits Reduced Inflammation and Replicates within Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jan; 9(1): e3394.
- Reed KA, Hobert ME, Kolenda CE, Sands KA, Rathman M, O'Connor M, Lyons S, Gewirtz AT, Sansonetti PJ, Madara JL. The *Salmonella Typhimurium* flagellar basal body protein FliE is required for flagellin production and to induce a proinflammatory response in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002 Apr 12;277(15):13346-53.
- Rodriguez I, Rodicio MR, Guerra B, Hopkins KL: Potential international spread of multidrug-resistant invasive *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Emerg Infect Dis* 2012, 18(7):1173-1176.
- Sanchez-Vargas F, Abu-El-Haija M, Gómez-Duarte O, *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease.* 2011 9 263-277
- Santos RL, Raffatellu M, Bevins CL, Adams LG, Tükel C, Tsolis RM, Bäumler AJ. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol.* 2009 Nov;17(11):498-506.
- Sasías S, Betancor L, Martínez A, Maskell D, Chabalgoity A, Yim L. Represión del flagelo en

- Salmonella enterica* serovar Dublin: un mecanismo para promover su diseminación sistémica? XX Congreso Latinoamericano de Microbiología; ALAM 2010
- Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 2006. 1:16-22
- Schmitt CK, Darnell SC, Tesh VL, Stocker BA, O'Brien AD. Mutation of *flgM* attenuates virulence of *Salmonella* Typhimurium, and mutation of *fliA* represses the attenuated phenotype. *J. Bacteriol.* 1994. 176:368–377.
- Schmitt CK, Ikeda JS, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, Weinstein DL, Metcalf ES, O'Brien AD. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect. Immun.* 2001. 69:5619–5625.
- Selander RK, Li J, Boyd EF, Wang FS, Nelson K. DNA sequence analysis of the genetic structure of populations of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* In Priest FG, Ramos-Cormenzana A, and Tindall BJ (ed.), *Bacterial diversity and systematics*. 1994. Plenum Press, New York, N.Y.
- Selander RK, Smith NH, Li J, Beltran P, Ferris KE, Kopecko DJ, Rubin FA. Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar *Salmonella* Dublin. *J. Bacteriol.* 1992. 174:3587–3592.
- Shirai Y, Sunakawa K, Ichihashi Y, Yamaguchi H. A morphological study in germfree mice (*Salmonella* infection). *Exp Pathol (Jena)* 1979. 17: 158-166.
- Sierro F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. 98:13722–13727.
- Soyer Y, Orsi RH, Rodriguez-Rivera LD, Sun Q, Wiedmann M. Genome wide evolutionary analyses reveal serotype specific patterns of positive selection in selected *Salmonella* serotypes. *BMC Evol Biol.* 2009; 9:264.
- Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin pretreated mice. *Infect. Immun.* 2004. 72:4138–4150.
- Tanabe Y, Wada T, Ono K, Abo T, Kutsukake K. The transcript from the $\sigma(28)$ -dependent promoter is translationally inert in the expression of the $\sigma(28)$ -encoding gene *fliA* in the *fliAZ* operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2011 Nov;193(22):6132-41
- Thiennimitr P, Winter S, Baumler AJ. *Salmonella*, the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology.* 2012. 15:108–114
- Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, *et al.* Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 2008 Oct;18(10):1624-37.
- Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, *et al.* Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 2000, 125(2):229-255.
- Vijay-Kumar M, Wu H, Jones R, Grant G, Babbin B, King TP, *et al.* Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am. J. Pathol.* 2006. 169:1686–1700.
- Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, *et al.* Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis* 2004, 38 Suppl 3:S149-156.
- Wangdi T, Winter SE, Bäumlner A. Typhoid fever: "You can't hit what you can't see". *Gut Microbes.* 2012. 3 1-5
- Winter S, Thiennimitr P, Nuccio SP, Haneda T, *et al.* Contribution of Flagellin Pattern Recognition to Intestinal Inflammation during *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Infect Immun.* 2009. 77(5):1904-16
- Winter SE, Keestra AM, Tsoilis RM, Bäumlner AJ. The blessings and curses of intestinal inflammation. *Cell Host Microbe.* 2010^A July 22; 8(1): 36–43.

- Winter SE, Winter MG, Godinez I, Yang HJ, Russmann H, Andrews-Polymenis HL, Baumler AJ. A rapid change in virulence gene expression during the transition from the intestinal lumen into tissue promotes systemic dissemination of *Salmonella*. PLoS Pathog. 2010^B Aug; 6(8): e1001060.
- Wozniak C, Chevance F, Hughes K, Multiple promoters contribute to swarming and the coordination of transcription with flagellar assembly in *Salmonella*. Journal of Bacteriology. 2010. 192:4752–4762
- Yim L, Betancor L, Martínez A, Bryant C, Maskell D, Chabalgoity JA. Naturally occurring motility-defective mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated preferentially from nonhuman rather than human sources. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(21):7740-8.
- Yim L, Betancor L, Martinez A, Giossa G, Bryant C, Maskell D, Chabalgoity JA. Differential phenotypic diversity among epidemic spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from humans or animals. Appl. Environ. Microbiol. 2010. 76:6812–6820.
- Yim L, Sasías S, Martínez A, Betancor L, Estevez V, Scavone P, Bielli A, Sirok A, Chabalgoity JA. Repression of flagella is a common trait in field isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin and is associated with invasive human infections. Infect Immun. 2014 Apr;82(4):1465-76
- Yue M, Han X, De Masi L, Zhu C, Ma X, Zhang J, Wu R, Schmieder R, Kaushik RS, Fraser GP, Zhao S, *et al.* Allelic variation contributes to bacterial_host_specificity. Nat Commun. 2015 Oct 30;6:8754.
- Zeng H, Carlson AQ, Guo Y, Yu Y, Collier-Hyams LS, Madara JL, Gewirtz AT, Neish AS. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. J. Immunol. 2003. 171:3668–3674.
- Zhang S, Adams LG, Nunes J, *et al.* Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis Infect Immun. 2003. 71: 4795-4803.
- Zhao X, Zhang K, Boquoi T, Hu B, Motaleb MA, Miller KA, James ME, Charon NW, Manson MD, Norris SJ, Li C, Liu J. Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi*. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Aug 27;110(35):14390-5.
- Zhao, X, Norris S, Liu J. Molecular Architecture of Bacterial Flagellar Motor in Cells. *Biochemistry*. 2014. 53.27 : 4323–4333

Articles of Significant Interest Selected from This Issue by the Editors

***Salmonella enterica* Serovar Dublin Isolates That Repress Flagella Expression: Mechanism To Promote Invasiveness?**

Salmonella enterica serovar Dublin is adapted to cattle but also infrequently infects humans, causing an invasive disease with high levels of morbidity and mortality. The bacterial factors responsible for this invasive phenotype are unknown. *Salmonella*-induced intestinal inflammatory responses may prevent bacterial dissemination to systemic sites. Yim et al. (p. 1465–1476) report the isolation of several *S. Dublin* strains completely lacking flagella, obtained from human bloodstream infections. These aflagellate isolates were impaired for triggering inflammation in a human intestinal epithelial cell line and in the ceca of mice. These findings suggest that this mechanism for reduced intestinal inflammation may contribute to enhanced systemic dissemination of *S. Dublin*.

CARD9 Is a Critical Signaling Molecule for Innate Host Defense to *Cryptococcus neoformans*

CARD9 is a critical adaptor molecule signaling through C-type lectin receptors. Yamamoto et al. (p. 1606–1615) show that CARD9 knockout mice are highly susceptible to pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. Gamma interferon (IFN- γ) production was strongly reduced on day 3 postinfection in these mice, due to impaired accumulation of IFN- γ -producing NK and memory phenotype T cells. The reduced accumulation of these cells was correlated with lowered CCL4, CCL5, CXCL9, and CXCL10 synthesis. These results suggest that the susceptibility of mice lacking CARD9 to *C. neoformans* infection is likely due to the reduced accumulation of IFN- γ -expressing NK and memory phenotype T cells early in infection.

Type I Interferons Promote Lethal Disease in a Mouse Model of Shock-Like Illness Caused by the Rickettsial Pathogen *Ixodes ovatus Ehrlichia*

Rickettsiae are arthropod-borne intracellular bacteria that cause mild to severe shock-like illnesses. Zhang et al. (p. 1698–1709) demonstrate that *Ixodes ovatus Ehrlichia* infection elicits type I interferons (alpha interferon [IFN- α] and IFN- β), whereas infection with a less virulent strain, *Ehrlichia muris*, does not. Type I interferons promote severe disease and death and suppress IFN- γ production, thought to be essential to control *Ehrlichia* growth. Surprisingly, IFN- γ is dispensable for protection in the absence of type I interferons. These data demonstrate that type I interferon signaling in nonhematopoietic tissues may promote tissue damage and death independent of bacterial growth, revealing a novel mechanism by which type I interferons drive bacterial pathogenesis.

Human Lyme Disease Patients Develop Lasting Strain-Specific Immunity

Many people suffer from Lyme disease on multiple occasions, suggesting that previous exposure to the causative agent *Borrelia burgdorferi* does not elicit a protective immune response. However, a given strain is almost never detected multiple times from the same patient, suggesting that *B. burgdorferi* exposure may elicit strain-specific immunity. Khatchikian et al. (p. 1408–1413) perform an analysis using mathematical and statistical models parameterized with data on the occurrence and frequency of the occurrence of different *B. burgdorferi* strains in human patients. This analysis demonstrates that humans treated for early Lyme disease develop protective immunity that is strain specific and lasts for at least 6 years.

Repression of Flagella Is a Common Trait in Field Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Dublin and Is Associated with Invasive Human Infections

Lucía Yim,^a Sebastián Sasías,^a Araci Martínez,^{a,b} Laura Betancor,^b Verónica Estevez,^a Paola Scavone,^c Alejandro Bielli,^d Alfredo Sirok,^e José Alejandro Chabalgoity^a

Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^a; Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^b; Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay^c; Área de Histología y Embriología, Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay^d; Departamento de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública, Montevideo, Uruguay^e

The nontyphoidal *Salmonella enterica* serovar Dublin is adapted to cattle but infrequently infects humans, very often resulting in invasive infections with high levels of morbidity and mortality. A *Salmonella*-induced intestinal acute inflammatory response is postulated as a mechanism to prevent bacterial dissemination to systemic sites. In *S. enterica* serovar Typhimurium, flagella contribute to this response by providing motility and FliC-mediated activation of pattern recognition receptors. In this study, we found 4 *Salmonella enterica* isolates, with the antigenic formula 9,12:–:–, that, based on *fliC* sequence and multilocus sequence type (MLST) analyses, are aflagellate *S. Dublin* isolates. Interestingly, all were obtained from human bloodstream infections. Thus, we investigated the potential role of flagella in the unusual invasiveness exhibited by *S. Dublin* in humans by analyzing flagellation and proinflammatory properties of a collection of 10 *S. Dublin* human clinical isolates. We found that 4 of 7 blood isolates were aflagellate due to significantly reduced levels of *fliC* expression, whereas all 3 isolates from other sources were flagellated. Lack of flagella correlated with a reduced ability of triggering interleukin-8 (IL-8) and CCL20 chemokine expression in human intestinal Caco-2 cells and with reduced early inflammation in the ceca of streptomycin-pretreated C57/BL6 mice. These results indicate that flagella contribute to the host intestinal inflammatory response to *Salmonella* serovar Dublin and suggest that their absence may contribute to its systemic dissemination through dampening of the gut immune response. Analysis of FliC production in a collection of cattle isolates indicated that the aflagellate phenotype is widely distributed in field isolates of *S. Dublin*.

Salmonellosis by nontyphoidal salmonellae (NTS) is among the most common food-borne infections worldwide, with an estimated global incidence of 93.8 million cases of gastroenteritis and 155,000 deaths per year (1). Among the >2,500 serotypes assigned to the species *Salmonella enterica*, those able to cause disease in humans are divided into typhoidal serotypes (mainly Typhi and Paratyphi A) and hundreds of NTS serotypes, among which the most prevalent worldwide are Enteritidis and Typhimurium (2, 3). The typhoidal serotypes are restricted to the human host and cause invasive disease in immunocompetent individuals, while NTS typically have a broad vertebrate host range and cause predominantly a self-limiting gastroenteritis, characterized by acute intestinal inflammation and diarrhea, in humans. However, depending on the immune status of the host and the serovar and particular strain involved, NTS can enter the bloodstream and cause systemic disease. In addition, NTS are consistently the most common bacteria isolated from the bloodstream in both adults and children presenting with fever in sub-Saharan Africa, and this is associated with HIV, malaria, and malnutrition (4). In Uruguay, from a total of 495 NTS clinical isolates received at the National *Salmonella* Centre (NSC) from 2008 to 2012, 96 (19.4%) were obtained from bloodstream infections (NSC, unpublished data).

When the invasive index is considered, i.e., the percentage of blood isolates relative to the total number of isolates for each *Salmonella* serovar in a defined geographical region, it becomes evident that certain NTS serovars are more invasive than others (2,

5, 6). This is the case for *Salmonella* serovars Dublin and Choleraesuis, which are consistently reported worldwide, with invasive indexes of >40%, while the invasive indexes of the more ubiquitous *Salmonella* serovars Enteritidis and Typhimurium rarely exceed 5% (2, 5, 7, 8).

S. enterica serovar Dublin (formula 1,9,12 [Vi]:g,p:–) is strongly adapted to cattle, where it causes systemic infections and abortion (9). However, human infections with *S. Dublin* occur at low frequency, and these are often severe and may be fatal, especially in AIDS patients and other immunocompromised persons (10–12). The bacterial factors responsible for this invasive phenotype of *S. Dublin* in humans are unknown.

The difference in clinical outcome between typhoidal salmonellae and NTS is thought to be due partly to the way both groups of serovars interact with the gut epithelium, with the NTS causing an acute local inflammatory reaction with a strong neutrophil influx that prevents systemic spread of the bacteria (2, 13, 14).

Received 17 October 2013 Returned for modification 8 November 2013
Accepted 8 January 2014

Published ahead of print 13 January 2014

Editor: A. J. Bäuml

Address correspondence to Lucía Yim, lyim@higiene.edu.uy.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.01336-13

TABLE 1 S. Dublin field isolates used in this study

Isolate	Yr of isolation	Source ^b	Patient information ^b
Human isolates ^a			
SDu1	1995	Blood	ND
SDu2	2004	Blood	ND
SDu3	2006	Blood	Female, 41 years old, asthmatic, diabetic
SDu4	2008	Blood	Young man, drug addict
SDu5	2000	Feces	ND
SDu6	2005	Feces	Male, 40 years old
SDu7	2008	Blood	Male, 1 year old
SDu8	2011	Blood	Male, 76 years old
SDu9	2011	Blood	Female, 50 years old
SDu10	2011	Urine	Male
Bovine isolates			
75/95	1995	ND	
56/96	1996	Calf lymph	
57/96	1996	Calf lung	
69/96	1996	Calf	
72/96	1996	Calf	
73/96	1996	Bile	
74/96	1996	Liver	
75/96	1996	Calf	
76/96	1996	Calf	
79/98	1998	ND	
210/00	2000	Calf	
73/04	2004	Calf	
74/04	2004	Calf	
75/04	2004	Calf	
99/04	2004	Fetus	

^a All human isolates were of ST10 according to MLST.

^b ND, no data are available.

For *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, several bacterial factors have been described as important for triggering the inflammatory response at the gut in calves and streptomycin-pretreated mice, including SPI-1 (15–17) and SPI-2 (18–20) effectors and flagella (21, 22).

The flagellin protein (FliC) is the main structural component of the flagellar filament and is also the agonist of the pattern recognition receptors Toll-like receptor 5 (TLR5) and Naip5/NLRC4 (23–27). In model human intestinal epithelia, it has been demonstrated that *S. Typhimurium* FliC binding to TLR5 triggers a proinflammatory response characterized by upregulation of expression of interleukin 8 (IL-8), CCL20 (macrophage inflammatory protein 3 α [MIP-3 α]), and several other proinflammatory chemokines (25, 28) that recruit neutrophils and dendritic cells into the subepithelial compartment (29, 30). *In vivo*, it has been reported that in streptomycin-pretreated mice, *S. Typhimurium* flagellin knockout mutants trigger diminished intestinal inflammation compared to that with wild-type bacteria at early time points postinfection (p.i.) (21, 31). Similar findings were obtained with calf ligated ileal loops (22, 32) and chickens (33). Interestingly, a mechanism has been described for the invasive serovar *S. Typhi* through which *fliC* expression is repressed when the bacterium encounters conditions of tissue osmolarity (but not the higher osmolarity present in the intestinal lumen), thus enabling it to overcome the mucosal barrier at the intestine through innate immunity evasion (34).

TABLE 2 Strain constructs used in this study

Strain	Description
SDu5 <i>fliC::kan</i>	SDu5 derivative containing <i>fliC::kan</i> (Kan ^r)
SDu3 Str ^r	SDu3 derivative containing <i>aadA</i> (Str ^r)
SDu5 Str ^r	SDu5 derivative containing <i>aadA</i> (Str ^r)
SDu5 Str ^r <i>fliC::kan</i>	SDu5 derivative containing <i>aadA</i> and <i>fliC::kan</i> (Kan ^r Str ^r)

The aim of this work was to elucidate bacterial factors responsible for the unusual invasiveness exhibited by *S. Dublin* in humans, focusing on the role of flagella. Thus, we characterized the motility, flagellar expression, and proinflammatory properties of a set of *S. Dublin* clinical isolates obtained at different times and from invasive or localized infections and evaluated the correlation between flagellar expression and the source of the isolate (blood versus nonblood). Our results revealed the existence of a large proportion of aflagellate strains among the clinical isolates of this serovar, a phenotype that correlated with impaired proinflammatory properties *in vitro* and *in vivo*. Note that all aflagellate strains were isolated from invasive cases of salmonellosis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media, and growth conditions. Uruguayan clinical isolates of *S. Dublin* were obtained from the NSC and the Bacteriology Unit of the Ministry of Public Health (MPH) collections (Table 1). These were all the human isolates of this serovar available in both collections and included seven isolated from blood and three from other sources (feces or urine). “Invasive” cases were defined as those in which *Salmonella* had been isolated from the bloodstream. An isolate obtained from urine was not considered invasive because we lacked the clinical data to distinguish between invasive infection and colonization or contamination of urine. Where available, data about the patients from whom the isolates were obtained are depicted in Table 1.

S. Dublin cattle isolates were obtained from the NSC and are shown in Table 1. All isolates were confirmed biochemically and serologically at the NSC and the Bacteriology Unit of the MPH. In those cases where no agglutination with anti-H serum was obtained, the sequence of the *fliC* hypervariable region was determined using primers Gfor and Grev (see Table 3) and compared with those available at the GenBank database to confirm the Dublin serotype. In addition, multilocus sequence typing (MLST) was performed as described at <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Enterica/documents/primersEnterica.html> (35).

The hypervariable *fliC* sequences of the aflagellate *S. Dublin* isolates described in this study were identical to those of the two sequenced *S. Dublin* strains available in the GenBank database (strains CT_02021853 and SD3246) and differed in three single nucleotide polymorphisms (SNPs) from the same region of *S. Enteritidis* strain P125109, whose complete genome is also available in GenBank. Moreover, MLST analysis revealed that all 10 *S. Dublin* human isolates used in this study belong to ST10 (Table 1), which is the predominant ST reported for *S. Dublin* (35).

Luria-Bertani (LB) broth and LB agar (Sigma) were used for routine cultures of *S. Dublin* at 37°C in an orbital shaking incubator (200 rpm). Isolates were stored in replicates at –80°C in LB broth containing 25% glycerol.

Bacterial constructs are depicted in Table 2. An SDu5 derivative *fliC* knockout mutant was constructed by P22 transduction of a *fliC::kan* cassette from *S. Enteritidis* strain PT4 P125109 *fliC::kan* (36). The resulting strain, SDu5 *fliC::kan*, was resistant to kanamycin and lacked motility, as verified by plating on soft agar and microscopic visualization.

For animal studies, field isolates were made streptomycin resistant by P22 phage transduction of the *aadA* gene from the streptomycin-resistant *S. Typhimurium* strain SL1344 (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/>). The resulting strains were able to grow in 500 μ g/ml

TABLE 3 Primers used in this study

Primer	Sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Reference
Gfor	GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG	509	58
Grev	AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG		
icdA F	TGGTATCGGTGTTGATGTCACCT	140	Modified from reference 59
icdA R	CATCCTGGCCGTAACCTGTGTG		
fliA F	GCATCGAACTGGTACTGAAGAAC	149	59
fliA R	GAGCTCTTCTGGTAATACAGCGT		
fliC F	AGATCACCTTAGCTGGCAAAACC	164	This work
fliC R	CCCCAGAGAAGAACGAAGCTGC		
mB-actin_F	GCTTCTTTGACGCTCCTTCGT	68	60
mB-actin_R	CGTCATCCATGGCGAACTG		
mCXCL1_F	CTTGGTTTCAGAAAATTGTCCAAAA	84	60
mCXCL1_R	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT		
mIL-17A_F	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	69	60
mIL-17A_R	GGGTCTTCATTGCGGTGG		
mIFNg_F	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA	143	61
mIFNg_R	CCGCTTCTGAGGCTGGAT		
mCCL20_F	TTTGGGATGGAATTGGACAC	69	60
mCCL20_R	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC		
mTNFalfa_F	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	63	60
mTNFalfa_R	CCTCCACTGGTGGTTTGCT		
mLcn2_F	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT	89	62
mLcn2_R	TCTGATCCAGTAGCGACAGC		
mS100.A9_F	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	95	62
mS100.A9_R	TGTCATTATGAGGGCTTCATTT		

of streptomycin and were verified by anti-O-antigen serum agglutination and motility testing. In addition, growth curves were performed to verify that genetic manipulation did not affect the growth properties of the original isolates. An SDu5 *fliC::kan* derivative of the previously constructed streptomycin-resistant SDu5 strain was obtained by P22 transduction. The resulting strain was resistant to kanamycin and lacked motility; the rest of the analyzed parameters (growth rate and O-antigen agglutination) were unchanged compared to those of the parental strain.

For mouse infection experiments, bacteria were grown overnight (o/n) at 200 rpm and 37°C in LB broth containing 50 µg/ml of streptomycin; the o/n cultures were diluted 1:20 in the same medium plus 0.3 M NaCl and subcultured for 4 h with mild aeration (100 rpm).

Motility tests. Motility tests were performed as described by Yim et al. (37). Briefly, 2 µl of overnight culture grown in LB broth was spotted onto the surface of an LB plate containing 0.3% agar (semisolid agar) and incubated for 6 h at 37°C. Those isolates showing no halo of growth (indistinguishable from a *fliC* knockout strain) were considered nonmotile. Values are expressed as diameters of growth (in mm) obtained after 6 h of incubation at 37°C. The assays were repeated three times, and the results were confirmed by phase-contrast microscopic visualization of mid-log-phase bacterial cultures grown in LB broth.

Protein analysis. For preparation of total protein extracts, log-phase bacterial cultures (optical density at 600 nm [OD₆₀₀] = 0.4 to 0.6) were centrifuged, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.15 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.5 mM EDTA, sonicated, and centrifuged again to remove unbroken cells. The supernatants (cleared lysates) were quantified by the Bradford assay (Sigma).

For Western blot analysis, 25 µg of total protein extract was loaded onto a 12% SDS-PAGE gel and analyzed by Western blotting using mouse anti-flagellar antigen Hg antibody (Bio-Stat, United Kingdom) and ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare). As an internal control, an anti-DnaK monoclonal antibody was used (AbCam, United Kingdom).

Flagellar staining. For detection of flagella in live cells, we performed a previously described method using Alexa Fluor 594-carboxylic acid succinimidyl ester (Molecular Probes), an amino-specific fluorescent dye

(37). Briefly, overnight cultures of bacteria grown in LB broth at 37°C and 200 rpm were diluted 1/100 in fresh medium and grown under the same conditions to mid-log phase (OD₆₀₀ = 0.4 to 0.6). The protocol was then followed exactly as described previously (37). The samples were visualized on an Olympus FV300 confocal laser scanning microscope with Fluoview software 4.3, a 100× oil immersion objective (numerical aperture [NA] = 1.35), and 543/610-nm excitation/emission wavelengths. A minimum of 10 fields were recorded for each isolate, using an image size of 1,024 by 1,024 pixels in the x-y plane, with a pixel size of 70 nm. Images were deconvolved with Huygens Professional software.

Cell lines, media, and growth conditions. The human colon carcinoma Caco-2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The cells were maintained in minimal essential medium with Earle's salts (high glucose; 4.5 g/liter) (PAA Laboratories) supplemented with 2 mM L-glutamine and 20% fetal calf serum (FCS) at 37°C in 5% CO₂, at up to 80% confluence.

The Caco-Rumbo reporter cell line consists of the Caco-2 cell line stably transfected with a plasmid harboring the luciferase gene under the control of the human *CCL20* promoter (38) and was kindly provided by J. C. Sirard (Université de Lille Nord, France). It was cultured in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; PAA Laboratories) supplemented with 10% FCS, 1 mM sodium pyruvate, 1× nonessential amino acids, and 0.7 mg/ml G418 (Invitrogen) at 37°C in 5% CO₂.

Analysis of the nucleotide sequence of *fliC* and its promoter region. To analyze the nucleotide sequence of *fliC* and its promoter region, we purified genomic DNA from overnight bacterial cultures grown in LB by using a DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen). One hundred nanograms of this DNA was used as the template to PCR amplify a 1,713-bp region comprising the entire *fliC* coding sequence, as well as 152 bp upstream from the start codon and 42 bp downstream from the stop codon, using primers *fliC1* and *fliC4* (Table 3), and the resulting amplicon was sequenced using primers *fliC1*, *fliC2*, *fliC3*, and *fliC4*.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR). For bacterial mRNA quantifications, strains were grown to mid-log phase and total RNA was extracted using an RNeasy minikit (Qiagen), with a pretreatment with RNAProtect bacterial reagent (Qiagen). One microgram of this RNA was

treated with DNase (Invitrogen) and reverse transcribed using Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Invitrogen) and random primers in a 20- μ l reaction mixture, and 2 μ l of a 1/32 dilution of this reaction mixture was used for real-time PCR using Sybr green (QuantiTect; Qiagen) in a Corbett thermocycler. Primer sequences used are presented in Table 3. The cycling program was as follows: 15 min at 95°C and 45 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 57°C, and 30 s at 72°C. For the analysis, we used the comparative threshold cycle (C_T) method for relative mRNA quantitation (39). Briefly, the C_T obtained for the *fliC* or *fliA* gene was normalized to the C_T obtained for *icdA* in each sample, giving the ΔC_T ($\Delta C_T = C_T$ for *fliC* or *fliA* - C_T for *icdA*). The corresponding $2^{-\Delta C_T}$ value was calculated for each strain, and the $2^{-\Delta C_T}$ values were compared to the $2^{-\Delta C_T}$ value obtained for an arbitrary selected motile reference strain (SDu5) to obtain the fold variation in mRNA abundance of the sample relative to the reference (fold variation = $2^{-\Delta C_T}$ for sample/ $2^{-\Delta C_T}$ for reference). Each isolate was assayed in triplicate. Non-reverse-transcribed controls rendered no detectable C_T values or were amplified at least 10 cycles later than the corresponding reverse-transcribed samples.

For Caco-2 mRNA quantifications, cells were infected with log-phase bacteria at a multiplicity of infection (MOI) of \sim 30:1, the plates were centrifuged for 5 min at 200 \times g, and invasion was allowed to proceed for 1 h at 37°C in 5% CO₂. After three PBS washes, gentamicin (100 μ g/ml)-containing medium was added for 1.5 h. The antibiotic concentration was then changed to 10 μ g/ml, and the cells were incubated for an additional 1.5 h. At 3 h postinfection, the cells were gently washed 3 times with prewarmed PBS and resuspended in TRIzol (Invitrogen) for extraction of total RNA. After reverse transcription with random hexamers and real-time PCR using specific primers, C_T values were normalized to the values for the 18S rRNA gene and referred to values for uninfected cells. Total RNA extraction, reverse transcription, and qRT-PCR were carried out as previously reported (36).

For mRNA quantification in the ceca of infected mice, fractions of the middle cecum were immediately removed after sacrifice, embedded in TRIzol (Invitrogen), and stored at -80°C. For total RNA extraction, the samples were homogenized using an Ultraturax instrument, and then the protocol indicated by the manufacturer was followed. One microgram of the resulting RNA was treated with DNase and reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase as described above. Two microliters of a 1/5 dilution of this reaction mixture was used for real-time PCR using Sybr green (QuantiTect; Qiagen) in an ABI 7400 thermocycler (Applied Biosystems). Primer sequences used are shown in Table 3; the final concentration of primers in the reaction mixture was 0.9 μ M. The cycling program was as follows: 15 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. We applied the C_T method for relative mRNA quantitation using the β -actin housekeeping gene, and the mRNA levels for each group of infected mice were referred to the levels obtained for the uninfected (streptomycin-pretreated) group. The experiment was done two times, using five animals per group each time.

Luciferase assays. The Caco-Rumbo cell line was stimulated with log-phase bacteria at an MOI of \sim 100 to 200:1, and the infection was allowed to proceed similarly to that described for Caco-2 mRNA measurements. At 6 h p.i., the luciferase activity in cell extracts was measured using the One Glo luciferase assay (Promega) and a Luminoskan Ascent microplate luminometer (Thermo Scientific). Purified FliC (1.0 μ g/ml) from *S. Typhimurium*, generously provided by J. C. Sirard, was used as a positive control. The luminescence obtained for the stimulated cells was normalized to the luminescence obtained for the unstimulated cells, with the latter value set to 1. Each isolate was assayed in quadruplicate.

Animal experiments. Animal experiments were performed as described by Barthel et al. (40). Briefly, groups of five 6- to 8-week-old female C57BL/6 mice (provided by the National Division of Veterinary Laboratories, Uruguay) were pretreated with 25 mg of streptomycin 24 h prior to infection with \sim 5 \times 10⁷ CFU of the indicated bacterial strain. At 24 h p.i., mice were sacrificed, and fractions of the distal cecum were embedded in OCT compound (Sakura), immediately frozen in liquid

nitrogen, and stored at -80°C. Cecal pathology was evaluated in hematoxylin and eosin (H&E)-stained cryosections (5 to 8 μ m thick), in a blinded manner, by following exactly the histopathological score scheme described by Stecher et al. (21). The parameters evaluated were destruction of the epithelial cell layer, submucosal edema, reduction in number of goblet cells, and infiltration of polymorphonuclear (PMN) cells. In addition, fractions of the middle cecum were immediately removed after sacrifice, embedded in TRIzol (Invitrogen), and stored at -80°C for subsequent total RNA extraction and qRT-PCR analysis as described above. Bacterial loads in ceca and spleens were analyzed by homogenizing the organ contents in PBS containing 0.5% Tergitol and plating appropriate dilutions on MacConkey agar plates containing 50 μ g/ml streptomycin.

Experiments with animals were performed according to national guidelines for animal experimentation that meet the international guiding principles for biomedical research involving animals, and all protocols were approved by the university ethics committee.

Statistical analysis. For analysis of differences in motility, transcriptional responses to infection of Caco-2 cells, and *fliC* mRNA levels, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple-comparison posttest was used (GraphPad Prism 4.0 software), with *P* values of <0.05 considered to be statistically significant. For analysis of differences in transcriptional responses to infection of mice, we used the Mann-Whitney U test (GraphPad Prism 4.0 software), with *P* values (two-tailed) of <0.05 considered to be statistically significant.

RESULTS

Motility characterization of *S. Dublin* clinical isolates and determination of flagellar expression. Ten *S. Dublin* isolates recovered from human sources in Uruguay from 1995 to 2011 were evaluated (Table 1). These were all *S. Dublin* human isolates available in the two national *Salmonella* collections.

Four of the 10 analyzed isolates were nonmotile (Fig. 1A), and all of these were isolated from blood. In order to evaluate flagellation, we performed fluorescence microscopic analysis of two selected isolates (SDu3 and SDu5, which are nonmotile and motile, respectively) stained with an amino-specific fluorescent dye. The peritrichous flagellar filaments of isolate SDu5 were readily visualized, while no filaments at all were observed in SDu3 (Fig. 1B). Furthermore, Western blotting revealed undetectable levels of flagellin in total bacterial extracts of the nonmotile isolates (Fig. 1C), indicating that the absence of flagella was due to reduced flagellin synthesis or increased degradation, not to defects in export of subunits or in filament assembly. To gain further information about this phenotype, we quantified *fliC* mRNA levels by qRT-PCR analysis of a selected set of isolates (SDu1 to SDu7). The results indicated that the levels of *fliC* mRNA were significantly reduced in the nonmotile isolates compared to the motile ones (about 50- to 100-fold reductions) (Fig. 1D), which is consistent with the hypothesis of reduced flagellin synthesis. Interestingly, the complete nucleotide sequences of *fliC* and its promoter region in isolates SDu1 to SDu7 were identical (data not shown). We also quantified the mRNA levels for *fliA*, coding for the sigma factor responsible for transcription of flagellar class III genes (which include *fliC* [41]), in isolates SDu1 to SDu7 (Fig. 1D). There were no significant differences among isolates, suggesting that the repression occurred at the last level of the flagellar regulatory hierarchy.

To investigate the reversibility of the nonmotile phenotype, we performed successive daily passages of the SDu3 isolate in semi-solid agar, but this strain did not recover motility, at least after 12 passages, suggesting an irreversible mechanism.

In summary, all these results indicate that the absence of motility observed in *S. Dublin* blood isolates is due to a significant

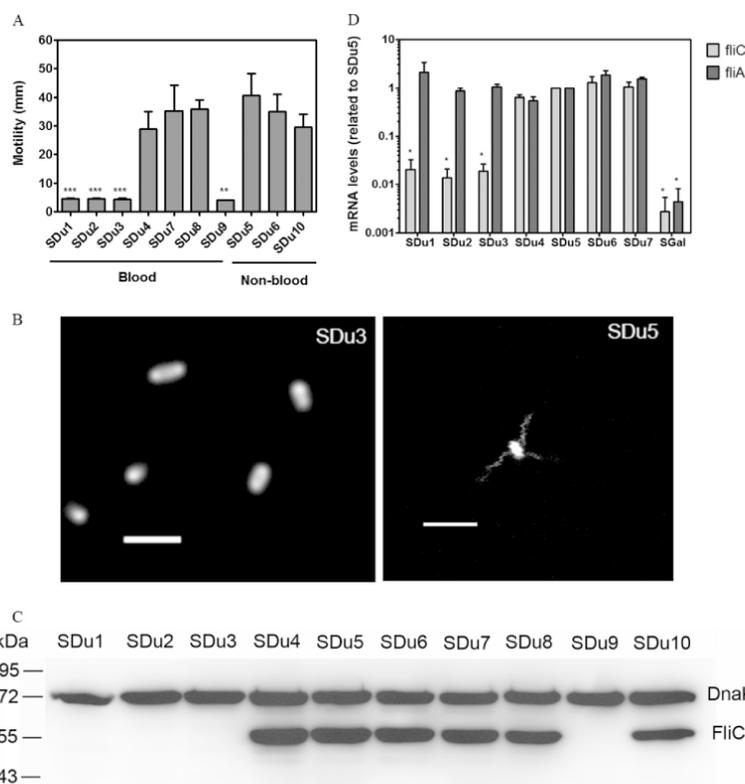


FIG 1 (A) Motility measurement of *S. Dublin* isolates. The diameter of the halo of growth (in mm) after 6 h at 37°C is plotted for each isolate. Results (means and standard deviations [SD]) from three independent experiments are shown. Asterisks indicate significant differences relative to SDu5. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. (B) Fluorescence labeling of flagellar filaments in live cells of isolates SDu3 and SDu5. Bars, 2 μm . (C) Western blot analysis of total protein extracts of *S. Dublin* isolates grown in LB to mid-log phase, using anti-flagellin antibody. Detection of DnaK was used to verify equal loading of samples. Sizes of molecular mass markers are indicated in kDa. (D) *fliC* and *fliA* mRNA level quantification in *S. Dublin* isolates grown in LB to mid-log phase. Results (means and standard errors [SE]) from three independent experiments are shown. *, significant difference relative to SDu5 ($P < 0.05$). SGal is a strain of the aflagellate serovar *S. Gallinarum*.

reduction in *fliC* expression which results in impaired synthesis of flagellin and, consequently, a lack of flagellar filaments at the bacterial surface.

***In vitro* evaluation of the proinflammatory properties of *S. Dublin* clinical isolates.** Since *Salmonella* flagellin is regarded as the major proinflammatory determinant in epithelial cells (28, 42), and because all four aflagellate strains were isolated from invasive infections, we hypothesized that the lack of flagella would impair the proinflammatory properties of *S. Dublin* on the gut epithelium, therefore promoting its systemic dissemination. First, we sought to determine if the different *S. Dublin* isolates would trigger different proinflammatory responses in model human epithelia. Thus, we quantified the mRNA levels for *IL-8* and *CCL20* in cultured intestinal epithelial Caco-2 cells infected with four selected *S. Dublin* isolates (two aflagellate and two flagellated isolates) and compared them to the levels in uninfected cells. While the two flagellated isolates elicited transcriptional induction of *IL-8* and *CCL20* in Caco-2 cells, the two aflagellate isolates failed to do so (Fig. 2A). We further analyzed the induction of *CCL20* expression in Caco-2 cells in response to infection by all *S. Dublin* isolates by using a *CCL20*-luciferase reporter cell line. As expected, a *fliC* knockout mutant triggered no luciferase activity (Fig. 2B). A

perfect correlation between the presence of flagellin in *S. Dublin* isolates and upregulation of expression from the *CCL20* promoter was found (compare Fig. 2B with Fig. 1C), suggesting that repression of *fliC* expression in aflagellate *S. Dublin* isolates is maintained during interaction with epithelial cells. Quantification of *fliC* mRNA levels in *S. Dublin* isolates incubated in the presence of Caco-2 cells by qRT-PCR confirmed this suggestion (data not shown).

Evaluation of the proinflammatory properties of *S. Dublin* clinical isolates *in vivo*. Results of *in vitro* studies showed a correlation between FliC production and induction of the intestinal epithelial proinflammatory gene program and indicated that the lack of *fliC* expression observed when *S. Dublin* isolates were grown in LB broth remained in the presence of epithelial cells. To evaluate if these phenotypes were reproduced *in vivo*, we analyzed proinflammatory gene expression and histological pathology in the ceca of streptomycin-pretreated mice 24 h after oral infection with two selected *S. Dublin* isolates (one nonflagellated and one flagellated isolate) and compared the results to those for mock-infected animals. We decided to analyze the ceca of streptomycin-pretreated mice because severe pathological inflammatory changes are restricted to this organ (40). We selected the time point of 24 h

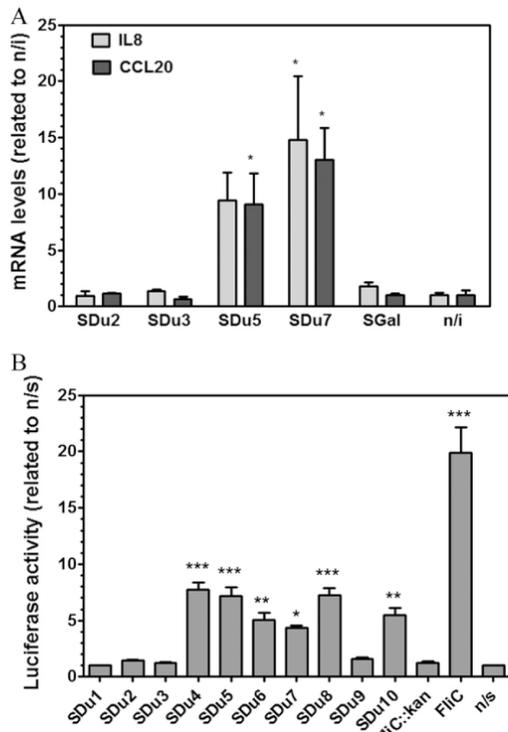


FIG 2 (A) Analysis of the Caco-2 transcriptional response to infection by *S. Dublin* flagellated or aflagellate isolates. Caco-2 cells were infected with isolate SDu2, SDu3, SDu5, or SDu7, and at 3 h p.i., the levels of mRNA transcripts for CCL20 and IL-8 were measured by qRT-PCR. SGal is a strain of the aflagellate serovar *S. Gallinarum*. n/i, noninfected cells. *, statistical difference relative to noninfected cells ($P < 0.05$). Means and SE for two independent experiments are shown. (B) Analysis of Caco-2 transcriptional response (*CCL20* expression) to infection by all *S. Dublin* clinical isolates. Purified *S. Typhimurium* flagellin (FliC) and an SDu5 derivative *fliC* knockout mutant (*fliC::kan*) were used as positive and negative controls, respectively; induction was performed for 6 h. Luciferase activity was determined and normalized to the activity obtained for the nonstimulated control (n/s), with this value considered to be 1. Means and SE for one representative experiment performed in quadruplicate are shown. Asterisks indicate significant differences relative to the nonstimulated control. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

postinfection because it has been shown that the differences in pathology caused by a nonflagellated mutant of *S. Typhimurium* compared to the wild type are more pronounced at early times p.i. (21). Both *S. Dublin* isolates efficiently colonized the cecum within 24 h p.i. (for SDu3, $1.97 \times 10^9 \pm 5.14 \times 10^8$ CFU/g of cecum content; and for SDu5, $1.32 \times 10^9 \pm 3.24 \times 10^8$ CFU/g of cecum content), and no statistically significant differences in bacterial numbers were observed between the isolates. Mice infected with the flagellated isolate SDu5 showed a dramatic and statistically significant increase in cecal mRNA levels for IL-17 (70-fold), keratinocyte-derived chemokine (encoded by *Kc*, the murine homologue of human *IL-8*) (56-fold), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (27-fold), and gamma interferon (IFN- γ) (470-fold) compared to mock-infected animals (Fig. 3A). Infection with the aflagellate isolate SDu3 also elicited significant induction of expression of IL-17 (2-fold), *Kc* (4-fold), TNF- α (3.6-fold), and IFN- γ (15-fold) compared to the case in mock-infected mice, in-

dicating that despite the absence of flagella and motility, the SDu3 isolate was still able to elicit an innate immune response. However, the increases in the cecal mRNA levels for all four cytokines were significantly lower than those elicited by infection with SDu5. SDu3 bacteria recovered from the cecum contents of infected mice were still devoid of motility (data not shown), supporting the hypothesis that the aflagellate phenotype is maintained during interaction with host tissues. In contrast to the observation in cell culture, Mip-3a (*Ccl20*) expression was not significantly induced in the ceca of streptomycin-pretreated mice infected with either *S. Dublin* isolate (Fig. 3A). Although this may be considered surprising, because it is postulated that induction of CCL20 production may contribute to orchestrating host responses during *Salmonella* infection through dendritic cell recruitment to the follicle-associated epithelium, similar results were indeed previously reported by Winter et al. (32).

Other genes involved in defense responses, such as those encoding antimicrobial peptides and proteins, have also been reported to be induced in the murine intestine upon *S. Typhimurium* infection (43). Thus, we also quantified the mRNA levels for two antimicrobial proteins involved in iron and zinc deprivation, i.e., lipocalin-2 (encoded by *Lcn2*) and calprotectin (one of whose subunits is encoded by *S100.a9*), respectively. Transcript levels for lipocalin-2 were significantly upregulated in the ceca of mice infected with the flagellated isolate (29-fold) compared to those of uninfected mice, whereas those animals infected with the aflagellate isolate did not show significant upregulation of this antimicrobial protein (Fig. 3B). Concerning *S100.A9*, its expression was significantly induced in mice infected with both isolates relative to that in mock-infected animals, but the induction was significantly lower with SDu3 (22-fold) than with SDu5 (1,441-fold).

Cecal pathology in *S. Dublin*-infected animals was also analyzed by scoring the signs of inflammation in H&E-stained cryosections. Despite the similar colonization levels, mice infected with SDu5 developed a severe colitis at 24 h p.i., with high levels of PMN cell recruitment, epithelial damage, and submucosal edema, whereas the ceca of SDu3-infected mice showed milder signs of inflammation (Fig. 4A and B). Taken together, these results suggest that lack of flagella results in *S. Dublin* isolates still being able to trigger intestinal proinflammatory and antimicrobial responses *in vivo*, but this ability is severely impaired compared to the responses induced by flagellated isolates.

In order to verify if flagellation was the underlying cause of the observed differences in mucosal innate immune responses elicited by isolates SDu5 and SDu3, we constructed an isogenic mutant of SDu5 carrying *fliC* inactivated by a kanamycin cassette and tested it in the mouse model of colitis. Since *S. Dublin* has monophasic flagella, inactivation of the *fliC* gene renders it a completely aflagellate strain. Similar to the previously tested isolates, the mutant strain efficiently colonized the ceca of infected mice within 24 h p.i. ($1.09 \times 10^9 \pm 2.86 \times 10^8$ CFU/g of cecum content). As shown in Fig. 3A and B, the aflagellate SDu5 mutant induced significantly less cecal proinflammatory and antimicrobial gene expression than the parental strain. Moreover, there were no significant differences between cecal mRNA levels for *Kc*, IFN- γ , *Lcn2*, and *S100.A9* in mice infected with SDu5 *fliC::kan* and those infected with SDu3, indicating that the aflagellate phenotype results in impaired proinflammatory properties regardless of the genetic background. In addition, the ceca of mice infected with the SDu5 *fliC::kan* mutant revealed no significant pathological

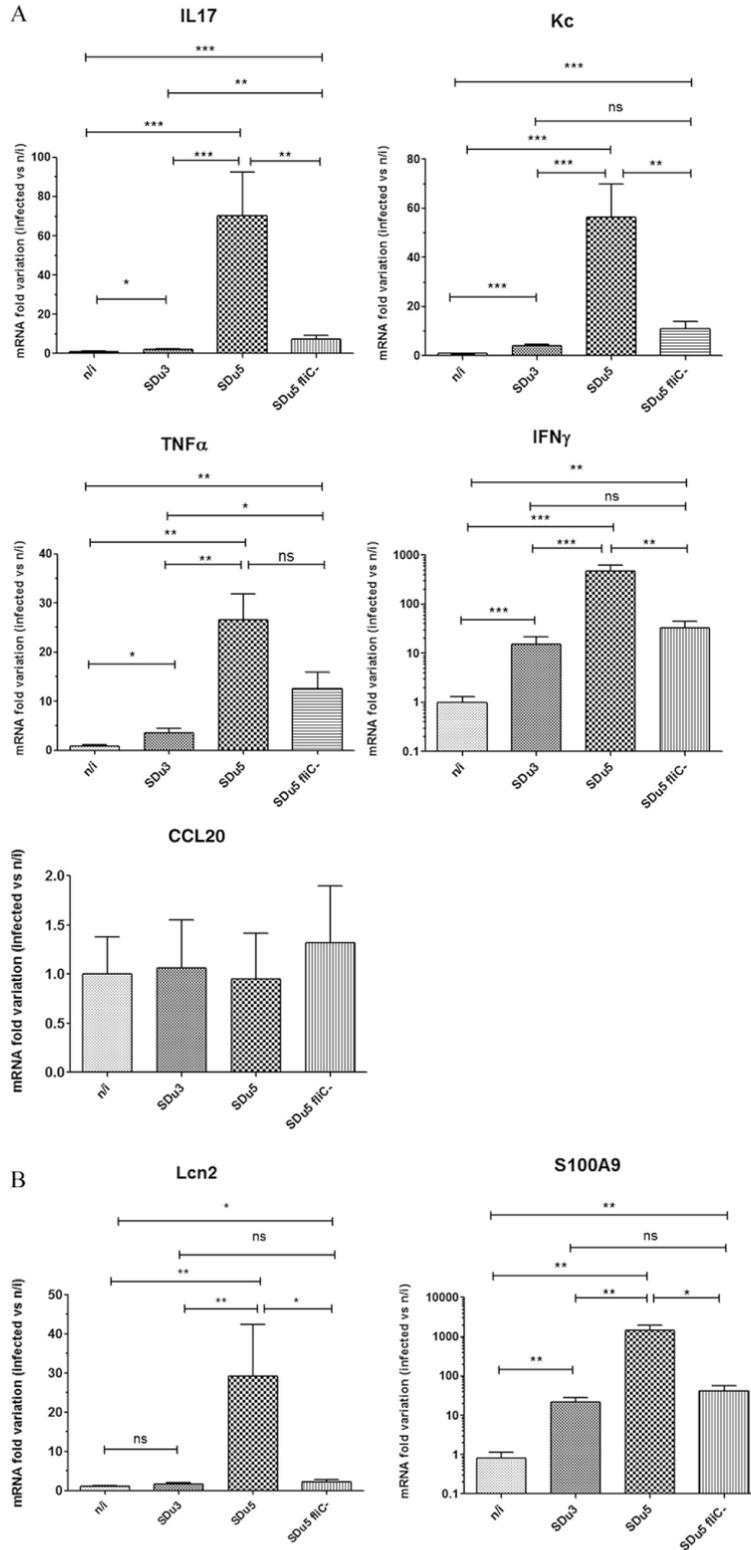


FIG 3 mRNA variation at 24 h p.i. in the cecal mucosa of mice infected with *S. Dublin*, determined by qRT-PCR. Values are expressed as fold changes of mRNA levels for the indicated genes in infected mice relative to their levels in mock-infected animals. Note that the y axes of the IFN- γ and S100A9 graphs show log₁₀ values. Means and SE for two independent experiments, with five animals per group in each experiment, are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not statistically significant. (A) mRNA quantification of genes coding for proinflammatory cytokines and chemokines. (B) mRNA quantification of genes coding for antimicrobial proteins.

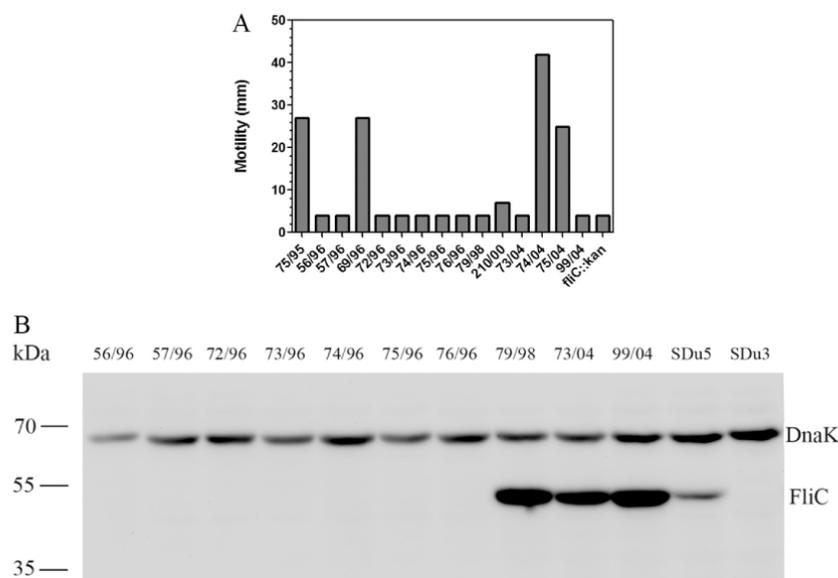


FIG 5 (A) Motility analysis of 15 isolates of *S. Dublin* obtained from cattle. An SDu5 derivative *fliC* knockout mutant (*fliC::kan*) was included as a negative control. (B) Western blotting of total protein extracts from the 10 nonmotile *S. Dublin* isolates obtained from cattle, using a specific anti-FliC antibody. Detection of DnaK was used to verify equal loading of samples. Sizes of molecular mass markers are indicated in kDa.

that *S. Typhimurium* flagella contribute to early cecal inflammation, predominantly by providing motility, and promote enhanced bacterial growth by allowing *S. Typhimurium* to benefit from the nutrients released in the inflamed intestine (21, 48). However, the systemic infection which occurred parallel to the enterocolitis did not depend significantly on flagellum function (21). More recently, Winter and colleagues reported that *S. Typhimurium* flagellin pattern recognition contributes to initiating inflammatory responses in the bovine ileal mucosa but not the mouse mucosa (32).

Most studies have been conducted using artificially constructed mutants of *S. Typhimurium* and animal models, mainly murine models, and little is known about the role of flagella in naturally occurring isolates of less prevalent *Salmonella* serovars. In this work, we report that 4 of 10 human isolates and 7 of 15 cattle isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin lack flagella, are therefore nonmotile, and have the antigenic formula 9,12:–:–. These isolates had a *fliC* hypervariable region sequence identical to that of *S. Dublin* strains available in the GenBank database and belonged to the same ST as most *S. Dublin* isolates worldwide (ST10), and they were therefore confirmed as belonging to this serovar. The lack of flagella in human isolates was due to an impaired *fliC* expression that resulted in undetectable levels of FliC protein in total bacterial extracts. However, comparative analysis of the nucleotide sequence of *fliC* and its promoter region between flagellated and nonflagellated isolates revealed no differences, nor did the mRNA levels coding for FliA, the alternate sigma factor responsible for *fliC* transcription. These results suggest that the repression of flagellar gene expression occurs at the last level of the regulatory cascade and may be associated with impairment of the synthesis/stability of FliA or its interaction with FlgM, the corresponding anti-sigma factor (41).

It has been reported that the TviA protein of *S. Typhi*, encoded

in SPI-7, is able to repress *fliC* expression under tissue osmolarity conditions (34). We previously analyzed the SDu1 to SDu3 and SDu5 isolates by comparative genomic hybridization using a *Salmonella* pan-array, but no signal for *tviA* was detected in the genomes of these isolates (49). This indicates that a different mechanism mediates *fliC* repression in *S. Dublin*.

In a previous work, we found that among a collection of 266 *S. Enteritidis* field isolates, 27% of the strains were nonmotile (37). This percentage included strains that had structurally normal but paralyzed flagella, meaning that the percentage of aflagellate isolates was even lower. The results presented in this work showing 11 aflagellate strains among 25 field isolates (considering human and cattle isolates together) of *S. Dublin* indicate an unusually high frequency of naturally occurring aflagellate isolates in this *Salmonella* serovar.

Lack of flagella does not seem to be a specific trait of *S. Dublin* field isolates from Uruguay. Selander et al. reported that all but 1 of 114 nonmotile isolates of serotype 1,9,12:–:– recovered from cattle and swine in the United States in 1988 and 1989 were Du1 (the major type of electrophoretic type assigned for *S. Dublin* according to multilocus enzyme electrophoresis [MLEE] analysis) and had been identified provisionally as *S. Dublin* at the National Veterinary Services Laboratories (50). Similarly, Franklin et al. reported that five 1,9,12:–:– *Salmonella* isolates recovered from cattle in Sweden were identified as *S. Dublin* based on restriction plasmid profiles (51). Taken together, these results support the hypothesis of a nonessential role for flagella in the infectious cycle of *S. Dublin*. In line with this, a previous study using a *fliC* transposon mutant showed that flagella play a minor role in extra-animal survival of *S. Dublin*, a feature considered important for zoonotic pathogens (52). More recently, the same group investigated the role of flagella during *S. Dublin* infection in the murine model, using the *fliC* knockout mutant to-

gether with the wild-type parental strain in coinfection assays (53). They found that 4 to 5 days after oral infection, the *fliC* mutant was recovered from the spleens of infected animals in significantly smaller numbers than those of the wild type, but this difference was modest, and no effect was observed after intraperitoneal challenge. The authors concluded that these small differences were sufficient enough to provide the selective force for stable maintenance of the flagellar apparatus in this serovar. To our knowledge, no studies have addressed the role of *S. Dublin* flagella during infection in cattle, the natural host, but results of the present study indicate that 7 of 15 isolates recovered from cattle were indeed nonflagellated. Based on the results of others and the present study, it is tempting to speculate that the flagellar apparatus may be suffering a process of loss in this serovar, maybe because its function is not essential for the infectious cycle or its absence is advantageous under specific circumstances. Notably, the aflagellate phenotype we observed in *S. Dublin* clinical isolates was irreversible in semi-solid agar, an environmental condition where the selective pressure is in favor of a motile phenotype. Moreover, it remained during bacterial interaction with cultured epithelial cells and host tissues, suggesting that *fliC* expression is permanently repressed in these isolates and is not due to a regulatory mechanism specific for a particular environmental condition.

Host-restricted and host-adapted serovars seem to have lost gene functions that were previously active in their broad-host-range ancestors, and they are generally more prone to cause invasive disease than ubiquitous serovars (9, 54, 55). Indeed, we have shown by comparative genomics that *S. Dublin* has a larger number of pseudogenes than its close relative but ubiquitous serovar *S. Enteritidis* (49). Moreover, *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum*, a serovar closely related to *S. Dublin* and *S. Enteritidis* that is avian restricted and causes an invasive typhoid-like disease in chickens, is nonflagellated due to pseudogene accumulation in flagellar genes (54). It has been postulated that the lack of flagella may promote *S. Gallinarum*'s ability to disseminate systemically by avoiding the flagellin-TLR5-induced proinflammatory responses in the gut (56). Consistent with this hypothesis, Iqbal et al. reported that an aflagellate *S. Typhimurium fliM* mutant established early enhanced systemic infection in chickens, as well as inducing less IL-1 β mRNA and PMN cell infiltration at the gut during the early stages of infection than the wild type (33). Conversely, a flagellated mutant of *S. Gallinarum* colonized efficiently and caused pathological changes in the ceca of infected birds, as well as producing less mortality than the wild-type strain (57). Similarly, for *S. Typhi*, a molecular mechanism mediated by *TviA* has been described that represses *fliC* expression when the bacterium encounters human tissue osmolarity, i.e., during interaction with the epithelium, where it could be sensed by pattern recognition receptors (34). In the same study, the authors reported that an *S. Typhimurium* mutant expressing *tviA* (which is normally absent in this serovar) induced lower levels of CXCL-1 chemokine expression than the wild type in human model epithelia and showed more invasiveness in an avian model of infection (34). In the present work, we showed that *S. Dublin* isolates lacking flagella were not able to induce the expression of the CCL20 and IL-8 chemokines in cultured human intestinal epithelial cells, confirming the results obtained by Eaves-Pyles et al. (42) (i.e., similar to what has been described for *S. Typhimurium*, *FliC* is also the main determinant in *S. Dublin* for induction of these chemokines in

intestinal epithelial cells). In addition, a naturally aflagellate isolate as well as a flagellin knockout mutant caused milder pathological changes and significantly less proinflammatory cytokine and antimicrobial gene expression in the ceca of infected mice than a flagellated isolate at early phases of infection. These data indicate, as reported for *S. Typhimurium* (21), that *S. Dublin* flagella are necessary for efficient induction of early cecal inflammation in streptomycin-pretreated mice.

In spite of the remarkably different mucosal responses elicited by SDu3 and SDu5, no significant differences were observed in their ability to colonize the spleens of infected animals. This result is consistent with those obtained by Stecher et al. (21), who reported that a nonflagellated mutant of *S. Typhimurium* caused significantly reduced levels of cecal inflammation but showed no differences in mesenteric lymph node (MLN), liver, and spleen colonization compared to the wild-type strain in the mouse model of colitis. These results strengthen the notion that the streptomycin-pretreated model is not suitable for studying the correlation between intestinal inflammatory responses and translocation of *Salmonella* to internal organs, since NTS rapidly disseminate to the liver and spleen of mice, establishing a systemic infection that resembles typhoid, regardless of the intestinal inflammatory response generated (34).

Interestingly, all aflagellate clinical isolates included in this study were recovered from invasive cases of salmonellosis (i.e., were isolated from blood), whereas all nonblood isolates harbored flagella. Thus, it is tempting to speculate that in *S. Dublin*, the lack of flagella promotes systemic dissemination in the human host through dampening of the gut immune response. Confirmation of such a hypothesis would require analysis of a larger collection of human isolates obtained at a worldwide level. Note that isolates SDu4, SDu7, and SDu8 were isolated from blood yet harbored flagella and were motile. However, these strains were isolated from a drug-addicted individual, a toddler, and an elderly person, respectively, suggesting that in these cases the immune status of the host may have influenced the disease outcome.

In summary, the data presented here indicate that the aflagellate phenotype is frequent among field isolates of *S. Dublin* and renders strains significantly less proinflammatory than flagellated ones. The fact that all aflagellate isolates recovered from humans were isolated from invasive infections suggests that this phenotype may render strains more prone to systemic dissemination in humans. Our data also indicate that the aflagellate phenotype is a consequence of abrogated *fliC* but not *fliA* transcription and is irreversible in the *S. Dublin* blood isolates studied here. The molecular mechanism responsible for such a phenotype is currently being investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Manja Barthel and Bärbel Stecher (ETH, Zurich, Switzerland) for excellent training in the streptomycin-pretreated mouse model of *Salmonella colitis*. We also thank Jean Claude Sirard (Université Lille Nord de France) for providing cell lines and purified *FliC*. Gabriela Algorta and Teresa Camou are acknowledged for providing isolates from the NSC collection and the MPH, respectively.

This work was supported by Programa CSIC I+D 2010 (Universidad de la República, Uruguay).

REFERENCES

1. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. 2010. The global burden of nontyphoidal

- Salmonella gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 50:882–889. <http://dx.doi.org/10.1086/650733>.
2. Langridge GC, Wain J, Nair S. 2008. Invasive salmonellosis in humans. *EcoSal Plus* <http://dx.doi.org/10.1128/ecosalplus.8.6.2.2>.
 3. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM. 2011. Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2009. *Foodborne Pathog. Dis.* 8:887–900. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>.
 4. Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. 2012. Invasive non-typhoidal Salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* 379:2489–2499. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61752-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61752-2).
 5. Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M, Hurd S, Medus C, Cronquist A, Angulo FJ. 2008. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J. Infect. Dis.* 198:109–114. <http://dx.doi.org/10.1086/588823>.
 6. Wollin R. 2007. A study of invasiveness of different Salmonella serovars based on analysis of the Enter-net database. *Euro Surveill.* 12:E070927.3.
 7. Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ. 2004. Invasive Salmonella infections in the United States, FoodNet, 1996–1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin. Infect. Dis.* 38(Suppl 3):S149–S156. <http://dx.doi.org/10.1086/381581>.
 8. Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi AC, Dias AM, Almeida IA, Melo LC. 2006. Salmonella serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996–2003. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 48:179–184. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652006000400001>.
 9. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesu J, Platt DJ, Olsen JE. 2000. Host adapted serotypes of Salmonella enterica. *Epidemiol. Infect.* 125:229–255. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268899004379>.
 10. Fang FC, Fierer J. 1991. Human infection with Salmonella dublin. *Medicine (Baltimore)* 70:198–207.
 11. Salmon-Ceron D, Detruichis P, Jaccard A, Lepout C, Karam-Sarkis D, Rosenbaum W, Meyohas MC, Coulaud JP, Vilde JL. 1992. Non-typhic Salmonella bacteremias in HIV infections. Clinical and therapeutic data, and course in 68 patients. *Presse Med.* 21:847–851.
 12. Levine WC, Buehler JW, Bean NH, Tauxe RV. 1991. Epidemiology of nontyphoidal Salmonella bacteremia during the human immunodeficiency virus epidemic. *J. Infect. Dis.* 164:81–87. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/164.1.81>.
 13. Wangdi T, Winter SE, Baumler AJ. 2012. Typhoid fever: “you can’t hit what you can’t see.” *Gut Microbes* 3:88–92. <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.18602>.
 14. Tsolis RM, Young GM, Solnick JV, Baumler AJ. 2008. From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:883–892. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2012>.
 15. Tsolis RM, Adams LG, Ficht TA, Baumler AJ. 1999. Contribution of Salmonella typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* 67:4879–4885.
 16. Zhang S, Santos RL, Tsolis RM, Stender S, Hardt WD, Baumler AJ, Adams LG. 2002. The Salmonella enterica serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect. Immun.* 70:3843–3855. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.7.3843-3855.2002>.
 17. Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD. 2004. Role of the Salmonella pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in Salmonella enterica subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect. Immun.* 72:795–809. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.2.795-809.2004>.
 18. Coburn B, Li Y, Owen D, Vallance BA, Finlay BB. 2005. Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect. Immun.* 73:3219–3227. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.6.3219-3227.2005>.
 19. Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M, Stallmach T, Hensel M, Pfeffer K, Akira S, Hardt WD. 2005. The Salmonella pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow Salmonella serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J. Immunol.* 174:1675–1685.
 20. Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhor K, Li Y, Finlay BB. 2005. Analysis of the contribution of Salmonella pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect. Immun.* 73:7161–7169. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.11.7161-7169.2005>.
 21. Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. 2004. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect. Immun.* 72:4138–4150. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004>.
 22. Schmitt CK, Ikeda JS, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, Weinstein DL, Metcalf ES, O'Brien AD. 2001. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect. Immun.* 69:5619–5625. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.9.5619-5625.2001>.
 23. Apel D, Surette MG. 2008. Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778:1851–1858. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.005>.
 24. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng Akira JKS, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099–1103. <http://dx.doi.org/10.1038/35074106>.
 25. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* 167:1882–1885.
 26. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat. Immunol.* 7:569–575. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1344>.
 27. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong YN, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F. 2011. The NLR4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature* 477:596–600. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10510>.
 28. Zeng H, Carlson AQ, Guo Y, Yu Y, Collier-Hyams LS, Madara JL, Gewirtz AT, Neish AS. 2003. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella. *J. Immunol.* 171:3668–3674.
 29. Gewirtz AT, Siber AM, Madara JL, McCormick BA. 1999. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to Salmonella typhimurium can be uncoupled from bacterial internalization. *Infect. Immun.* 67:608–617.
 30. Sierro F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, Sirard JC. 2001. Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:13722–13727. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.241308598>.
 31. Vijay-Kumar M, Wu H, Jones R, Grant G, Babbitt B, King TP, Kelly D, Gewirtz AT, Neish AS. 2006. Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am. J. Pathol.* 169:1686–1700. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.060345>.
 32. Winter SE, Thiennimitr P, Nuccio SP, Haneda T, Winter MG, Wilson RP, Russell JM, Henry T, Tran QT, Lawhon SD, Gomez G, Bevins CL, Russmann H, Monack DM, Adams LG, Baumler AJ. 2009. Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during Salmonella enterica serotype Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 77:1904–1916. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01341-08>.
 33. Iqbal M, Philbin VJ, Withanage GS, Wigley P, Beal RK, Goodchild MJ, Barrow P, McConnell I, Maskell DJ, Young J, Bumstead N, Boyd Y, Smith AL. 2005. Identification and functional characterization of chicken Toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 73:2344–2350. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.4.2344-2350.2005>.
 34. Winter SE, Winter MG, Godinez I, Yang HJ, Russmann H, Andrews-Polymenis HL, Baumler AJ. 2010. A rapid change in virulence gene expression during the transition from the intestinal lumen into tissue promotes systemic dissemination of Salmonella. *PLoS Pathog.* 6:e1001060. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001060>.
 35. Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S. 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in Salmonella enterica. *PLoS Pathog.* 8:e1002776. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>.

36. Yim L, Betancor L, Martinez A, Giossa G, Bryant C, Maskell D, Chabalgoity JA. 2010. Differential phenotypic diversity among epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from humans or animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:6812–6820. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00497-10>.
37. Yim L, Betancor L, Martinez A, Bryant C, Maskell D, Chabalgoity JA. 2011. Naturally occurring motility-defective mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated preferentially from nonhuman rather than human sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7740–7748. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05318-11>.
38. Nempont C, Cayet D, Rumbo M, Bompard C, Villeret V, Sirard JC. 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J. Immunol.* 181:2036–2043.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25:402–408. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
40. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Russmann H, Hardt WD. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun.* 71:2839–2858. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.5.2839-2858.2003>.
41. Chevance FF, Hughes KT. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:455–465. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1887>.
42. Eaves-Pyles T, Murthy K, Liaudet L, Virag L, Ross G, Soriano FG, Szabo C, Salzman AL. 2001. Flagellin, a novel mediator of *Salmonella*-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J. Immunol.* 166:1248–1260.
43. Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio SP, Paixao TA, Butler BP, Chu H, Santos RL, Berger T, Mak TW, Tsois RM, Bevins CL, Solnick JV, Dandekar S, Baumler AJ. 2009. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe* 5:476–486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.011>.
44. Duan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G. 2013. Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* 53:1–8. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201100335>.
45. Lockman HA, Curtiss R, 3rd. 1990. *Salmonella typhimurium* mutants lacking flagella or motility remain virulent in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 58:137–143.
46. Schmitt CK, Darnell SC, Tesh VL, Stocker BA, O'Brien AD. 1994. Mutation of *flgM* attenuates virulence of *Salmonella typhimurium*, and mutation of *fliA* represses the attenuated phenotype. *J. Bacteriol.* 176:368–377.
47. Lai MA, Quarles EK, Lopez-Yglesias AH, Zhao X, Hajjar AM, Smith KD. 2013. Innate immune detection of flagellin positively and negatively regulates *Salmonella* infection. *PLoS One* 8:e72047. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072047>.
48. Stecher B, Barthel M, Schlumberger MC, Haberli L, Rabsch W, Kremer M, Hardt WD. 2008. Motility allows *S. Typhimurium* to benefit from the mucosal defence. *Cell. Microbiol.* 10:1166–1180. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01118.x>.
49. Betancor L, Yim L, Martinez A, Fookes M, Sasias S, Schelotto F, Thomson N, Maskell D, Chabalgoity JA. 2012. Genomic comparison of the closely related *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Dublin. *Open Microbiol. J.* 6:5–13. <http://dx.doi.org/10.2174/1874285801206010005>.
50. Selander RK, Smith NH, Li J, Beltran P, Ferris KE, Kopecko DJ, Rubin FA. 1992. Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar *Salmonella dublin*. *J. Bacteriol.* 174:3587–3592.
51. Franklin A, Linne T, Reh binder V. 1990. Plasmid profile analysis and restriction enzyme fingerprinting of *Salmonella* DO-group strains. *APMIS* 98:665–668. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1699-0463.1990.tb04986.x>.
52. Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesus J, Thomsen LE. 2012. The importance of motility and chemotaxis for extra-animal survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Dublin. *J. Appl. Microbiol.* 113:560–568. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05363.x>.
53. Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesus J, Rosenkranz J, Chadfield MS, Thomsen LE. 2013. The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar *S. Typhimurium*. *BMC Microbiol.* 13:67. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-13-67>.
54. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B, Ormond D, Abdellah Z, Brooks K, Cherevach I, Chillingworth T, Woodward J, Norberczak H, Lord A, Arrowsmith C, Jagels K, Moule S, Mungall K, Sanders M, Whitehead S, Chabalgoity JA, Maskell D, Humphrey T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G, Parkhill J. 2008. Comparative genome analysis of *Salmonella enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 18:1624–1637. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.077404.108>.
55. Baumler AJ, Tsois RM, Ficht TA, Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 66:4579–4587.
56. Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, Wigley P. 2000. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology* 146:3217–3226.
57. de Freitas Neto OC, Setta A, Imre A, Bukovinski A, Elazomi A, Kaiser P, Berchieri A, Jr, Barrow P, Jones M. 2013. A flagellated motile *Salmonella Gallinarum* mutant (SG Fla+) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. *Vet. Microbiol.* 165:425–433. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.015>.
58. Herrera-Leon S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA. 2004. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42:2581–2586. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.6.2581-2586.2004>.
59. Cummings LA, Wilkerson WD, Bergsbaken T, Cookson BT. 2006. In vivo, *fliC* expression by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted. *Mol. Microbiol.* 61:795–809. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05271.x>.
60. Muñoz N, Van Maele L, Marques JM, Rial A, Sirard JC, Chabalgoity JA. 2010. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect. Immun.* 78:4226–4233. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00224-10>.
61. Marques JM, Rial A, Munoz N, Pellay FX, Van Maele L, Leger H, Camou T, Sirard JC, Benecke A, Chabalgoity JA. 2012. Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN-gamma-mediated immunity. *Immunobiology* 217:420–429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.10.012>.
62. Muñoz N. 2013. Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como base para nuevas inmunoterapias contra *Streptococcus pneumoniae*. Ph.D. thesis. Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.