

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de dos cepas atenuadas de "Salmonella enterica serovar choleraesuis" como vehículos para vacunas de ADN y expresión de un antígeno modelo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Almira Bartolomé Ayarza

Director

Gustavo Domínguez Bernal

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Tesis Doctoral

DESARROLLO DE DOS CEPAS ATENUADAS DE *Salmonella enterica*
serovar *Choleraesuis* COMO VEHÍCULOS PARA VACUNAS DE ADN Y
EXPRESIÓN DE UN ANTÍGENO MODELO

Almira Bartolomé Ayarza

Madrid, octubre de 2010



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Gustavo Domínguez Bernal, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA

Que el trabajo de Tesis titulada: **“Desarrollo de dos cepas atenuadas de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis como vehículos para vacunas de ADN y expresión de un antígeno modelo”** que presenta la Licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid D^a Almira Bartolomé Ayarza para optar al Título de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y cumple las condiciones exigidas para optar al Título de Doctora por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que así conste, a todos los efectos, firmo la presente en Madrid, a 30 de octubre de 2010.

Fdo.: Gustavo Domínguez Bernal

A Fernando y mis padres

“Lo pasado ha huido, lo que esperas está ausente, pero el presente es tuyo”

(Proverbio árabe)

Agradecimientos

Alguien dijo que, creer posible algo es hacerlo cierto y en mi caso, la persona que creyó en este proyecto y me hizo partícipe de él ha sido Gustavo, muchas gracias por ello.

Gracias a Aldara, Alberto Tiérrez y Toño por su inestimable ayuda y participación en este trabajo. He perdido la cuenta de las horas pasadas en el animalario con Aldara, somos el tándem exterminador de *mickey mouses*.

Estos años no habrían sido iguales sin Alberto, Sonia, Susana, Pilarín, Aldara, Chris, María y nuestra vecina de laboratorio, Lara, sois, sin duda alguna, lo mejor que me llevo de estos 5 años. Mil gracias por ayudarme, escucharme y por los buenos momentos pasados.

También quiero dar las gracias al resto de componentes de INBAVET, Ricardo y Santa, por su amabilidad e interés. A Rocío y Elena por su ayuda técnica, así como a Jorge y Cristina, por su colaboración durante el último año.

Muchas gracias a Claudio Fiocchi y Piero Mastroeni, que me dejaron formar parte de sus equipos de investigación y me permitieron trabajar con fantásticos profesionales como Gail, Halibde, Sean, Heitor y Carole.

El Departamento de Sanidad Animal no sería lo mismo sin Reyes, que es como un oráculo, con todas las respuestas para los difíciles asuntos de papeleo y, sin Eva, que nos permite trabajar en un territorio salubre, aunque algunos miembros del departamento no se lo pongan fácil, Dios, a veces no sabes si estás en el baño de mujeres o en la depuradora de la M-30.

Si hay alguien realmente importante, cuyo apoyo ha sido fundamental en estos años de tesis, son mis padres, que siempre me han enseñado que el trabajo y determinación son fundamentales para conseguir cualquier meta. Gracias también a mis padres políticos, que más que suegros son un tesoro, siempre dispuestos a ayudar y, por supuesto a Fernando, por su apoyo, cariño y paciencia, estos años de doctorado han sido mucho más llevaderos gracias a su comprensión, gracias por estar siempre ahí pese a la distancia.

Me encantaría recordar a mis amigos de siempre, sobre todo a Víctor, compañero insustituible desde el instituto, que fue el primero que me animó a hacer un doctorado y por supuesto a Angélica, Isa,

Miriam, Rosa, Esther e Irene, gracias por estar siempre ahí y, a mis compañeros y compañeras del club del corredor, César, Dani, Vicente, Vane, María, Isa, Miguel, Mariano, Unai, Carmen, Javi, Woody, José Luis, Salva, Juanjo, ... que me han ayudado a afrontar el estrés, a superarme (quién me iba a decir que acabaría una media maratón) y a sentirme un poco menos culpable cuando como palmeras de chocolate.

Finalmente, aunque no menos importantes, quisiera agradecer a todos y cada uno de mis antiguos jefes y compañeros del CNB, que me permitieron trabajar en este complicado mundo que es la ciencia y me abrieron las puertas a un trabajo bastante poco explorado por la clase veterinaria, gracias por todo lo que me habéis enseñado y los buenos ratos juntos: Pilar, Blanca, Domingo, Ana Clara, Anita, Zaira, Mónica, Miriam, Álvaro, Isa, Isabela y Carmen.

Índice

Listado de figuras.....	13
Listado de tablas.....	15
Listado de abreviaturas.....	16
Resumen.....	19
Summary.....	21

1.	INTRODUCCIÓN	<i>pág.</i> 23
1	El género <i>Salmonella</i>	25
2	Impacto y epidemiología de la salmonelosis.....	26
3	Patogenia de la salmonelosis.....	27
4	Bases genéticas de la patogenicidad de <i>Salmonella</i> ..	30
5	Vacunas frente a <i>Salmonella spp</i>	54
6	Inversión de la patogenicidad, uso de la maquinaria de <i>Salmonella</i> con fines terapéuticos	56
7	Nuevas mejoras en la utilización de <i>Salmonella</i> como vehículo vacunal.....	60
8	Problemas que puede conllevar el uso de <i>Salmonella</i> como vehículo vacunal y sus posibles soluciones.....	61
2.	OBJETIVOS	65
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	69
1.	Material biológico.....	71
2	Medios, soluciones y condiciones de cultivo.....	72
3	Genética bacteriana.....	73
4	Técnicas de biología molecular.....	77
5	Técnicas de biología celular.....	81
6	Ensayos <i>in vivo</i> utilizando animales de experimentación.....	86
7	Técnicas utilizadas para medir la respuesta inmune.	90
8	Otras técnicas.....	93

4.	RESULTADOS	97
	CAPÍTULO 1.....	99
1.	Introducción.....	101
2.	Resultados.....	103
	<u>Construcción de cepas vivas atenuadas de <i>S. Choleraesuis</i></u>	103
	<u>Valoración de la bioseguridad de las nuevas cepas construidas</u>	104
3.	Discusión.....	114
	CAPÍTULO 2.....	121
1.	Introducción	123
2.	Resultados.....	124
	<u>Construcción del vector específico de liberación del antígeno</u>	124
	<u>Estabilidad <i>in vitro</i> del vector pCMV::3XFLAGm2A en <i>Salmonella</i></u>	125
	<u>Estabilidad <i>in vivo</i> del vector pCMV::3XFLAGm2A en <i>Salmonella</i></u>	126
	<u>Análisis de los niveles de expresión del antígeno modelo 3XFLAG vehiculado como vacuna de ADN por Δ<i>phoP</i> y Δ<i>rpoS</i> en macrófagos murinos</u>	127
	<u>Evaluación de la respuesta inmunológica de la vacuna de ADN vehiculada por Δ<i>phoP</i> y Δ<i>rpoS</i> usando 3XFLAG como antígeno modelo</u>	128
3.	Discusión	133
	CAPÍTULO 3	137
1.	Introducción	139
2.	Resultados.....	141
	<u>Optimización de las cepas vivas atenuadas de <i>S. Choleraesuis</i> como vehículos vacunales mediante la inserción de la secuencia antigénica en el cromosoma bacteriano fusionada a los promotores de los genes <i>ssaG</i> y <i>pagC</i></u>	141
	<u>Optimización de <i>S. Choleraesuis</i> como vehículo vacunal</u>	

	<u>para la expresión de antígenos heterólogos mediante la búsqueda de promotores inducidos <i>in vivo</i>.....</u>	142
	<u>Evaluación de la respuesta inmunogénica del epítipo heterólogo 3XFLAG vehiculado por <i>ΔphoP</i> y <i>ΔrpoS</i> a partir de <i>P_{paqC}</i> o <i>P_{ssaG}</i>.....</u>	143
3.	Discusión.....	148
5.	CONCLUSIONES.....	155
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	159
	ANEXO I.....	188
	ANEXO II.....	196
	ANEXO III.....	200

LISTADO DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Invasión del intestino por parte de <i>Salmonella</i> y su diseminación sistémica.....	45
---	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

Figura 1. Comprobación de la construcción de las cepas nulas en <i>phoP</i> y <i>rpoS</i>	103
--	-----

Figura 2. Curvas de crecimiento de <i>S. Choleraesuis</i> WT y sus mutantes $\Delta rpoS$ y $\Delta phoP$, cultivadas en LB a 37°C durante 24 h	104
---	-----

Figura 3. Aspecto de cultivos primarios de fibroblastos porcinos obtenidos a partir de explantes de mucosa de íleon, el sexto día de cultivo.....	107
--	-----

Figura 4. Índice de proliferación en cultivos primarios de macrófagos intestinales porcinos (SIM).....	108
---	-----

Figura 5. Persistencia intracelular a las 24 h post-infección de <i>S. Choleraesuis</i> WT, $\Delta rpoS$ y $\Delta phoP$ en el interior de macrófagos procedentes de cultivos primarios de intestino delgado de lechones.....	108
---	-----

Figura 6. Estimación del número de bacterias intracelulares en el interior de fibroblastos primarios procedentes de intestino de lechón	111
--	-----

Figura 7. Inmunofluorescencia y contraste de fase de cultivos primarios de fibroblastos intestinales de cerdo infectados por el serovar <i>Choleraesuis</i> y los mutantes isogénicos $\Delta rpoS$ y $\Delta phoP$	111
--	-----

CAPÍTULO 2

Figura 1. Esquema resumen de la estrategia que se va a desarrollar en este capítulo.....	124
Figura 2. Cassette 3XFLAG.....	125
Figura 3 Representación esquemática de la estabilidad de pCMV::3XFLAGm2A en <i>S. Choleraesuis</i> WT, Δ <i>rpoS</i> , Δ <i>phoP</i> y SC-54 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	126
Figura 4. Expresión de 3XFLAG en J774.A1.....	127
Figura 5. Niveles séricos de IgG anti- <i>Salmonella</i> y anti-3XFLAG.....	129
Figura 6. Niveles intestinales de IgA anti- <i>Salmonella</i> y anti-3XFLAG	131
Figura 7. Producción de γ -IFN tras re-estimular con 3XFLAG esplenocitos obtenidos a partir de ratonas inmunizadas.....	132

CAPÍTULO 3

Figura 1. Comprobación mediante PCR del etiquetado obtenido por la incorporación de 3XFLAG en <i>pagC</i> o <i>ssaG</i> ...	141
Figura 2. Niveles de las proteínas SsaG o PagC en <i>S. Choleraesuis</i> tras la infección de células dendríticas murinas.....	143
Figura 3. Niveles séricos de IgG anti- <i>Salmonella</i> y anti-3XFLAG.....	145
Figura 4. Niveles intestinales de IgA anti- <i>Salmonella</i>	146

LISTADO DE TABLAS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1

Tabla 1. Índice de competición de las cepas atenuadas en ratones BALB/c.....	105
Tabla 2. Índice de competición de las cepas atenuadas en nódulos mesentéricos de lechón.....	106

ANEXO I

Tabla A1. Estirpes bacterianas.....	190
Tabla A2. Plásmidos utilizados.....	192
Tabla A3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	193
Tabla A4. Oligonucleótidos para la realización de RT-qPCR.....	194

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ara4N	4-aminoarabinósido
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
BGA	Ágar verde brillante
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>cat</i>	Gen de resistencia a cloranfenicol
cm	centímetros
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
<i>col.</i>	colaboradores
<i>Dam</i>	Enzima ADN adenina metilasa
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle modificado por Dubelcco
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FBS	Suero fetal bovino
<i>FLP</i>	Enzima flipasa
g/l	Gramos por litro
h	Horas
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico
IC	Índice de competición
IFN- γ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-8	Interleucina 8
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
<i>iNOS</i>	Enzima óxido nítrico sintetasa
i.p	Administración intraperitoneal
Ipro	Índice de proliferación
LB	Medio de cultivo Luria y Bertani

Lgp1	Glicoproteína lisosomal 1 ("Lysosomal glycoprotein 1")
LPS	Lipopolisacárido
LNM	Linfonódulo mesentérico
ml	Mililitro
m.o.i	Multiplicidad de infección
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
<i>pag</i>	Genes activados por PhoP ("PhoP-activated genes")
PBS	Fosfato salino tamponado
PCR	Reacción en cadena de la enzima polimerasa
pg/ml	Picogramos por mililitro
p.i.	Postinfección
P_{pagC}	Promotor del gen <i>pagC</i>
<i>prg</i>	Genes reprimidos por PhoP ("PhoP-repressed genes")
P_{ssaG}	Promotor del gen <i>ssaG</i>
PVDF	Polivinildeno difluorado
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Expresión relativa
RNI	Intermediarios de nitrógeno reactivo ("Reactive nitrogen intermediate")
ROI	Intermediarios de oxígeno reactivo ("Reactive oxygen intermediate")
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RVS	Medio Rappaport Vassiliadis soja
SCV	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> (" <i>Salmonella</i> containing vacuole")
S.E.M	Error estándar de la media
SIF	Fibroblastos de la lámina propia intestinal
SIFs	Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i> (" <i>Salmonella</i> -induced filaments")
SIM	Macrófagos de la lámina propia intestinal
SM2	Medio para <i>Salmonella</i> 2
SPI-1	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> 1 (" <i>Salmonella</i> pathogenicity island 1")
SPI-2	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> 2 (" <i>Salmonella</i> pathogenicity island 2")
SPI-3	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> 3 (" <i>Salmonella</i>

	pathogenicity island 3")
SPI-4	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> 4 (" <i>Salmonella</i> pathogenicity island 4")
SPI-5	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> 5 (" <i>Salmonella</i> pathogenicity island 4")
SST3	Sistema de secreción tipo III
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias
XLD	Ágar xilosa-lisina-desoxicolato
WT	Wild type o fenotipo silvestre

RESUMEN

En el campo de la sanidad animal la estrategia más rentable y segura en la profilaxis de las enfermedades infecciosas consiste en el empleo de vacunas. Una de las estrategias más económicas y eficaces para desarrollar estas vacunas es el uso de cepas vacunales vivas atenuadas. Estas cepas presentan como ventaja añadida la posibilidad de ser utilizadas como vehículos vacunales, tanto para liberar vacunas de ADN (que se ha denominado recientemente como bacto-fección) como para expresar antígenos heterólogos.

Con estos antecedentes, en esta Tesis hemos construido dos cepas atenuadas a partir de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis mediante la delección, utilizando el sistema λ Red recombinasa, de dos reguladores de virulencia, el sistema PhoP/PhoQ y RpoS. Los mutantes obtenidos son similares fenotípicamente a la cepa parental y presentan un alto grado de atenuación en los modelos murino y porcino de infección experimental.

Para evaluar el comportamiento de las nuevas cepas al entrar en contacto con las células del hospedador, realizamos un experimento de infección de cultivos primarios con fibroblastos y macrófagos procedentes de lámina propia intestinal de cerdo por su papel como células fundamentales en la vía de entrada del patógeno. Es destacable cómo los mutantes construidos presentan un fenotipo de persistencia en macrófagos y de proliferación en fibroblastos viables en comparación con la cepa parental y, especialmente, con respecto a una cepa mutante atenuada presente en el mercado como vacuna comercial denominada SC-54.

Una vez comprobada la atenuación y el fenotipo de persistencia y proliferación en cultivos celulares normalmente no permisivos para *S. Choleraesuis*, podemos considerar a Δ phoP/Q y Δ rpoS como excelentes candidatos para desarrollar vehículos vacunales adaptados al cerdo como hospedador. Basándonos en estos resultados, hemos optimizado los vehículos vacunales empleando un epítipo modelo comercial, 3xFLAG, con el fin de medir su capacidad

para estimular una respuesta inmunitaria específica frente al antígeno vehiculado:

1. Empleando $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$ como vehículos para vacunas de ADN mediante la incorporación por electroporación del plásmido de expresión eucariota pCMV::3xFLAGm2A, se ha observado una respuesta inmunitaria sistémica específica frente a 3xFLAG con ambos mutantes, una respuesta a nivel de la mucosa intestinal específica al utilizar $\Delta rpoS$ y con un sesgo celular al utilizar $\Delta phoP/Q$.
2. $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$ también se han utilizado como vehículos para la expresión de 3xFLAG que fue incluido en forma de monocopia, bajo el gobierno de dos promotores de expresión inducida *in vivo* en el cromosoma bacteriano. De igual manera, con esta estrategia hemos conseguido la estimulación de una respuesta inmune sistémica específica frente a 3xFLAG con ambos mutantes. Los niveles de respuesta inmunitaria humoral específica frente a 3xFLAG fueron independientes al contacto previo de los animales con *Salmonella*.

El trabajo desarrollado ha permitido la construcción de dos nuevos vehículos vacunales con buenas perspectivas para poder ser aplicados en el campo de la sanidad animal, y más concretamente en el sector porcino. Para ello, se podría sustituir fácilmente el antígeno modelo 3xFLAG, por otros antígenos relevantes en este área.

SUMMARY

Vaccination is an increasingly important measure for the prevention of most of the infectious diseases that affect animals. The development of ideal vaccines represents a highly profitable and safe strategy.

The use of live attenuated *Salmonella spp* strains as a delivery system for DNA vaccines and foreign antigens is a great opportunity for the development of ideal vaccines, affordable and also effective. Increased understanding of the mechanisms underlying *Salmonella* virulence and host immune response would create novel strategies to develop this vector strains.

Due to their ability to target immune cells, the specific method used to cross the intestinal barrier and also their host-restricted tropism, *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis live attenuated strains had attracted a great deal of interest as ideal oral vaccines and delivery vectors. In recent years, the λ Red recombinase system using bacteriophage-encoded recombinase has been developed to allow more efficient and precise manipulation of chromosomal DNA in bacterial species, so we have applied this technology in order to design two *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis derivatives that carry deletions in *phoP* and *rpoS* regulatory genes. No differences have been observed between the mutants and parental strains phenotype's characteristics. Both *Salmonella* derivatives are attenuated not only in the murine model but also, in the natural host model of infection.

Both strains, Δ *phoP/Q* y Δ *rpoS*, were able to survive and proliferate inside eukaryotic cells belonging to primary cells cultures from swine lamina propria, macrophages and fibroblasts. These cells are located in the initial site of entry for *Salmonella* and their interaction with the bacteria are crucial for the development of host immunological responses. Moreover, the parental strain and a commercial available vaccine, SC-54, which is also a *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis derivative, were not able to survive or proliferate inside macrophages or fibroblasts.

Δ *phoP/Q* y Δ *rpoS* are likely to be considered as new candidates that raise a novel concept for promising vaccines in which a combination of

intracellular survive and proliferation in macrophages and fibroblasts, respectively, together with attenuation in the porcine model of infection would be important characteristics.

Therefore, We have optimized our vaccine delivery vectors with the aim to asses their power to stimulate a specific immunological host response against a model antigen, 3xFLAG. We have try to achieve our goals by two different strategies:

Firstly, we have considered *ΔphoP/Q* and *ΔrpoS* as a delivery vectors for DNA vaccines, using a plasmid to carry the heterologous antigen. The plasmid is pcmv3XFLAGm2A, included by electroporation, which is stable and harbour an eukaryotic expression promoter. The bacterial strains built in this way promoted a host specific systemic immune response against 3xFLAG. Moreover, *ΔrpoS* could stimulated a mucosal specific immune response and *ΔphoP/Q* elicited a cellular specific immune response.

Secondly, *ΔphoP/Q* and *ΔrpoS* have been used to construct recombinant *Salmonella* vaccines by chromosomal integration of the heterologous antigen, 3xFLAG. This approach offered a maximum genetic stability and we have optimized the strategy by means of strong intracellular activated promoters such as the promoters of *ssaG* and *pagC* *Salmonella* genes. The bacterial strains have shown to be effective as vectors for 3xFLAG, eliciting a specific systemic host immune response against the heterologous antigen. The results suggested that the previous contact with *Salmonella* (as we have used it in several boost) might not have had a negative effect in the host immune response against the heterologous antigen, 3xFLAG.

The attenuated strains developed in this work are highly immunogenic against the parental pathogenic bacterial strain and against the heterologous antigen delivered as well. Furthermore, they can be genetically manipulated to either express foreign antigens or deliver exogenous DNA in order to achieve an effective development of *Salmonella*-based vaccines for infectious diseases of animal health importance that affects the swine.

1 INTRODUCCIÓN

1. El género *Salmonella*

1.1. Generalidades, taxonomía y clasificación

El género *Salmonella* está compuesto por bacilos Gram negativos, móviles, anaerobios facultativos y no esporulados, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Este género, se encuentra filogenéticamente muy próximo a los géneros *Escherichia*, *Citrobacter* y *Shigella*. Su organización genética está estrechamente relacionada con el género *Escherichia*, con el que comparte aproximadamente un ochenta por ciento de homología (McClelland *et al.*, 2001; Sanderson *et al.*, 1995).

La Comisión Judicial del Comité Internacional de sistemática de procariotas, en el año 2005, decide que el género *Salmonella* está formado por tres especies de acuerdo a criterios basados en la hibridación ADN-ADN, análisis electroforético múltiple de enzimas y el análisis comparativo de secuencias de ARNr, en un intento de simplificar y unificar los criterios taxonómicos (Tindall *et al.*, 2005). Estas especies son *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* y *Salmonella subterranea*, siendo *S. enterica* la especie que aparece relacionada con procesos infecciosos en el hombre y los mamíferos, subdividiéndose, a su vez, en seis subespecies: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* y *salamae*. Dentro de estas subespecies se engloban más de dos mil quinientos serovares que se clasifican en función de sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi) (Arrach *et al.*, 2008).

Los principales serovares patógenos para el hombre y los mamíferos se incluyen dentro de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, cuyo hábitat es el intestino, mientras que las especies *bongori* y *subterranea* (Shelobolina *et al.*, 2004) y los serovares incluidos en las subespecies *arizonae*, *diarizonae*, *salamae*, *houtenae* e *indica*, se aíslan normalmente en animales poiquilotermos y en el medio ambiente, donde puede permanecer viable semanas, meses e incluso años, si las condiciones de temperatura, pH, osmolaridad y humedad son las adecuadas. (Winfield and Groisman, 2003)

El tipo de enfermedad causada por *Salmonella* depende del serovar y del hospedador implicados, por lo que una clasificación práctica de serovares se basa en su espectro de hospedador (Uzzau *et al.*, 2001), siguiendo este criterio, los serovares de *Salmonella* se dividen en tres grupos: Serovares de rango de hospedador restringido, es decir, adaptados a un único hospedador como Typhi y Paratyphi, que producen enfermedad en el hombre y primates superiores, Abortusequi que afecta a los équidos y Abortusovis característico de la especie ovina, los serovares adaptados a un hospedador, que son aquéllos asociados a una determinada especie, pero que de manera ocasional, pueden causar enfermedad en otras. Son los serovares Dublin, Choleraesuis y, la subespecie *arizonae*, que cursan con procesos en el ganado ovino, el porcino y los reptiles, respectivamente, aunque esporádicamente pueden afectar también al hombre y por último los serovares de amplio rango de hospedador, muy ubicuos, relacionados con patologías graves en determinados hospedadores, pero que habitualmente causan cuadros leves en un gran número de animales. Es el caso de los serovares Typhimurium y Enteritidis, que si bien producen enfermedad sistémica en roedores y gallinas, respectivamente, pueden causar trastornos gastrointestinales en un gran número de hospedadores incluyendo al hombre.

El serovar objeto de nuestro estudio es Choleraesuis, patógeno adaptado al cerdo en el que produce el paratífus porcino, pudiendo afectar al hombre, generalmente causando un cuadro septicémico, con muy poca participación del tracto gastrointestinal (Chiu *et al.*, 2004).

El papel del ganado porcino como reservorio de *S. Choleraesuis* constituye un grave problema no sólo por las pérdidas económicas al causar enfermedad fundamentalmente en cerdos jóvenes, si no también, por sus importantes implicaciones en salud pública al tratarse de un agente potencialmente zoonótico.

2. Impacto y epidemiología de la salmonelosis

A pesar de la existencia de vacunas y terapia antibiótica, las infecciones por *Salmonella* siguen constituyendo un importante problema de salud pública, con un aumento de la mortalidad y morbilidad fundamentalmente en los grupos de riesgo: niños y adultos inmunocomprometidos, especialmente en zonas endémicas del sur y sureste de Asia. Esta tendencia está fuertemente relacionada con la aparición de cepas resistentes a las quinolonas y otros antibióticos (Woc-Colburn and Bobak, 2009).

La presentación de los casos de salmonelosis en países en vías de desarrollo cursan mayoritariamente en forma de fiebre entérica o tifoidea, que se caracteriza por su afectación sistémica y alta mortalidad. A finales de los años noventa, fueron más de veinte millones de personas las que desarrollaron fiebre tifoidea con resultado de muerte en unos doscientos mil casos (Altekruse *et al.*, 1997), el noventa por ciento de estos casos se localizaron en el sur y sureste de Asia, siendo atribuidos no sólo a *S.Typhi* si no también a serovares no tifoideos (Woc-Colburn and Bobak, 2009).

La tendencia en los países desarrollados es diferente, la incidencia de salmonelosis se asocia con el consumo de alimentos contaminados crudos o con un tratamiento térmico insuficiente, aparecen episodios gastroentéricos en forma de brotes, con un bajo porcentaje de enfermedad sistémica y, con unos índices de mortalidad mucho menores. Así, en la Unión Europea, se notificaron treinta y cuatro casos por cada cien mil habitantes en el año dos mil seis, fundamentalmente asociados al consumo de carne de pollo y huevos contaminados con *S. Enteritidis* (Denny *et al.*, 2007).

En el caso particular de *S. Choleraesuis*, es uno de los principales serovares causantes de enfermedad en Asia, siendo el segundo en importancia por mortalidad en Taiwán, dónde el papel del cerdo como reservorio es fundamental (Huang *et al.*, 2004; Jean *et al.*, 2006).

3. Patogenia de la Salmonelosis

3.1. Transmisión

Los diferentes serovares patógenos de *Salmonella enterica subespecie enterica* se transmiten principalmente vía fecal-oral a través del consumo de huevos, carne de pollo, cerdo o vacuno, así como productos lácteos contaminados en origen o durante su manipulación, e ingesta de frutas y vegetales regados con aguas fecales contaminadas (Humphrey, 2004). También existe la transmisión a través del contacto con reptiles portadores (Warwick *et al.*, 2001).

3.2. Cuadros o síndromes clínicos

Algunos factores que nos ayudan a explicar la patogenia de *Salmonella enterica subespecie enterica* son su capacidad para afectar a un amplio rango de hospedadores (a excepción de *S. Typhi*, *S. Paratyphi* y *S. Abortusequi*) pero, por razones sin esclarecer, el mismo serovar puede producir diferentes cuadros clínicos en los distintos hospedadores (Boyle *et al.*, 2007; Uthe *et al.*, 2007), el establecimiento de infecciones persistentes, existiendo hospedadores que actúan a modo de reservorio, que eliminan al medio ambiente bacterias durante largos periodos de tiempo, favoreciendo así la continuación del ciclo de enfermedad (Gray and Fedorka-Cray, 2001) y la problemática derivada de las cepas resistentes a los antibióticos, cada vez más numerosas, cuya consecuencia, es la aparición de infecciones más graves y persistentes, lo que contribuye a que la salmonelosis sea un problema emergente (Parry, 2004; Shakespeare *et al.*, 2005).

De manera amplia, los cuadros clínicos causados por *S. enterica* se dividen en salmonelosis tifoideas y salmonelosis no tifoideas:

La salmonelosis tifoidea cursa en forma de enfermedad sistémica invasiva caracterizada por la diseminación sistémica de *S. Typhi* o *S. Paratyphi A* o *B* desde el intestino a diversos órganos del sistema Retículo-endotelial. La fiebre tifoidea es la forma de salmonelosis tifoidea más conocida, se produce en la especie humana tras infectarse con el serovar *S. Typhi* y cursa, tras un periodo asintomático de 5 a 21 días, con cuadros febriles continuados,

cefalea, sopor, dolor abdominal, constipación, lesiones cutáneas y diarrea tardía en aproximadamente un tercio de los pacientes. Con menor frecuencia pueden aparecer artritis, osteomielitis y abscesos en bazo, hígado, cerebro y músculo psoas (Huang and DuPont, 2005). En los portadores existe un reservorio a nivel de la vesícula biliar, y, debido a que son asintomáticos, poseen una enorme infectividad, eliminando bacterias al medio ambiente y continuando así el ciclo de enfermedad. También son fiebres tifoideas la fiebre paratifoidea del hombre causada por los serovares Paratyphi A o B y, la fiebre paratifoidea del cerdo (causada por *S. Choleraesuis*), que se caracteriza por un cuadro de enterocolitis y septicemia en el cerdo. Los cerdos infectados muestran signos clínicos tras 36 a 48 horas, eliminando de 10^3 a 10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo de heces durante el pico de infección (Gray *et al.*, 1995; Loynachan *et al.*, 2004). Generalmente, los cerdos infectados van a eliminar bacterias durante 9 a 12 semanas post infección, aunque los portadores asintomáticos que liberan *S. Choleraesuis* durante más de tres meses no son habituales (Gray *et al.*, 1996).

La Salmonelosis no tifoidea se produce a consecuencia de infecciones por parte de los serovares *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Newport* y *S. Typhimurium*. El cuadro clínico viene marcado por una enterocolitis, prácticamente indistinguible de la producida por otros patógenos intestinales, con un corto periodo de incubación que oscila entre las 12 a las 72 horas, tras el cual, aparecen dolor abdominal, vómitos y diarrea. Es un proceso autolimitante en individuos inmunocompetentes que superan la infección en un período de 4 a 8 días. Se pueden producir complicaciones en individuos pertenecientes a grupos de riesgo (niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos) en los que las enteritis severas pueden dar lugar a bacteriemia (Bar-Meir *et al.*, 2005). Los cuadros de salmonelosis no tifoideas marcados por fuertes enterocolitis son frecuentes en potros, lechones y corderos causados por *S. Typhimurium*, así como en terneros causados por *S. Enteritidis*.

A veces, *S. Choleraesuis* puede ocasionar un cuadro similar a las salmonelosis no tifodeas en individuos inmunocompetentes, sin ocasionar afecciones intestinales, al alcanzar las bacterias el torrente sanguíneo, lo que se conoce como bacteriemia. Las manifestaciones

clínicas van desde artritis séptica, neumonía, peritonitis, abscesos cutáneos, hasta endoarteritis. Se acompañan de picos de fiebre alta que carecen de continuidad, lo cual constituye la principal diferencia con el cuadro clínico de la fiebre tifoidea (Chiu *et al.*, 2004).

4. Bases genéticas de la patogenicidad de *Salmonella*

La virulencia en las bacterias patógenas es un proceso multifactorial que requiere de la acción conjunta de diferentes genes. Por un lado, los genes necesarios para la supervivencia del patógeno tanto en el hospedador como en el medio ambiente y, por otro lado, los genes de virulencia propiamente dichos, que permitirán la interacción patógeno – hospedador.

Salmonella comparte gran parte de su contenido genético con *E. coli*. Sin embargo, en todas las secuencias de genomas de *Salmonella* obtenidas hasta la fecha, se observan cinco grandes inserciones ausentes en *E. coli*. Estas regiones parece que fueron adquiridas por la bacteria mediante transferencia horizontal y se denominan islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI, "*Salmonella* pathogenicity islands"). Estos elementos codifican factores de virulencia necesarios para la colonización y supervivencia dentro del hospedador. La mayoría de estas islas tienen un porcentaje menor de G+C comparado con el 52% presente en el resto del genoma de *Salmonella* (Edwards *et al.*, 2002; Schmidt and Hensel, 2004).

La evolución del género *Salmonella* se ha producido en dos grandes etapas. En la primera fase, *Salmonella* se diferenció de *E. coli* mediante la adquisición de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1), la cual codifica factores de virulencia requeridos para la infección durante la etapa intestinal. El surgimiento de las dos especies de *Salmonella*, *S. enterica* y *S. bongori*, es considerada la segunda etapa de la evolución, cuando se adquirió la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI-2) (Ehrbar and Hardt, 2005; Porwollik and McClelland, 2003).

Durante la co-evolución con sus hospedadores, *Salmonella* ha podido desarrollar sofisticados mecanismos de virulencia para manipular

funciones de la célula hospedadora en su propio beneficio. Un ejemplo es el empleo de sistemas especializados de secreción capaces de inyectar proteínas efectoras dentro de la célula hospedadora, como el denominado Sistema de Secreción de Tipo 3 (SST3). Este sistema tiene un importante papel en la interacción *Salmonella*-célula hospedadora (Schlumberger and Hardt, 2006). Su estructura básica se compone de una jeringa molecular formada por más de veinte proteínas que abarca desde la membrana interna de la bacteria hasta la membrana externa y contacta con la membrana plasmática de la célula hospedadora (Galan and Wolf-Watz, 2006). Este sofisticado aparato media la translocación de factores de virulencia bacterianos a la célula hospedadora (Ly and Casanova, 2007).

4.2. Isla de patogenicidad 1 (SPI-1)

SPI-1 se encuentra localizada en el centisoma 63 del cromosoma de *Salmonella*, comprende 40 kb (Galan, 2001) y está presente en *S. enterica* y *S. bongori* (Hensel, 2004). En la SPI-1 se codifican todos los genes necesarios para crear un aparato de SST3 funcional, varias proteínas efectoras y algunas proteínas reguladoras como HilA, HilC, HilD e InvF. Los genes estructurales y las proteínas efectoras más importantes están codificadas por tres operones: *prg/org*, *inv/spa* y *sic/sip*. Los operones *prg/org* e *inv/spa* codifican proteínas que conforman la maquinaria de secreción, mientras que el operón *sic/sip* codifica algunas proteínas efectoras y proteínas que van a conformar el translocón que se inserta en la membrana de la célula hospedadora (Ellermeier and Slauch, 2007). Otras proteínas efectoras secretadas por este SST3 están codificadas en profagos (Ehrbar and Hardt, 2005).

La proteína HilA es el regulador central de la expresión de SPI-1. Esta proteína activa la expresión de los operones *inv/spa* y *prg/org* uniéndose a su región promotora (Eichelberg and Galan, 1999; Ellermeier and Slauch, 2007). InvF es otro regulador transcripcional que induce la expresión tanto de los genes *sic/sip* como de genes relacionados con SPI-1 que se encuentran en otras localizaciones del cromosoma (Darwin and Miller, 2001). Además de las proteínas reguladoras específicas codificadas en SPI-1, la expresión de este

SST3 está influenciada por varios reguladores globales como los sistemas de dos componentes OmpR-EnvZ, BarA/SirA y PhoP-PhoQ (Ellermeier and Slauch, 2007; Gerlach and Hensel, 2007a).

La invasión de células eucariotas no fagocíticas está mediada por SPI-1. *Salmonella* manipula el citoesqueleto de la célula hospedadora a través de la inyección de proteínas efectoras en el citoplasma de la célula. La acción combinada de estas proteínas induce cambios en el nivel de actividad de determinadas GPTasas de la familia Rho, que producen la reorganización del citoesqueleto de actina. Como resultado, se forman pliegues en sitios localizados de la membrana ("membrane ruffling") que engloban la bacteria, promoviendo su internalización. La bacteria permanece dentro de una vacuola denominada SCV ("*Salmonella*-containing vacuole") (Garcia-del Portillo and Finlay, 1995; Ly and Casanova, 2007; Steele-Mortimer, 2008). Hasta la fecha se sabe que al menos cinco proteínas efectoras de SPI-1 son necesarias para la eficiente entrada de *Salmonella* en la célula hospedadora: SopE, SopE2, SopB, SipA y SipC (Patel and Galan, 2005).

4.3. Isla de patogenicidad 2, (SP-2)

SPI-2 tiene un tamaño de 40 kb de longitud localizado entre el centisoma 30 y 31 del cromosoma de *S. enterica*. También codifica un SST3 y los genes responsables de su formación están concentrados en una región de aproximadamente 26 kb de longitud. Aquí, un total de 31 genes están organizados en: *i*) dos operones que codifican los componentes del aparato de secreción (*ssa*); *ii*) una unidad transcripcional que codifica las proteínas efectoras (*sse*) y chaperonas (*ssc*) y *iii*) un operón que codifica las proteínas que comprenden el sistema regulador de dos componentes SsrAB (*ssr*) (Shea *et al.*, 1996). SPI-2 se expresa durante la fase intracelular de *Salmonella* siendo esencial para establecer y mantener la integridad de la SCV como un nicho intracelular en el cual la bacteria pueda sobrevivir y replicarse (Kuhle and Hensel, 2004). Hasta la fecha se conocen veinte proteínas efectoras relacionadas con el SST3 de SPI-2 (Haraga *et al.*, 2008). De éstas, sólo tres se codifican en la isla de patogenicidad: SpiC, SseF y SseG. El resto de las proteínas efectoras se codifican en otras regiones del cromosoma, bien sea en otras islas

o isletas de patogenicidad o en genes asociados a fagos, indicando que han sido adquiridas independientemente por transferencia genética horizontal. Las mutaciones en la mayoría de estos genes afectan levemente o no afectan a la proliferación intracelular y a la virulencia de *Salmonella*. Se ha postulado que este hecho podría deberse a que diferentes proteínas tengan funciones redundantes (Kuhle and Hensel, 2004).

La expresión de los genes asociados a SPI-2 está controlada por un sistema regulador local y por sistemas reguladores globales. El sistema de dos componentes SsrA-SsrB es codificado dentro de la isla y varios estudios han demostrado que es esencial para la expresión de los genes relacionados con SPI-2 (Cirillo *et al.*, 1998; Lober *et al.*, 2006; Worley *et al.*, 2000). La expresión del sistema SsrAB está controlada por reguladores globales como los sistemas de dos componentes OmpR-EnvZ (Brown *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2003; Garmendia *et al.*, 2003; Kim and Falkow, 2004; Lee *et al.*, 2000) y PhoP-PhoQ (Bijlsma and Groisman, 2005; Deiwick and Hensel, 1999), el regulador transcripcional SlyA (Linehan *et al.*, 2005; Navarre *et al.*, 2005) y las proteínas asociadas al nucleoide Fis, H-NS y YdgT (Coombes *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2004; Lucchini *et al.*, 2006; Walther *et al.*, 2007).

4.4. Interconexión entre SPI-1 y SPI-2

La mayoría de trabajos establecen que los efectores de SPI-1 están involucrados en la entrada de la bacteria, mientras que los relacionados con SPI-2 son responsables de la supervivencia y la diseminación de la bacteria a nivel intracelular. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que los límites de acción entre estas dos islas de patogenicidad no están muy definidos. Así, se ha detectado la proteína efectora de SPI-1, SopB/SigD, en macrófagos varias horas después de la infección (Drecktrah *et al.*, 2005). Igualmente, se ha demostrado que la proteína relacionada con invasión, SipA, está involucrada en mantener la morfología de la SCV y su posición perinuclear durante la infección (Brawn *et al.*, 2007). Además, estudios realizados en ratones infectados con *Salmonella* revelan la presencia de cuatro efectores de SPI-1 en el bazo e hígado del animal varios días post-infección (Giacomodonato *et al.*, 2007). Por

otro lado, diferentes proteínas codificadas en SPI-1 parecen ser requeridas por la bacteria para establecer un estado de persistencia en el modelo murino (Lawley *et al.*, 2006). Estudios hechos en ratones muestran además que el SST3 de SPI-2 se expresa durante la fase inicial de la infección con el serovar Typhimurium, en la luz del intestino y antes de penetrar la bacteria en el epitelio intestinal (Brown *et al.*, 2005). Los autores sugieren que, la inducción temprana de la expresión de estos genes, prepara la bacteria para el ambiente hostil que va a encontrar dentro de los macrófagos. Estos resultados indican que los SST3 de *Salmonella* no actúan de forma independiente y que posiblemente cooperan durante distintas fases de la infección (Haraga *et al.*, 2008).

4.5. Otras islas de patogenicidad

La isla de patogenicidad 3 de *Salmonella* (SPI-3) tiene un tamaño de 17 kb. El factor de virulencia mejor caracterizado de SPI-3 es el operón *mgtCB*, relacionado con la supervivencia dentro de macrófagos, la virulencia en ratones y con la adaptación a ambientes bajos en magnesio (Blanc-Potard and Groisman, 1997; Blanc-Potard *et al.*, 1999). SPI-3 comprende otros ocho genes, entre ellos está *misL* que codifica una adhesina necesaria para la persistencia intestinal (Blanc-Potard *et al.*, 1999; Dorsey *et al.*, 2005).

La isla de patogenicidad 4 de *Salmonella* (SPI-4) comprende una región génica de 25 kb muy conservada entre los diferentes serovares de *Salmonella* (Edwards *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 1998). SPI-4 está formada por seis genes designados *siiA-siiF* ("*Salmonella* intestinal infection"), que codifican proteínas que forman un Sistema de Secreción Tipo 1 (SST1) y una proteína de 595 kD llamada SiiE que es secretada por el sistema (Gerlach *et al.*, 2007b; Morgan *et al.*, 2007). Se ha sugerido que SiiE podría mediar la adherencia de la bacteria con células epiteliales, contribuyendo a la colonización intestinal en terneros y la inflamación intestinal en el modelo murino de colitis (Gerlach and Hensel, 2007a).

Recientemente, se ha demostrado que existe una regulación coordinada de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-4 que compartirían el control por un mismo panel de reguladores en

determinadas condiciones ambientales. Esta evidencia sugiere que estas dos islas podrían tener papeles complementarios durante la interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal del hospedador (Gerlach *et al.*, 2007a; Main-Hester *et al.*, 2008).

Aunque SPI-1, SPI-2, SPI-3 y SPI-4 son las más estudiadas, en el género *Salmonella* se conocen otras trece islas (SPI-5-17) que codifican proteínas necesarias para la virulencia (Gerlach and Hensel, 2007b). La isla de patogenicidad 5 de *Salmonella* (SPI-5) es una pequeña región génica que abarca 7,6 kb y comprende genes que codifican proteínas efectoras que son secretadas por los SST3 de SPI-1 y SPI-2, como SopB y PipB respectivamente (Knodler *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 1998). De igual forma, SPI-6 y SPI-10 contienen los operones *saf* y *sef* que codifican fimbrias que median la adhesión de *Salmonella* a la superficie de células epiteliales. Por otra parte, SPI-7 es específica de los serovares Typhi, Dublin y Paratyphi C y codifica el factor de virulencia antígeno Vi (Folkesson *et al.*, 2002; Gerlach and Hensel, 2007b; Hensel, 2004).

4.6. El sistema de dos componentes PhoP-PhoQ

Los sistemas de dos componentes, constituidos por un sensor y un regulador transcripcional, son ampliamente utilizados por organismos procariontes, a los que permiten percibir y responder ante diversas señales ambientales (West and Stock, 2001). PhoP-PhoQ es un sistema de dos componentes esencial para la virulencia de varias bacterias Gram-negativas, que controla la composición de la envuelta de la bacteria (Groisman, 2001). PhoQ es una proteína de membrana sensora con actividad quinasa y PhoP es el regulador de respuesta citoplasmático asociado (Groisman *et al.*, 1989; Miller and Mekalanos, 1989). La proteína PhoQ presenta dos dominios transmembrana que delimitan un dominio periplásmico sensor y un dominio citoplasmático con actividad quinasa. PhoP es el regulador transcripcional y pertenece a la subfamilia de reguladores OmpR (Castelli *et al.*, 2000). La presencia de estímulos como limitación de magnesio, pH ácido o presencia de péptidos antimicrobianos, origina la autofosforilación de la proteína PhoQ en un residuo conservado de histidina en su dominio citoplasmático. Este grupo fosfato es transferido posteriormente a un residuo de ácido aspártico en la proteína PhoP (Castelli *et al.*, 2000). La proteína PhoP fosforilada se

une al ADN para controlar la expresión de los genes activados por *phoP* (*pag*) y los genes reprimidos por *phoP* (*prg*), de los cuales han sido identificados más de 200 (Monsieurs *et al.*, 2005).

El sistema PhoP-PhoQ es muy importante para la supervivencia intracelular de *S. enterica*, ya que promueve la virulencia y la resistencia de la bacteria ante la respuesta inmunitaria innata del hospedador, actuando como un sistema regulador que controla muchas de las propiedades patogénicas de la bacteria. Mutantes del serovar Typhimurium que carecen de PhoP o PhoQ son avirulentos en ratones (Groisman *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989). El sistema PhoP-PhoQ regula una gran variedad de funciones de virulencia de la bacteria como invasión, motilidad, transporte de pequeñas moléculas, tolerancia a ambientes ácidos, resistencia a péptidos antimicrobianos y la modificación de la superficie de la bacteria (Bearson *et al.*, 1998; Behlau and Miller, 1993; Fields *et al.*, 1989; Guo *et al.*, 1997; Soncini *et al.*, 1995).

Se ha comprobado que *S. enterica* serovar Typhimurium sobrevive en el interior de macrófagos tras la infección de ratones susceptibles. Dentro de estas células, la bacteria ha de resistir la acción de mecanismos antimicrobianos como intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, péptidos antimicrobianos, proteasas y pH ácido (Fields *et al.*, 1986). *Salmonella* es capaz de percibir este ambiente hostil y activar mecanismos específicos como el sistema PhoP-PhoQ para evitar ser eliminada. PhoQ se activa en el interior de fagosomas de macrófagos (Alpuche Aranda *et al.*, 1992) y en diferentes tejidos de ratones infectados (Merighi *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la proteína PhoQ puede ser activada en los fagosomas de macrófagos infectados en respuesta a la baja concentración de cationes divalentes, particularmente magnesio, debido a que la proteína PhoP regula la transcripción de los genes que codifican dos transportadores de magnesio de *Salmonella*, MgtA y MgtB. Su expresión se induce cuando la bacteria se encuentra en ambientes pobres en magnesio (García Vescovi *et al.*, 1996; Soncini and Groisman, 1996). No obstante, estos transportadores no son esenciales para la virulencia y supervivencia intracelular de la bacteria (Blanc-Potard and Groisman, 1997). Por otra parte, parece que es poco probable que la bacteria se encuentre *in vivo* con

concentraciones mínimas de cationes necesarias para la activación de PhoQ. Por un lado, la concentración de Ca^{2+} se incrementa con la acidificación del fagosoma (Christensen *et al.*, 2002) y por otro, en la vacuola fagosomal el Mg^{2+} está presente en concentraciones milimolares en el momento de la activación de la proteína PhoP (Martin-Orozco *et al.*, 2006). Es probable entonces que otras señales activen PhoQ *in vivo*. Trabajos recientes han demostrado que PhoQ responde a pH ácido y a péptidos antimicrobianos (Bader *et al.*, 2005; Prost *et al.*, 2007), señales que están presentes en la SCV de macrófagos y en el estómago y la luz intestinal de ratones infectados (García Vescovi *et al.*, 1996; Merighi *et al.*, 2005). Aún así, todavía existe controversia sobre cuál podría ser la señal ambiental que activa el sistema PhoP-PhoQ cuando la bacteria se encuentra en el medio intracelular (Groisman and Mouslim, 2006; Prost and Miller, 2008).

Finalmente, lo que sí parece conocerse es que el sistema PhoP-PhoQ controla muchos aspectos relacionados con patogénesis. Un ejemplo es la regulación de la expresión de factores de transcripción relacionados con virulencia como SsrB (Bijlsma and Groisman, 2005), SlyA (Norte *et al.*, 2003), PmrA (Kox *et al.*, 2000) e HilA (Bajaj *et al.*, 1996). Esta regulación podría permitir al sistema PhoP-PhoQ controlar diferentes fases de la infección.

4.7. Regulación del sistema de dos componentes SsrA-SsrB. Virulón SsrAB

La isla de patogenicidad 2 de *Salmonella spp* (SPI-2) es una región de 25 Kb compuesta por genes de virulencia adquiridos de forma horizontal y necesarios para la replicación bacteriana en las células del hospedador, así como para establecer una infección sistémica en el ratón (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). SPI-2 contiene genes responsables de la formación de un SST3 que permite la "inyección" de proteínas efectoras en la célula hospedadora, genes que codifican dichos efectores, y un sistema de regulación de dos componentes que participa en el control de su propia expresión (SsrA-SsrB), la expresión del SST3 y de los efectores vehiculados por él (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). Una de las principales funciones de las proteínas efectoras consiste en promover la

supervivencia y replicación de *Salmonella* en las células hospedadoras, concretamente en el interior del SCV. Esto se consigue mediante la interferencia con multitud de funciones celulares tales como la estructura del citoesqueleto, los sistemas de transducción de señales, el tráfico vesicular, los mecanismos de defensa antimicrobiana y procesos de presentación de antígeno (Abrahams and Hensel, 2006; Bakowski *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2006; Steele-Mortimer, 2008)

El sistema de dos componentes SsrA-SsrB es fundamental en la regulación de un conjunto de genes que se han denominado virulón SsrAB (Fass and Groisman, 2009) dónde, SsrB es el regulador de la respuesta y SsrA (también denominado SpiR) es el sensor de membrana compuesto por dos dominios transmembranales (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). El sistema de dos componentes SsrA-SsrB no sólo controla los genes contenidos en la SPI-2, sino que también regula diferentes *loci* situados fuera de SPI-2 (Deiwick and Hensel, 1999). A todo este conjunto de genes situados dentro y fuera de SPI-2, regulados por SsrA-SsrB, se les conoce como el virulón SsrAB (Abrahams and Hensel, 2006; Geddes *et al.*, 2005; Haraga *et al.*, 2008; Worley *et al.*, 2000; Xu and Hensel). Este virulón no sólo es fundamental en la patogénesis de *Salmonella*, sino que algunos de los promotores génicos controlados por él, son fundamentales en su uso para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, mediante el proceso conocido como "inversión de la patogenicidad" es decir, utilizar determinantes de la virulencia con fines terapéuticos (Cheminay and Hensel, 2008). Concretamente, estos promotores son excelentes para su inducción *in vivo*, utilizándose para dirigir la expresión espacio-temporal de antígenos heterólogos vehiculados por *Salmonella spp* cuando se utiliza como vehículo vacunal (Husseiny and Hensel, 2005; Husseiny *et al.*, 2007), así, se han observado elevados niveles de expresión de uno de los genes de este virulón, *ssaG* (fundamental para la formación del SST3), al incubar las bacterias en un medio que reproduce las condiciones intracelulares (Xu and Hensel).

4.8. Plásmido de virulencia

Los miembros del género *Salmonella* han evolucionado mediante la adquisición de elementos genéticos que han permitido que estos organismos sean capaces de colonizar el interior de células eucariotas. Muchos de estos elementos genéticos han sido adquiridos mediante transferencia horizontal, entre ellos se encuentra el plásmido de virulencia (Baumler *et al.*, 1997).

Los serovares Abortusovis, Abortusequi, Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Pullorum, Sendai y Typhimurium de la subespecie I de *S. enterica* tienen un plásmido de virulencia cuyo tamaño varía según el serovar. En el serovar Choleraesuis se denomina pSCV50, con un tamaño de 49,5 kb y presenta una gran homología con el plásmido del serovar Typhimurium (pSTV). Contiene el operón denominado *spv* (Chiu *et al.*, 2004; Chiu *et al.*, 2006) que consta de cinco genes, *spvRABCD* los cuales contribuyen al desarrollo de la infección sistémica por el serovar Typhimurium (Gulig *et al.*, 1993; Gulig and Doyle, 1993). La expresión de los genes *spv* se induce en bacterias que se encuentran dentro de células eucariotas en cultivo y en modelos animales infectados (Wilson *et al.*, 1997; Ygberg *et al.*, 2006). La proteína SpvB modifica y bloquea la polimerización de actina e induce la apoptosis de células eucariotas infectadas (Kurita *et al.*, 2003; Lesnick *et al.*, 2001; Libby *et al.*, 2000; Otto *et al.*, 2000; Tezcan-Merdol *et al.*, 2001). Además, la proteína SpvC, esencial para la virulencia del serovar Typhimurium en ratones (Matsui *et al.*, 2001), podría tener un efecto inhibitorio sobre la respuesta pro-inflamatoria de la célula hospedadora (Mazurkiewicz *et al.*, 2008).

Dentro del plásmido de virulencia de los serovares Typhimurium y Choleraesuis se encuentra el operón *pef* que codifica fimbrias, estructuras involucradas en la adhesión a la superficie externa de las células hospedadoras (Baumler *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 2004), y el gen *mig-5*, que se expresa en el interior de macrófagos y codifica una proteína de función desconocida (Rychlik *et al.*, 2006; Valdivia and Falkow, 1997).

La publicación del genoma de *S. Choleraesuis* en 2005 (Chiu *et al.*, 2005) ha permitido identificar un nuevo plásmido de gran tamaño, 138,742 kb denominado pSC138 y relacionado con la presencia de

numerosos genes de resistencia a antimicrobianos (Chiu *et al.*, 2005).

4.9. Factor sigma alternativo

El factor sigma alternativo, RpoS, también conocido como factor sigma 38 o factor sigma S es un regulador central de la virulencia de *Salmonella* (Fang *et al.*, 1992). Juega un importante papel en la adaptación de la bacteria a condiciones de stress tales como restricción de nutrientes, bajos niveles de pH, shock térmico, daño oxidativo, hiper o hipo-osmolaridad así como daños en el ADN bacteriano (Hengge-Aronis, 2002), gracias a que RpoS regula más de cien genes relacionados con la virulencia (Ibanez-Ruiz *et al.*, 2000).

El papel de RpoS en la virulencia de *S. Typhimurium* se comprobó al observar cómo mutantes deficientes en este gen no eran capaces de establecer una infección sistémica en el ratón, debido a una reducida capacidad para colonizar las Placas de Peyer (Coynault *et al.*, 1996) que se explicaría por el papel de este factor de virulencia en la regulación de los genes *spv*, fundamentales para establecer una infección sistémica en el ratón (Gulig *et al.*, 1993).

El sistema regulador de dos componentes PhoP/PhoQ ejerce una estabilización de RpoS en *S. enterica* (Tu *et al.*, 2006). En condiciones de bajas concentraciones de Mg^{2+} se produce una activación de PhoP/PhoQ que a su vez, permite un aumento en los niveles de RpoS a través de la activación de la transcripción del gen *iraP* cuyo producto, la proteína IraP, se une a otra proteína, RSSB, desplazándola de su unión a RpoS y evitando así su degradación. Además de esta ruta, deben existir otras rutas de regulación de RpoS por parte de PhoP ya que, se han encontrado niveles de RpoS más bajos en cepas de *Salmonella* mutantes en PhoP con respecto a cepas mutantes sólo en el gen *iraP* (Bougdour *et al.*, 2006).

4.10. Otros de terminantes genéticos de la patogenicidad de *Salmonella*

Salmonella posee operones que codifican distintos tipos de fimbrias como *fim*, *lpf*, *stf*, *bcf*, *saf* y *agf* (Humphries *et al.*, 2001). Estas

fimbrias median la adhesión de *Salmonella* a la superficie de células epiteliales y, posiblemente, le permiten diferenciar los distintos tipos de células epiteliales presentes en el intestino.

También existen otros determinantes genéticos de la virulencia como la ADN adenina metilasa (Dam) que modula la replicación del ADN, la segregación cromosómica, la reparación de errores así como, la transcripción de ciertos genes. Cepas de *Salmonella* mutantes que carecen de Dam, muestran importantes defectos en los procesos de invasión celular y citotoxicidad en células M (García-Del Portillo *et al.*, 1999).

Finalmente, mencionaremos la existencia de genes de virulencia asociados a profagos (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001).

4.11. **Bases celulares de la patogenicidad de *Salmonella***

Los patógenos bacterianos requieren de la expresión coordinada de una gran cantidad de genes para poder lograr una infección productiva en el hospedador, que deben expresarse en el tiempo y lugar adecuado (Bowe *et al.*, 1998).

Intestino delgado, puerta de entrada de *Salmonella*

Antes de la interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal, debe superar una serie de barreras naturales como son el pH gástrico (Smith, 2003), los péptidos antimicrobianos que secretan las células de Paneth (Ouellette, 2005), las sales biliares (Ramos-Morales *et al.*, 2003) y la competición con la microbiota intestinal (Lee *et al.*, 2003). Una vez alcanzado el intestino delgado, *Salmonella* se adhiere a la superficie intestinal a través de fimbrias (Humphries *et al.*, 2001) y, tras su adhesión a la superficie, la bacteria produce una infección local, delimitada al intestino, o bien, una diseminación sistémica según los serovares de *Salmonella* y los hospedadores implicados.

El intestino delgado se divide en tres regiones: duodeno, yeyuno e íleon. Estructuralmente se compone de cuatro capas de tejido: mucosa, submucosa, capa muscular y serosa. La mucosa, que

compone la parte más externa, se proyecta hacia la luz intestinal en forma de pliegues que reciben el nombre de vellosidades intestinales. Cada una de estas vellosidades se compone de células epiteliales, lámina propia y capa muscular. El tejido linfoide asociado al intestino conforma unos agregados que reciben el nombre de placas de Peyer. Este tejido linfoide también aparece de forma más difusa conformando folículos linfoides. El epitelio de la mucosa intestinal se compone principalmente de enterocitos, responsables de la absorción de nutrientes y que en su superficie apical poseen microvellosidades, células globulares, encargadas de generar el mucus intestinal y células de Paneth, encargadas de secretar a la luz intestinal péptidos antimicrobianos (van Asten *et al.*, 2005). La lámina propia sobre la que se asienta el epitelio es una matriz de glucosaminoglicanos, colágeno y reticulina por la que discurren capilares linfáticos y sanguíneos. Dentro de esta matriz existirán variados grupos celulares como fibroblastos, células dendríticas, células plasmáticas, mastocitos, macrófagos y células endoteliales (Adegboyega *et al.*, 2002; Kelsall and Strober, 1996).

Función intestinal en las respuestas inmunitaria innata y adquirida

El intestino delgado, además de cumplir funciones de transporte y digestión de nutrientes, intercambio de agua y electrolitos, también actúa definiendo una barrera entre el hospedador y el medio externo, impidiendo la entrada de microorganismos. Así, las uniones entre los enterocitos, el moco que tapiza la superficie intestinal y los movimientos peristálticos, constituyen barreras para el establecimiento de bacterias que, junto con la síntesis de péptidos antimicrobianos y reclutamiento de células inmunitarias como los neutrófilos a la zona subepitelial y luz intestinal, conforman los mecanismos de la respuesta inmunitaria innata intestinal. Por otro lado, los enterocitos, al colaborar con las células dendríticas y tejido linfoide subyacente, forman parte de la respuesta inmunitaria adquirida intestinal (Kraehenbuhl *et al.*, 1997; Rydstrom and Wick, 2007; Schenk and Mueller, 2008).

Invasión del intestino por parte de *Salmonella*

El proceso de invasión de los diferentes serovares de *Salmonella* requiere una interacción patógeno-hospedador que viene determinada por factores genéticos de ambos componentes y que desencadenará una infección intestinal localizada, o bien, una diseminación sistémica.

Una vez llegados al intestino, parece que los diferentes serovares de *Salmonella* muestran un marcado tropismo por el tejido linfoide asociado al intestino, que en el caso de los hospedadores mamíferos se compone fundamentalmente de las denominadas placas de Peyer (Santos *et al.*, 2002). Esto se ha demostrado para el serovar Typhimurium en su hospedador murino, dónde, preferentemente, las bacterias ingresan al organismo del hospedador a través de las células M que se encuentran en mayor cantidad a nivel de las placas de Peyer y que son fundamentales en el desencadenamiento de la respuesta inmunitaria a nivel de mucosas (Jones *et al.*, 1994). El tropismo por las células M parece deberse a la expresión de fimbrias de adhesión, lo cual se comprobó mediante infecciones *in vitro* del epitelio intestinal (Thankavel *et al.*, 1999). Las células M están especializadas en el transporte transepitelial de sustancias desde el lumen intestinal al tejido linfoide subyacente y parecen constituir la principal puerta de entrada de *Salmonella* al hospedador, siempre junto al ingreso que se efectúa a través de los enterocitos, dónde también se han encontrado bacterias aunque en menor número (Jepson and Clark, 2001; Sansonetti and Phalipon, 1999). Infecciones experimentales llevadas a cabo con los serovares Choleraesuis, Dublin y Typhimurium en secciones de intestino bovino y porcino, que se compartimentalizaron de manera quirúrgica para formar secciones conocidas como "loops" intestinales (Bolton *et al.*, 1999) han permitido identificar a las células M como puerta fundamental de entrada de estos serovares, si bien, en algunos casos, también los enterocitos constituyeron un importante lugar de acceso y, se ha observado cómo el proceso de glicosilación de estos enterocitos es fundamental en su reconocimiento por parte de los microorganismos (Bolton *et al.*, 1999).

Pero enterocitos y células M no son la única forma de ingreso de *Salmonella*, puesto que se pueden encontrar bacterias en el torrente sanguíneo tan solo diez minutos post-infección y la ruta escogida no

dependerá de una invasión celular mediada por el SST3-1, si no, un transporte de la bacteria por parte de células del hospedador que expresan el marcador CD18, es decir, macrófagos y células dendríticas que captan estas bacterias directamente desde el lumen intestinal y las distribuyen a zonas sistémicas (Rescigno *et al.*, 2001; Vazquez-Torres *et al.*, 1999).

Rescigno y colaboradores han demostrado cómo las células dendríticas pueden, además, proyectar sus dendritas a través de las uniones entre células epiteliales, internalizando de manera directa bacterias presentes en el lumen intestinal y transportándolas a otras localizaciones sistémicas como el bazo. La integridad epitelial no se ve afectada gracias a que estas células dendríticas expresan unas proteínas de unión estrecha "tight junction proteins" (Rescigno *et al.*, 2001).

Una vez que *Salmonella* ha alcanzado los linfonódulos mesentéricos, pasará al torrente sanguíneo, posiblemente a través del conducto torácico, viajando en el interior de células fagocíticas CD18⁺ (Vazquez-Torres *et al.*, 1999). Cuando *Salmonella* alcance sus órganos diana, bazo e hígado, se van a formar abscesos con un componente fundamental de neutrófilos (Monack *et al.*, 2004b). El ciclo se perpetúa cuando, *Salmonella* alcanza la vesícula biliar y se secreta nuevamente al intestino delgado.

Una vez superada la fase aguda de la infección sistémica, parece que las bacterias permanecerán en el interior de macrófagos a nivel de los linfonódulos mesentéricos, así como en menor medida en hígado y bazo, encontrándose hasta un año después de la infección (Monack *et al.*, 2004a; Monack *et al.*, 2004b). Esta infección crónica en ratones parece tener relación con los niveles de interferón gamma (IFN- γ), puesto que, tras administrar anticuerpos anti IFN- γ en ratones infectados de manera crónica, se producía una reactivación del proceso sistémico (Monack *et al.*, 2004a).

En el caso de la infección del serovar Typhi en el hombre, parece que la localización de la bacteria a nivel de la vesícula biliar y médula ósea, lugar de difícil acceso para el sistema inmunitaria, favorece la excreción crónica de la bacteria (Zhang *et al.*, 2008). Por último, en

el serovar *Choleraesuis*, también encontramos persistencia de la bacteria en los macrófagos, fundamentalmente a nivel de linfonódulos mesentéricos, pero esta persistencia no parece relacionarse con la virulencia, ya que, en infecciones mixtas en cerdos con *S. Typhimurium*, existía una mayor persistencia de este último serovar y, sin embargo, *S. Choleraesuis* pese a persistir menos, es más virulenta en el hospedador porcino (Chiu *et al.*, 2004).

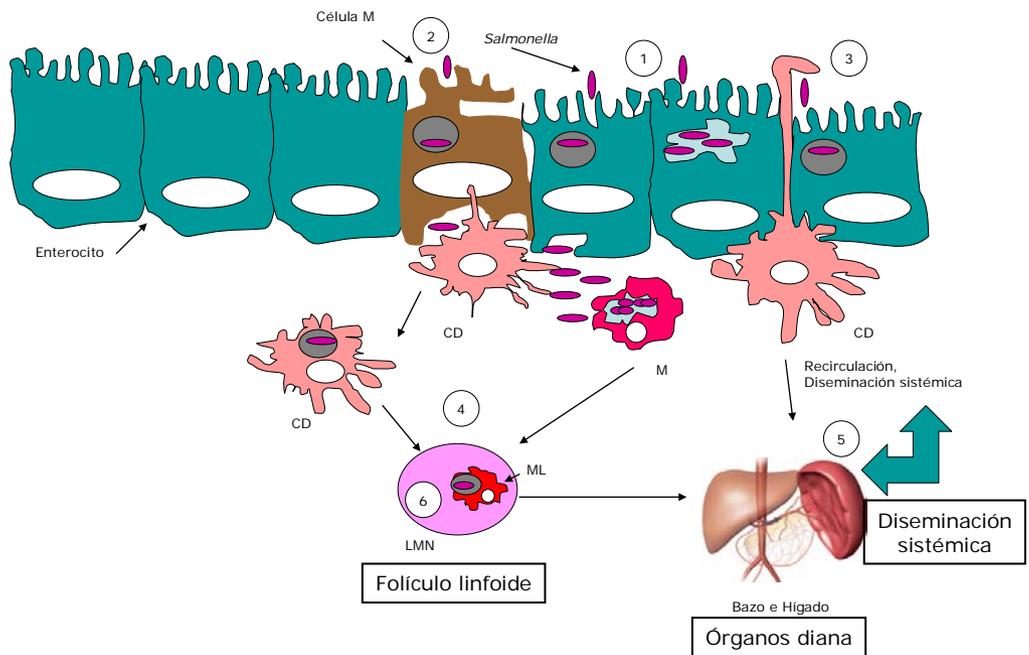


Figura 1. Invasión del intestino por parte de *Salmonella* y su diseminación sistémica. La bacteria utiliza diferentes mecanismos para atravesar la barrera intestinal: (1) invasión directa de los enterocitos, (2) invasión de las células M presentes en el epitelio de las Placas de Peyer y posterior fagocitosis de las bacterias por las células dendríticas y macrófagos de la región subepitelial y (3) captura de las bacterias por parte de las células dendríticas de la lámina propia intestinal mediante captación directa. En el interior de los macrófagos y células dendríticas, *Salmonella* viajará hasta los linfonódulos (4), desde dónde, se redistribuirá hacia los órganos diana (bazo e hígado) (5), aquí se multiplicará el patógeno y existirá una nueva recirculación. Existe la posibilidad de que *Salmonella* permanezca en los macrófagos situados en los linfonódulos mesentéricos de manera latente (6). CD, célula dendrítica; LMN, linfonódulo mesentérico; M, macrófago; ML, macrófago latente.

Interacción de *Salmonella* con distintos tipos celulares en modelos de infección *in vitro*

Interacción de *Salmonella* con los enterocitos

Salmonella tiene la habilidad de invadir células no fagocíticas como los enterocitos mediante endocitosis inducida por la bacteria (Schlumberger and Hardt, 2006). Para esto, es necesaria la función coordinada de SopE, SopE2, SopB, SipA y SipC, proteínas efectoras secretadas por el SST3 de SPI-1. Estas proteínas modulan el citoesqueleto de actina de la célula hospedadora de diferentes maneras para causar pliegues localizados de la membrana y la subsiguiente captación de la bacteria. SopE, SopE2 y SopB cooperan para activar las proteínas GTPasas de la familia Rho bien sea, directamente (SopE y SopE2) o indirectamente (SopB) (Patel and Galan, 2005). Esto genera la activación de N-WASP y WAVE2, dos miembros de la familia de proteínas WASP (“Wiskott-Aldrich Syndrome”), produciéndose el reclutamiento de la proteína Arp2/3 (“actin-related protein-2/3”) al sitio de entrada. SipA y SipC actúan directamente sobre la actina y cooperan para promover la polimerización y el ensamblaje de F-actina en el sitio de invasión de la bacteria (Hayward and Koronakis, 1999; Lilic *et al.*, 2003). Estos cambios en el citoesqueleto de actina de la célula hospedadora provocan el englobamiento e internalización de la bacteria que queda inmersa en una estructura denominada SCV (Salmonella Containing Vacuole) (Brumell *et al.*, 2001). Después de la invasión de la célula, el citoesqueleto de actina vuelve a su arquitectura normal. Se ha visto que la proteína SptP antagoniza la acción de SopE, SopE2 y SopB actuando como una proteína estimuladora de GTPasa (GAP) sobre Cdc42 y Rac1 (Fu and Galan, 1999). La regulación temporal del proceso parece ser debida a que la degradación proteosomal de SptP está retardada con respecto a la de SopE (Kubori and Galan, 2003). De esta forma, SptP persistiría en el citoplasma hasta después de que los efectores que median la polimerización de actina hayan sido degradados, restaurando el citoesqueleto de actina a su dinámica normal.

La habilidad para sobrevivir y proliferar dentro de células eucariotas es considerada el principal factor de virulencia de *S. enterica*. La maduración de la SCV y la adaptación de la bacteria al nuevo ambiente crean las condiciones que permiten la proliferación intracelular de la bacteria dependiente de SPI-2 (Cirillo *et al.*, 1998).

Durante el proceso de maduración en enterocitos, la SCV interactúa transitoriamente con la ruta endocítica temprana ya que rápidamente gana y pierde marcadores endocíticos como EEA1, Rab5, Rab11 y el receptor de transferrina (Smith *et al.*, 2005; Steele-Mortimer, 2008). Seguidamente, la SCV adquiere marcadores endosomales tardíos como Rab7, la ATPasa vacuolar y glicoproteínas lisosomales como LAMP-1 y LAMP-2 (Drecktrah *et al.*, 2005; Garcia-del Portillo and Finlay, 1995; Steele-Mortimer, 2008).

En células epiteliales la maduración de la SCV coincide con el desplazamiento físico de la misma hacia la región perinuclear de la célula, cerca del aparato de Golgi, donde la bacteria prolifera masivamente. Esta migración inicial de la SCV depende del reclutamiento de RILP ("Rab-7-interacting lysosomal protein") y del complejo dineína-dinactina (Harrison *et al.*, 2004). El posicionamiento de la SCV posterior en esta región y la proliferación de la bacteria, dependen principalmente de la acción de las proteínas efectoras de SPI-2, SseF, SseG y SifA (Abrahams and Hensel, 2006; Boucrot *et al.*, 2005; Deiwick *et al.*, 2006; Ramsden *et al.*, 2007; Salcedo and Holden, 2003), y además de la proteína efectora de SPI-1 SipA (Brawn *et al.*, 2007).

Interacción y comportamiento de *Salmonella* en los macrófagos

Las células fagocíticas de la lámina propia intestinal pueden considerarse como un punto crítico en el establecimiento de una infección por parte de *Salmonella* (Wick, 2004). Los macrófagos contribuyen de manera muy importante en la regulación de la respuesta inmunitaria por parte del hospedador durante las infecciones bacterianas a través de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y otros mediadores de la inflamación, que, contribuirán al reclutamiento de otras células implicadas en la respuesta inmunitaria y que, se requieren para controlar la infección si bien, a veces, pueden dar lugar a respuestas exacerbadas (Murtaugh *et al.*, 1996). Además, los macrófagos suponen un nicho replicativo para *S. enterica*, confiriendo la posibilidad de evadir la respuesta inmunitaria del hospedador y, en el caso de los serovares implicados en infecciones sistémicas, el acceso a otros órganos y tejidos diferentes del intestinal (Jones and Falkow, 1996).

Los macrófagos utilizan una gran variedad de mecanismos para contribuir a la eliminación bacteriana o el control de su replicación intracelular, entre los que se encuentran: enzimas lisosómicas como catepsinas, lipasas y lisozima, la generación de metabolitos reactivos de oxígeno (ROI o *Reactive Oxygen Intermediates*) (Vazquez-Torres and Fang, 2000), metabolitos reactivos de nitrógeno (RNI o *Reactive Nitrogen Intermediates*) (Mastroeni et al., 2000), proteasas y péptidos catiónicos (Amer and Swanson, 2002; Rosenberger et al., 2004), así como pH ácido. Todos estos mecanismos son “aplicados” dentro de compartimentos celulares degradativos que reciben el nombre de lisosomas (De Groote et al., 1995).

Un importante componente en la resistencia de ratones a la infección por *Salmonella* es controlado por el gen *Nramp1* (también conocido como *Slc11a1*) que codifica un transportador protón/cación divalente de tipo “antiporter” que regula la susceptibilidad a las infecciones por *Salmonella* spp., *Mycobacterium* spp. y *Leishmania* spp (Vidal et al., 1995). La expresión de *Nramp1* está restringida a células del linaje monocito/macrófago y se localiza en la membrana del fagosoma. *Nramp1* está relacionado con la capacidad del hospedador para controlar el crecimiento de *Salmonella*, pues restringe a la bacteria la captación de cationes divalentes (Gruenheid et al., 1997; Nairz et al., 2009). En consecuencia, los ratones *Nramp1*^{-/-} son más susceptibles a la infección por el serovar Typhimurium. La mayoría de información que se tiene sobre la patogénesis de *Salmonella* se ha obtenido principalmente de infecciones experimentales de ratones *Nramp1*^{-/-} susceptibles (BALB/c o C57BL/6).

La activación de macrófagos por citoquinas como TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) e IFN- γ (Interferón gamma), incrementa la capacidad de los mismos para controlar el crecimiento intracelular de *S. enterica* (Mastroeni et al., 1998; Okamura et al., 2005a; Vazquez-Torres and Fang, 2001), en el caso de IFN- γ , parece que cumple un importante papel en ratones infectados crónicamente, posiblemente estimulando la supresión de la replicación bacteriana por parte de los macrófagos ya que, si se neutraliza el IFN- γ , se produce una reactivación de la infección (Monack et al., 2004a). Otras citoquinas como IL-4 e IL-10, al contrario, actúan suprimiendo funciones

antimicrobianas de las células mononucleares (Arai *et al.*, 1995; Denich *et al.*, 1993).

La capacidad de los diferentes serovares de *Salmonella* para invadir, sobrevivir y replicarse en el interior de los macrófagos, así como, su capacidad citotóxica sobre este tipo celular, parece clave en su capacidad para producir enfermedad en diferentes especies animales (Alpuche-Aranda *et al.*, 1995).

Salmonella ingresa en los macrófagos a través de un proceso de invasión mediado por la bacteria que requiere la expresión del SST3-1 (Sistema de Secreción de Tipo 3 codificado por la SPI-1) o bien a través de fagocitosis de bacterias previamente opsonizadas (Brumell *et al.*, 1999).

Durante su vida intracelular, *Salmonella* permanece en el interior de la denominada SCV, un compartimento específico y unido a la membrana celular del que hablamos en apartados anteriores. El proceso de maduración de la SCV en células infectadas por *Salmonella* requiere la interacción secuencial y altamente selectiva con el sistema endosomal (Holden, 2002; Knodler and Steele-Mortimer, 2003), para que, finalmente, la SCV en el interior de macrófagos, se transforme en un nicho de replicación intracelular. Para ello, *Salmonella*, altera el tráfico endocítico, la membrana vacuolar, reorganiza el citoesqueleto de actina y los microtúbulos asociados a la vacuola mediante el SST3 de SPI-2. Todo esto genera alteraciones morfológicas del fagosoma que incluyen la polimerización de actina y la formación de Sifs alrededor de la SCV (Garvis *et al.*, 2001; Knodler and Steele-Mortimer, 2003; Uchiya *et al.*, 1999; Waterman and Holden, 2003).

Como se mencionó anteriormente, el ambiente fagosomal presenta un pH ácido, péptidos antimicrobianos e intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y nitrógeno (RNI) (García Vescovi *et al.*, 1996; Martín-Orozco *et al.*, 2006). *Salmonella* intracelular es capaz, mediante el SST3 de SPI-2, de evitar el reclutamiento de la NADPH-oxidasa en la membrana de la SCV, de esta manera, impide la generación de concentraciones bactericidas de ROI (Vazquez-Torres and Fang, 2000). De igual forma, SPI-2 está relacionada con la protección ante

los efectos dañinos de los RNI, pues la bacteria es capaz de reducir la colocalización de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) en la membrana de la SCV (Chakravortty *et al.*, 2002). Además, el ambiente ácido de la SCV induce varios sistemas reguladores que ayudan a la supervivencia intracelular de la bacteria. Entre estos sistemas encontramos OmpR-EnvZ, PhoP-PhoQ, RpoS/RpoE, PmrA/PmrB, Cya/Cyp que confieren resistencia ante péptidos antimicrobianos y stress oxidativo (Bearson *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1992; Gunn *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 1989; Nickerson and Curtiss, 1997; Testerman *et al.*, 2002).

La infección de macrófagos con *Salmonella* estimula un programa de muerte de la célula hospedadora conocido como piroptosis, dependiente de caspasa 1. A diferencia de la apoptosis, la piroptosis es un proceso de muerte celular que produce la activación de caspasa 1 y una respuesta inflamatoria importante para la protección del hospedador (Fink and Cookson, 2007). La activación de caspasa 1 en macrófagos infectados con *Salmonella* produce la activación de las citoquinas IL-1 β e IL-18 y la liberación de contenidos intracelulares inflamatorios que resultan de la lisis celular (Brennan and Cookson, 2000; Fantuzzi and Dinarello, 1999; Hersh *et al.*, 1999; Monack *et al.*, 2001). El serovar Typhimurium puede causar piroptosis rápida tras la infección de macrófagos (aproximadamente 45 minutos post-infección) que es dependiente del SST3 de SPI-1 y flagelina. Además, después de 24 horas de infección *in vitro*, se puede activar una piroptosis retardada del macrófago dependiente de caspasa-1 que requiere el SST3 de SPI-2, el receptor tipo Toll 4 (TLR4) y los genes *spv* (Cook *et al.*, 2007; Libby *et al.*, 2000; Monack *et al.*, 2001; van der Velden *et al.*, 2003).

Al hablar de la interacción *Salmonella*-macrófago no debemos olvidar que se trata de una relación altamente dependiente en el binomio patógeno-hospedador, así, los diferentes estudios realizados hasta la fecha utilizando distintos serovares patógenos de *S. enterica* y líneas celulares que provenían de diversas especies animales arrojan resultados muy distintos y en ocasiones contradictorios. Por ejemplo, en estudios realizados *in vitro*, *S. Typhimurium* puede persistir en grandes cantidades al infectar líneas celulares primarias de macrófagos murinos en contraste con *S. Typhi*, que parece persistir

en líneas celulares de macrófagos humanos (Alpuche-Aranda *et al.*, 1995; Ishibashi and Arai, 1996; Lissner *et al.*, 1985; Schwan and Kopecko, 1997; Vladoianu *et al.*, 1990). Estos datos guardan relación con el hospedador al que cada serovar parece más adaptado, sin embargo, la persistencia relativa de ambos serovares en experimentos con macrófagos humanos varía considerablemente en función del estudio (Alpuche-Aranda *et al.*, 1995; Buchmeier and Heffron, 1989b; Ishibashi and Arai, 1996; Okamura *et al.*, 2005a; Pietila *et al.*, 2005; Schwan *et al.*, 2000a). Las diferencias encontradas, pueden deberse a multitud de factores que varían entre un estudio y otro como, el opsonizar las bacterias antes de la infección, el grado de activación de los macrófagos, características propias del binomio patógeno-hospedador como el fondo genético de las líneas celulares, el serovar utilizado y, por supuesto, el uso de cultivos primarios o bien de líneas celulares, estas últimas más permisivas para fenómenos de persistencia y proliferación de *Salmonella* (Schwan *et al.*, 2000a).

Experimentos de invasión *in vitro* de líneas macrofágicas alveolares porcinas con diferentes serovares de *S. enterica*, muestran que no existe correlación invasión-virulencia entre estos estudios *in vitro* y, los realizados *in vivo* (Watson *et al.*, 2000). En este caso, los serovares *S. Dublin* y *S. Typhimurium* produjeron un daño macrofágico mucho mayor que el serovar *Choleraesuis*, a diferencia de lo que ocurre en las infecciones *in vivo*. Esta diferencia de citotoxicidad mediada por los diferentes serovares de *Salmonella*, al igual que su capacidad para invadir, sobrevivir y replicarse en distintas líneas y cultivos celulares primarios que proceden de distintos hospedadores, podría ser clave a la hora de explicar cómo causan enfermedad en los hospedadores a los que están adaptados, más que establecer una relación directa entre la destrucción celular y la virulencia de ese determinado serovar para un hospedador en cuestión (Schwan *et al.*, 2000a).

En último lugar, la interacción *Salmonella*-macrófago describe también un fenómeno cuya naturaleza sigue siendo una incógnita, la persistencia, con la consecuente aparición de hospedadores que actúan a modo de reservorio (Blaser and Kirschner, 2007). En el caso del serovar *Typhimurium* se ha visto cómo persiste en

macrófagos a nivel de los linfonódulos mesentéricos hasta un año después de la infección a pesar de que existan altos niveles de anticuerpos séricos frente a la bacteria (Monack *et al.*, 2004a). En el caso de los serovares Typhi y Dublin, su persistencia se ha relacionado con infecciones crónicas de la vesícula biliar, de muy difícil acceso para el sistema inmunitario (Buchwald and Blaser, 1984; Tischler and McKinney). Sin embargo, un estudio en chimpancés demostró que *S. Typhi* aparecía exclusivamente a nivel de los linfonódulos mesentéricos cincuenta días post-infección (Gaines *et al.*, 1968), por lo que, quizás también para *S. Typhi* en el hospedador humano el lugar de persistencia sean los LMN y, es posible que un cambio en el status inmunitario del hospedador reactive la infección y, la redistribuya hacia el hígado y vesícula biliar, desde dónde volvería a acceder al intestino y se eliminaría con las heces (Monack *et al.*, 2004b).

Comportamiento de *Salmonella* en el interior de células dendríticas

Nada más invadir las células dendríticas *Salmonella* se mantiene en un estado no proliferativo pero activo en la expresión de genes de SPI-2. Sin embargo, la expresión de la mayoría de los factores de virulencia, incluyendo SPI-2 y el sistema PhoP-PhoQ, no son necesarios para la supervivencia intracelular (García-Del Portillo *et al.*, 2000; Jantsch *et al.*, 2003; Niedergang *et al.*, 2000).

Aunque la infección con *Salmonella* induce la maduración de la célula dendrítica, se reduce la presentación de antígenos de la bacteria a las células T a través de las moléculas MHC de clase I y II (Alaniz *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2000; Tobar *et al.*, 2006; Tobar *et al.*, 2004). *Salmonella* es capaz de modificar el tráfico vesicular en la célula dendrítica y así evitar la fusión de la SCV con el compartimento lisosomal, de esta manera la bacteria impide el procesamiento de antígenos evitando la ruta lisosomal de degradación (Jantsch *et al.*, 2003; Tobar *et al.*, 2004). SPI-2 media la reducción de la presentación de antígenos y la proliferación de células T, evitando así la generación de una respuesta inmunitaria específica hacia *Salmonella* (Cheminay *et al.*, 2005; Tobar *et al.*, 2006).

Del mismo modo que ocurre en macrófagos, *Salmonella* induce la muerte celular de células dendríticas tras su infección. En este tipo celular, este proceso es dependiente de SPI-1 y requiere la activación de caspasa-1, no obstante, es independiente de SPI-2 (van der Velden *et al.*, 2003).

Interacción de *Salmonella* con los fibroblastos

En la lámina propia intestinal encontramos diferentes subpoblaciones de fibroblastos (Adegboyega *et al.*, 2002) que cumplen un papel fundamental en la movilidad intestinal, diferenciación y proliferación de células epiteliales y del parénquima intestinal, así como la modulación de la respuesta inmunitaria a través de la liberación de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y otras moléculas inmunomoduladoras (Buckley *et al.*, 2001; Powell *et al.*, 1999a, b). Los fibroblastos pueden considerarse como potenciales células hospedadoras para los distintos serovares de *S. enterica* tanto por su localización anatómica, próxima al lugar de entrada del patógeno, como por la eficiente invasión de estas células observada *in vitro* (Cano *et al.*, 2001b).

Mediante experimentos de infección experimental *in vitro* utilizando el serovar *S. Typhimurium* y las líneas celulares 3T3 (fibroblastos murinos) y NRK (fibroblastos procedentes de riñón de rata) se observó cómo la viabilidad de las bacterias disminuía tras la infección. Por ello, se pensó que estas líneas celulares no fagocíticas no sólo no eran permisivas en el establecimiento de una infección por *Salmonella* sino que además, eran capaces de establecer una respuesta encaminada a la destrucción de las bacterias invasoras (Martinez-Moya *et al.*, 1998; Saarinen *et al.*, 1996). Incluso, en el caso de infecciones experimentales realizadas *in vivo* con *S. Typhimurium* en tejido intestinal de origen bovino, únicamente se encontraron bacterias en células epiteliales, macrófagos y neutrófilos (Santos *et al.*, 2002).

Actualmente, sin embargo, se sabe que *S. enterica* puede invadir los fibroblastos, pero lo hace adaptándose a un estado de "semidehiscencia", caracterizado por una baja tasa de crecimiento (Cano *et al.*, 2001b). Este hallazgo es sorprendente, pues la

virulencia de las bacterias intracelulares generalmente se asocia con la promoción de la supervivencia y de la proliferación en las células del hospedador.

Durante la interacción *Salmonella*-fibroblasto ambas partes cumplen un importante papel en el que los fibroblastos no son células fagocíticas profesionales pero pueden establecer una respuesta inmunitaria antibacteriana incrementando, por ejemplo, los niveles de óxido nítrico intracelulares en presencia de serovares patógenos de *Salmonella* (Eriksson *et al.*, 2000) y la bacteria modula su crecimiento al infectar los fibroblastos de tal manera que se liberan productos bacterianos encaminados a evitar un sobrecrecimiento bacteriano.

Parece que *S. enterica* sería capaz de "reconocer" los diferentes tipos celulares y adaptar su respuesta proliferativa en consecuencia. Al utilizar mutantes de *S. Typhimurium* defectivos en aquellos genes implicados en la supervivencia y proliferación intramacrofágica como *phoP-phoQ*, *slyA*, *spvR* y *rpoS*, en la infección experimental de fibroblastos de ratón, se observó un sobrecrecimiento en todos los casos, más acusado en los mutantes en *PhoP-PhoQ* (Cano *et al.*, 2001b). Este sobrecrecimiento bacteriano podría derivar en la lisis celular y la consiguiente liberación extracelular de las bacterias que podrían ser captadas por células fagocíticas, perdiendo viabilidad rápidamente.

Teniendo en cuenta los datos anteriores sumados a que los fibroblastos infectados mantienen su integridad y viabilidad durante largos periodos de tiempo (Cano *et al.*, 2003), parecen indicar que son un tipo celular candidato para actuar a modo de reservorio en infecciones persistentes de *S. enterica*, que se adaptaría mediante una disminución de su tasa de crecimiento (regulada por PhoP-PhoQ, SlyA, RpoS y SpvR) y el mantenimiento de su viabilidad intracelular (a través de RpoE y el SST3-2) (Cano *et al.*, 2001b).

5. Vacunas frente a *salmonella* spp

Las primeras vacunas frente a *Salmonella spp* se describieron en 1951 (Bacon *et al.*, 1951) cuando mutantes auxótrofos con requerimientos de purinas, ácido p-aminobenzoico y aspartato mostraron una reducción de su virulencia en el modelo murino. Desde entonces, un gran número de cepas atenuadas pertenecientes a multitud de serovares patógenos de *Salmonella spp* se han descrito y utilizado como vacunas.

El profundo conocimiento de las bases genéticas de la patogenicidad de *Salmonella* ha permitido el desarrollo de mutantes por delección de genes que se relacionan con la virulencia de la bacteria, lo que constituye la base para la construcción de vacunas vivas atenuadas a partir de este género bacteriano (Fields *et al.*, 1986). Este tipo de vacunas cuenta entre sus ventajas su capacidad inmunogénica en la estimulación de respuestas inmunológicas de base humoral, celular y a nivel de mucosas, ya que imitan el comportamiento del patógeno al administrarse por vía oral, lo que evita la aparición de reacciones adversas por inoculación. Suelen ser efectivas con una única administración, son económicas, ya que los costes de producción y almacenaje se reducen gracias a su mantenimiento como fórmulas liofilizadas que se reconstituyen antes de su uso y, por último, son vectores potenciales para la liberación de vacunas de ADN y de antígenos heterólogos.

A lo largo de los años se han desarrollado multitud de mutantes atenuados, entre ellos, mutantes sensibles a la temperatura (Gherardi *et al.*, 1993a; Gherardi *et al.*, 1993b), mutantes dependientes de estreptomina (Levine *et al.*, 1976), mutantes auxótrofos dependientes para su persistencia y multiplicación en los tejidos del hospedador de diferentes metabolitos no existentes en dichos tejidos (Bacon *et al.*, 1950; Clements, 1987; Dougan *et al.*, 1988; Harrison *et al.*, 1997; Hoiseth and Stocker, 1981; Hormaeche, 1991; Killar and Eisenstein, 1985; O'Callaghan *et al.*, 1988; O'Callaghan *et al.*, 1990), mutantes defectivos en *htrA* (Johnson *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1990), mutantes defectivos en la enzima *galE* (Germanier and Furer, 1971), mutantes defectivos en los genes *cya* y *crp* (Curtiss *et al.*, 1988; Curtiss and Kelly, 1987), mutantes en *Omp* (Dorman *et al.*, 1989; Pickard *et al.*, 1994), mutantes en el gen *waaN* (Khan *et al.*, 1998b), mutantes defectivos en los genes *recA* o

recB (Buchmeier *et al.*, 1993), mutantes que carecen del locus *guaBA* (Pasetti *et al.*, 1999), mutantes defectivos en el gen *nuoG* (Zhang-Barber *et al.*, 1998), mutantes con delección en el gen *SurA* (Sydenham *et al.*, 2000), mutantes defectivos en el regulador Dam (ADN adenina metilasa) (Heithoff *et al.*, 1999) y mutantes por delección del gen *asd* (Curtiss and Kelly, 1987). Los mutantes atenuados pueden combinar más de una de estas mutaciones con el fin de aumentar su atenuación.

Por su relevancia en nuestro trabajo destacamos dos de estos mutantes por delección. Por un lado, los mutantes deficientes en *phoP/phoQ*, regulador central de la virulencia de *Salmonella spp.*, y como hemos comentado anteriormente, encargado de la activación y represión de una gran cantidad de genes relacionados con la supervivencia y virulencia bacterianas (Miller, 1991). Las cepas de *Salmonella* defectivas en *phoP* así como aquéllas que lo expresan de forma constitutiva son atenuadas en el ratón, dónde parece que son capaces de estimular una respuesta inmunitaria humoral y celular frente a *Salmonella* (Galan and Curtiss, 1989; Miller, 1991). Una cepa Δ *phoP/phoQ* construida a partir de *S. Typhi* demostró ser segura e inmunogénica en voluntarios humanos, mientras otra cepa Δ *aroA* Δ *phoP/phoQ* construida también en *S. Typhi* resultó atenuada en exceso y muy poco inmunogénica (Hohmann *et al.*, 1996a; Hohmann *et al.*, 1996b). Por otro lado, los mutantes defectivos en *rpoS* o factor sigma alternativo, importante en los procesos de resistencia bacteriana frente a condiciones de stress y en la virulencia en el ratón (Coynault *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 1992), han mostrado defectos de colonización en órganos linfoides y en el establecimiento de infección sistémica en animales y humanos (Coynault *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 1992).

6. Inversión de la patogenicidad, uso de la maquinaria de *Salmonella* con fines terapéuticos

La capacidad de reversión de la patogenicidad de las bacterias para emplearse con fines terapéuticos y profilácticos, se basa en una serie de características comunes a las bacterias atenuadas (Loessner *et al.*, 2008) como es su capacidad de replicación en los tejidos del hospedador en mayor o menor grado manteniendo propiedades como

el tropismo celular, la diseminación célula a célula o la diseminación sistémica, que favorecen el establecimiento de una correcta inmunización, si bien, su atenuación es también un medio de control de su crecimiento ya que, generalmente, dicha atenuación es el resultado de una delección en genes relacionados con el metabolismo o la patogenicidad. Gracias a que las bacterias atenuadas migran a zonas inductoras del sistema inmunitario y a que poseen macromoléculas inmunoestimuladoras como el LPS o secuencias CpG no metiladas que actúan a modo de adyuvantes naturales, se utilizan a modo de vacunas a nivel de las mucosas, que generan una respuesta inmunitaria no sólo en el punto de inoculación sino a nivel sistémico (Holmgren and Svennerholm, 1992; McGhee and Kiyono, 1992; Medina and Guzman, 2000).

El uso más extendido de cepas bacterianas vivas atenuadas basadas en *Salmonella* ha sido la elaboración de vacunas frente a diversas enfermedades infecciosas y, más recientemente, el tratamiento antitumoral y la terapia génica (Moreno *et al.*). Las estrategias escogidas para desarrollar los vectores vacunales, antitumorales o moduladores genéticos han sido la utilización como vehículos de vacunas de ADN (bactofección) y la liberación de antígenos heterólogos incluidos en monocopia en el cromosoma bacteriano.

La bactofección es un término que se aplica al uso de bacterias intracelulares atenuadas como vectores para la liberación de vacunas de ADN, con su uso, se evita la baja inmunogenicidad que constituye el principal problema asociado a las vacunas de ADN desnudo, relacionada con una activación inadecuada de las células presentadoras de antígeno, por lo que el antígeno portado no se libera en el contexto de una señal adecuada (Lowe *et al.*, 2006). Para obtener mejores resultados, se han utilizado bacterias intracelulares atenuadas, que obtienen niveles adecuados y mantenidos de expresión proteica en los lugares de inducción idóneos. Estas bacterias actúan a modo de vectores para los plásmidos que contienen los genes heterólogos, insertados bajo el control de un promotor eucariota que permite la expresión proteica en las células del hospedador (Davis, 1997; Liu, 2003). Dado que el uso de la bactofección es relativamente reciente, sólo unas pocas cepas bacterianas atenuadas han sido evaluadas para este uso y entre ellas

destacan notablemente los resultados obtenidos con *Salmonella spp* (Moreno et al., ; Schoen et al., 2004; Vassaux et al., 2006). Una de las más prometedoras aplicaciones de estos vehículos basados en *Salmonella* es su uso en la lucha contra el cáncer (Chabalgoity et al., 2002). Al hablar de la vacunación contra el cáncer, debemos de tener presentes ciertas dificultades de partida como la poca inmunogenicidad de los antígenos asociados a las células tumorales, la alta frecuencia de mutaciones que presentan y que, además, suelen producir una supresión de la respuesta inmunitaria a nivel celular (Chabalgoity et al., 2002). El uso de vacunas de ADN que portan autoantígenos, y cuya función consistiría en evitar el efecto de inmunotolerancia por parte de las células T, induciendo una inmunidad antitumoral, es una nueva y prometedora aproximación en la lucha contra el cáncer (Bueno et al., 2009). La liberación de vacunas de ADN utilizando la bacto-fección para el tratamiento de ciertos tipos de tumores como melanomas, neuroblastomas y adenocarcinomas, ha sido utilizada con éxito en modelos animales (Huebener et al., 2003; Xiang et al., 2000). Además, el crecimiento tumoral y las metástasis se han tratado de manera experimental "atacando" su fuente de alimentación, así, vacunas de ADN vehiculizadas por *Salmonella* y que portaban factores antiangiogénicos, produjeron un colapso de los vasos tumorales impidiendo el abastecimiento nutricional del tumor (Lu et al., 2008; Niethammer et al., 2001; Reisfeld et al., 2004; Ruan et al., 2009; Xiang et al., 2000; Xiang et al., 2008). Otra aplicación de las vacunas de ADN basadas en *Salmonella*, consiste en liberar anticuerpos frente a moléculas superexpresadas por macrófagos asociados a las células tumorales, evitando así, la proliferación tumoral y metástasis (Luo et al., 2006). La combinación de la quimioterapia junto con la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer es un campo interesante y novedoso donde la bacto-fección podría jugar un papel preponderante. También, vacunas de ADN liberadas por *Salmonella* se han utilizado en terapia génica, para corregir defectos genéticos en macrófagos (Montosi et al., 2000) y en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias como la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (Jun et al., 2005; Ochoa-Reparaz et al., 2007; Ochoa-Reparaz et al., 2008). Por último, existen otros usos potenciales muy atractivos, como su aplicación como base para vacunas frente a agentes utilizados en bioterrorismo tales como

Yersinia pestis, *Bacillus anthracis* y *Francisella tularensis*, gracias a su facilidad de uso para establecer vacunaciones en masa. (Garmory *et al.*, 2005).

Otra estrategia diferente en la construcción de vacunas basadas en *Salmonella spp* consiste en la integración en el cromosoma bacteriano del ADN responsable de la codificación de los antígenos heterólogos, de esta manera se pueden evitar ciertas desventajas relacionadas con el uso de plásmidos como la inestabilidad relativa de las construcciones, la necesidad de presión selectiva (Garmory *et al.*, 2003a; Haga *et al.*, 2006; Isoda *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007) o la posible interferencia en el proceso de colonización de los tejidos del hospedador *in vivo* (Coulson *et al.*, 1994). Si bien, conlleva la limitación de inducir niveles de expresión antigénica bastante bajos al producirse dicha expresión a partir de un único *locus* (Spreng *et al.*, 2006). Las cepas atenuadas de *Salmonella spp* han demostrado ser excelentes vehículos para antígenos heterólogos de variados orígenes: bacterianos, víricos, parasitarios e incluso derivados de células tumorales, estimulando respuestas inmunitarias a nivel local (mucosal) y sistémico frente a los antígenos y el propio vehículo vacunal en varios modelos animales (Echchannaoui *et al.*, 2008; Kulkarni *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Spreng *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008) Para lograr incrementar la eficiencia de los vehículos podemos actuar sobre el control de la expresión del antígeno o bien, sobre su forma de liberación. Los mecanismos utilizados para mejorar los niveles de expresión de los antígenos heterólogos pretenden no sólo aumentar dicha expresión sino que, además, buscan controlarla desde un punto de vista espacio-temporal. Para ello se han empleado promotores inducibles *in vivo*, que limitan la expresión del antígeno a un nicho específico, idealmente, cuando la bacteria ingrese en las células presentadoras de antígeno. De esta manera, el fenómeno de expresión no interfiere con el proceso de invasión bacteriana, al contrario de lo que sucede cuando se emplean promotores de expresión constitutivos (Bumann, 2001). Algunos de estos promotores inducibles *in vivo* son los de los genes: *nirB*, *dmsA*, *pagC*, *spv*, *dps*, *phoP*, *ompC*, *htrA*, *groE*, *katG*, *sseA* y *ssaG*, todos ellos han sido utilizados con diferentes resultados, si bien tienen en común que han mejorado la respuesta inmunitaria frente a los antígenos heterólogos portados por diferentes serovares de *Salmonella* en

modelos animales (Bullifent *et al.*, 2000; Everest *et al.*, 1995; Hohmann *et al.*, 1995; Husseiny and Hensel, 2005; Marshall *et al.*, 2000; Orr *et al.*, 2001; Oxeer *et al.*, 1991). Por su importancia en el desarrollo de nuestro trabajo nos gustaría destacar a dos de estos promotores inducibles *in vivo*: el promotor de *pagC*, que se activa al infectar macrófagos, cuya expresión está controlada por el sistema regulador de dos componentes PhoP/PhoQ y, al utilizarse en *Salmonella*, se ha observado cómo proporciona un estable y elevado nivel de expresión de los antígenos heterólogos (Bullifent *et al.*, 2000; Chen and Schifferli, 2001; Dunstan *et al.*, 1999; Hohmann *et al.*, 1995), y el promotor de *ssaG*, que se localiza en la SPI-2 del cromosoma de *Salmonella enterica* y forma parte de un SST3 que participa en la adaptación del patógeno al microambiente de la SCV en el interior de las células de los mamíferos (Shea *et al.*, 1996), dependiendo su regulación fundamentalmente del sistema de dos componentes SsrA-SsrB (Xu and Hensel). Se ha descrito en el serovar Typhimurium que ambos promotores regulan la expresión de antígenos heterólogos situados bajo su control, activándose cuando *Salmonella* accede al nicho intracelular, no interfiriendo con la invasión bacteriana y alcanzando unos niveles de expresión antigénica elevados, facilitando el establecimiento de una respuesta inmunitaria eficaz (McKelvie *et al.*, 2004).

7. Nuevas mejoras en la utilización de *Salmonella* como vehículo vacunal

Las cepas vacunales de *Salmonella* deben presentar un equilibrio entre su atenuación e inmunogenicidad. Generalmente, uno de estos factores suele actuar en detrimento del otro, es decir, a más atenuación menos inmunogenicidad y viceversa. Para intentar solventar este problema, una nueva generación de vacunas basada en bacterias, recurre a la combinación de varias deleciones en genes de virulencia reguladas por un promotor dependiente de un azúcar (arabinosa) que no se encuentra en el interior de los organismos y que permite por tanto ejercer lo que se ha denominado una regulación retardada de la atenuación, es decir, las bacterias se atenuarán exclusivamente cuando no detecten la presencia de arabinosa, después de invadir los tejidos del hospedador, mostrando un fenotipo similar al silvestre durante la invasión de los mismos

(Curtiss *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2008). Esta atenuación retardada ha sido perfeccionada para conseguir una lisis programada de las bacterias en los tejidos del hospedador, lo que garantizaría una contención biológica mediante un complejo sistema que combina las deleciones cromosómicas reguladas por la disponibilidad de arabinosa y un plásmido que actúa a modo de segundo mecanismo regulador para garantizar dicha lisis (Kong *et al.*, 2008). Vacunas con atenuación retardada han mostrado ser seguras en animales que contaban con sólo 24 horas de vida (Gunn *et al.*).

8. Problemas que puede conllevar el uso de *Salmonella* como vehículo vacunal y sus posibles soluciones

El uso de bacterias atenuadas basadas en *Salmonella* como vehículos vacunales no está exento de controversia debido a factores como la reversión a la virulencia o su posible reactogenicidad, por ello, sólo aquellas cepas mutantes que presenten un perfil de bioseguridad adecuado podrán ser utilizadas con fines vacunales (Dominguez-Bernal *et al.*, 2008). El estudio de la bioseguridad mediante experimentos *in vivo* en el hospedador debe realizarse en hospedadores adecuados, ya que serovares diferentes de *Salmonella* aún con las mismas mutaciones, pueden mostrar un comportamiento distinto debido a su perfil de virulencia específico para cada hospedador. La introducción de más de una deleción puede eliminar prácticamente el riesgo de reversión a la virulencia debido a recombinaciones o a transferencia genética horizontal (Datsenko and Wanner, 2000). Otro factor importante a tener en cuenta es que, como bacteria enteropatógena, a la hora de administrar *Salmonella* como vehículo vacunal, se debe ajustar su dosis en función del área geográfica, es decir, hay que distinguir entre zonas endémicas y no endémicas. Así, en zonas donde pueda darse una cierta inmunidad pre-existente por la continua exposición al patógeno, las dosis requeridas pueden ser más elevadas que en aquellas zonas no endémicas, donde dosis elevadas podrían predisponer a reacciones adversas (Frey, 2007). Además, si se utilizan plásmidos en el desarrollo de los vehículos vacunales éstos deben ser estables, la estabilidad plasmídica puede conseguirse aplicando diversas técnicas como marcadores de selección con resistencia antibiótica, que van

siendo sustituidos por otro tipo de marcadores menos problemáticos y que permiten el desarrollo de formulaciones vacunales con fines comerciales, el uso de vectores de bajo número de copias y la inclusión de “vectores suicidas” (Galen *et al.*, 1999; Tzschaschel *et al.*, 1996). También se obtienen vehículos vacunales más estables mediante el uso de cassettes inmunogénicos que codifican antígenos heterólogos y que se integran en el cromosoma bacteriano (Klee *et al.*, 1997).

Otro aspecto a tener en cuenta, es la posible transferencia genética horizontal entre las bacterias vacunales y las comensales o microorganismos del medio ambiente, que puede significar un riesgo medioambiental, por ello, el uso de sistemas que minimicen la transferencia genética horizontal desde la cepa vacunal a la microflora mucosal o hacia microorganismos del medio ambiente es fundamental (Diaz *et al.*, 1994; Munthali *et al.*, 1996).

Varios trabajos destacan la preocupación por la inmunidad preexistente, es decir, la posibilidad de que exposiciones previas al vector bacteriano puedan comprometer la eficacia de la vacuna, que ha sido observada en *Salmonella spp.* Sin embargo, no está del todo caracterizada (Attridge *et al.*, 1997). En todo caso, para contrarrestar este efecto, se ha propuesto el uso de distintos serovares de *Salmonella* y el uso de formulaciones vacunales diferentes en revacunaciones sucesivas si bien, son necesarios estudios complementarios para aclarar y discernir la capacidad inmunosupresiva de *Salmonella*, lo cual no sólo mejorará el conocimiento sobre su patogénesis sino que también se podrá utilizar con fines vacunales (Attridge *et al.*, 1997; Attridge and Vindurampulle, 2005; Gahan *et al.*, 2008). Otros problemas como el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad, derivados del uso de cepas bacterianas vivas atenuadas como vehículos vacunales para vacunas de ADN es un fenómeno que no está demostrado. En el modelo murino de infección experimental se observaron anticuerpos anti-ADN a muy bajos niveles y de manera transitoria, si bien no aparecieron síntomas de autoinmunidad (Griffiths, 1995). En cuanto al riesgo asociado a la posibilidad de que las vacunas de ADN puedan integrarse en los cromosomas del hospedador, en ninguno de los

ensayos llevados a cabo se ha observado nada parecido (Ledwith *et al.*, 2000).

Por último, factores genéticos asociados al hospedador, parecen constituir un factor clave al desarrollar un vehículo vacunal basado en *Salmonella*, así, en el caso del ratón, se ha observado que la diversidad genética del haplotipo H2 puede influir el sesgo de la respuesta inmunitaria, al inmunizar los animales con cepas de *S. Typhimurium* (Lo-Man *et al.*, 1996). También en el modelo murino en el caso del serovar Typhimurium, se ha observado que la replicación bacteriana temprana es controlada por el gen *Nramp1* (*Natural resistance associated macrophage protein*), que participa en la respuesta inmunitaria frente a los antígenos recombinantes portados por esta cepa (Soo *et al.*, 1998), por ello, el genotipo del hospedador puede influir en el tipo de respuesta inmunitaria que encontremos.

2 OBJETIVOS

Según el primer informe español de prospectiva del OPTI (Observatorio de Prospectiva Tecnológica Industrial) sobre el impacto de la biotecnología en el sector sanitario, el desarrollo de nuevos vectores vacunales constituye una de las tecnologías con mejor posición competitiva en el área de la investigación biosanitaria para un gran número de aplicaciones. Las dos últimas décadas han proporcionado avances significativos en el diseño de vacunas, alguno de los cuales ha permitido licenciar nuevas vacunas, entre ellas, cepas vacunales vivas atenuadas para su uso en el hombre y los animales (Dietrich et al., 2003a). Sin embargo, otras tecnologías desarrolladas, como las denominadas “vacunas de ADN” que consisten en administrar mediante la aplicación de ADN “desnudo” vectores de expresión eucariotas que codifican uno o varios antígenos, a pesar de los enormes esfuerzos de investigación, parece que continuarán sin ser aplicadas en los próximos años. El empleo de bacterias vivas atenuadas como vehículos de transporte de vacunas de ADN o de expresión de antígenos heterólogos constituye una excelente alternativa que se aprovecharía de la actividad inmunoestimuladora inherente a las bacterias. Además, la posibilidad de aplicar las vacunas por la vía oral, que permitiría liberar específicamente los vectores a las células presentadoras de antígenos situadas en las mucosas, su fácil y económica producción junto con la facilidad de su administración, en mezcla con los alimentos, la convierten en una estrategia muy atractiva para la inmunización en masa de gran número de animales domésticos.

Como consecuencia de lo descrito hasta el momento, con el objetivo final de desarrollar una nueva cepa viva atenuada de *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis como vehículo para vacunas de ADN y/o expresión de antígenos heterólogos, diseñada específicamente para su empleo en cerdos, nos propusimos en esta tesis los siguientes objetivos:

1. Desarrollar nuevas cepas vivas atenuadas de *S. Choleraesuis*. La utilización de cepas de *S. enterica* atenuadas como vehículos de antígenos heterólogos se ha caracterizado con precisión en el modelo tifoideo murino. En nuestro caso, hemos elegido

S. Choleraesuis como vehículo vacunal debido a su tropismo adaptado al hospedador porcino.

2. Aplicar las cepas atenuadas, validadas como vehículos vacunales de ADN "a la carta" y de administración oral, con un antígeno modelo.
3. Aplicar las cepas atenuadas, validadas como vehículos de transporte y expresión de un antígeno heterólogo modelo de expresión controlada espacio-temporalmente desde un punto de vista de la respuesta inmunitaria.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Estirpes bacterianas y plásmidos

Todas las estirpes de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Choleraesuis, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli* y los plásmidos utilizados para el desarrollo de este trabajo se recogen en las tablas 1 y 2 del Anexo 1.

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia fueron los siguientes: anticuerpo policlonal de conejo anti-LPS del serovar Typhimurium grupo B, (laboratorios BD), que se usó a una dilución 1/500 en la solución correspondiente y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD14 porcino (clon MIL-2, Abd serotec), utilizado a una dilución 1/20.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron el anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes), a una dilución 1/500, el anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes) a una dilución 1/500 y el anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con Alexa 594 (Molecular Probes), a una dilución 1/500.

Los anticuerpos primarios utilizados para los ensayos de expresión *in vitro* mediante la técnica "Western-Blot" (WB) fueron el anticuerpo Anti-3xFLAG M2, anticuerpo monoclonal de la casa comercial SIGMA (IgG₁ aislado de líquido ascítico de ratón) el anticuerpo Anti-OmpA, anticuerpo policlonal purificado desarrollado por la casa comercial Immunostep (inmunización de conejos con un péptido de 13 aminoácidos de OmpA y adyuvante de Freund completo) y el anticuerpo Anti β -Tubulina, anticuerpo monoclonal (Clon 2.1), SIGMA.

Para la técnica de WB, los anticuerpos secundarios utilizados fueron el anti-ratón IgG conjugado con Peroxidasa (SIGMA) y el anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (SIGMA).

Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en el desarrollo de este trabajo han sido las siguientes: *DpnI*, reconoce el ADN metilado y lo digiere, *BamHI*, *SfiI*, *BsIII*, *NotI* y la *T4* ADN ligasa. Todas las enzimas de restricción pertenecen a la casa comercial *New England Biolabs* y han sido utilizadas siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2. MEDIOS, SOLUCIONES Y CONDICIONES DE CULTIVO

El medio Luria y Bertani (LB) fue utilizado como medio rico en nutrientes (Lennox, 1955). Se compone de 10g/l de peptona, 5g/l de extracto de levadura y 5g/l de NaCl. Para el crecimiento de colonias bacterianas en medio sólido se añadió agar a una concentración de 15 g/l. Los medios se suplementaron con los antibióticos ampicilina (50 µg/ml) o kanamicina (30 µg/ml) cuando fue necesario.

Durante el desarrollo de los experimentos de aislamiento y detección de *Salmonella* en heces previos a los ensayos de cálculo del índice de competición en el modelo porcino de infección, se aislaron las bacterias de acuerdo a la norma ISO-6579 de detección de *Salmonella* en muestras de heces para lo cual se utilizaron, un medio de enriquecimiento general, como es el agua de peptona, medios de preenriquecimiento selectivo, en primer lugar el caldo de tetrionato (contiene tiosulfato de sodio y sales biliares, selectivo para el desarrollo de las bacterias que poseen la enzima tetrionato reductasa entre las que se encuentra *Salmonella*) y, en segundo lugar, el caldo Rappaport-Vassiliadis-Soja, RVS (compuesto por cloruro de magnesio anhidro, peptona de soja y verde malaquita, selectivo para *Salmonella*). Por último, también se utilizaron medios sólidos selectivos para el crecimiento de *Salmonella* como el Agar Xilosa-lisina-Desoxicolato o XLD (medio desarrollado por Taylor para el aislamiento de *Shigella*, con tiosulfato de sodio, citrato férrico y rojo fenol utilizado en las pruebas ausencia-presencia de

Salmonella), el agar verde brillante o BGA (medio altamente selectivo para *Salmonella spp.*, excepto para los serovares Typhi y Paratyphi, con rojo fenol y verde brillante) y el agar SM2 o *Salmonella* Medium 2 (medio altamente selectivo para *Salmonella* con una mezcla cromógena que permite la diferenciación de este tipo bacteriano).

Adicionalmente, en la caracterización fenotípica de las cepas mutantes desarrolladas y en los experimentos de estabilidad plasmídica *in vivo*, se utilizaron algunos de los anteriormente mencionados medios además de medios no selectivos como agar sangre y medios específicos para bacterias gram negativas como el agar McConkey. Todos estos medios se encargaron a la casa comercial Biomerieux.

Para los lavados de las bacterias se utilizó fosfato salino tamponado (PBS) pH 7,4 compuesto por NaH_2PO_4 1,9mM, Na_2HPO_4 8,1mM y NaCl 154mM. Todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico procedentes de las siguientes casas comerciales: Sigma, Merck y Fluka.

Se utilizaron las tiras API 50 CH (Biomerieux) en la identificación fenotípica de las cepas bacterianas construidas en nuestro trabajo en comparación con la cepa parental de la que proceden y de la cepa vacunal comercial SC-54. Esta batería de pruebas bioquímicas fue utilizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las bacterias se incubaron a 37°C con agitación suave (180 rpm) o sin agitación dependiendo del ensayo. En algunos experimentos se eligieron otras temperaturas de incubación como 30°C cuando fueron necesarias.

3.3. GENÉTICA BACTERIANA

Electroporación bacteriana

Para la obtención de células electrocompetentes que posteriormente iban a ser utilizadas para mutagénesis mediante recombinación en un único paso (véase más adelante) se inocularon 5 ml de cultivo

saturado de bacteria [unas 3 densidades ópticas medidas a 600 nm (DO_{600})] en 150 ml de LB con ampicilina a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ y arabinosa al 0,2% del volumen final. A continuación, las células se incubaron durante unas 3 a 4 horas a 30°C (cuando las cepas contenían el plásmido termosensible pKD46) o bien a 37°C, en agitación suave (180 rpm), hasta que las bacterias alcanzaron una OD de 0,5-0,6, medida a 600 nm. Se enfrió el cultivo en hielo durante 10 minutos y, se recuperaron las bacterias por centrifugación (7000 rpm, 10 minutos, 4°C). Tras tres pasos de centrifugación y resuspensión en 50 ml y 25 ml de agua bidestilada fría, las bacterias se resuspendieron en un volumen de 1 ml de agua bidestilada. Finalmente, se centrifugaron y resuspendieron en un volumen de 50 μl de agua bidestilada fría. Para realizar la electroporación se mezclaron de 300 a 500 ng de ADN con 50 μl de bacterias electrocompetentes resuspendidas y tras introducir las en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de separación entre los electrodos (BIORAD) previamente enfriada se sometieron a un pulso eléctrico establecido por el programa Ec3 del electroporador *Micropulser* de la casa comercial BIORAD. Inmediatamente tras el pulso, se añadieron 800 μl de medio SOC (triptona 20%, extracto de levadura 5%, NaCl 0,58%, KCl 0,2%, MgCl_2 2%, MgSO_4 2,5%, glucosa 4%) a la cubeta de electroporación. Posteriormente, el contenido se trasladó a un tubo estéril de 1ml de capacidad que fue incubado a 37°C durante 1-2 horas en agitación suave. Tras la incubación, se realizó la siembra de 100 μl en medio sólido selectivo con antibiótico, y tras centrifugar los tubos durante 1 minuto a 14.000 rpm, para concentrar la muestra, se sembraron otros 100 μl . Reservamos 100 μl para sembrar nuevamente al día siguiente, tras 24 horas de incubación.

Todas las medidas para determinar las densidades ópticas (OD) de las bacterias se efectuaron con un espectrofotómetro *microplate Benchmark Plus* (BIO-RAD), siguiendo las indicaciones del fabricante y realizando las mediciones a una longitud de onda de 600 nm.

Generación de cepas mutantes atenuadas utilizando el sistema "one-step"

La generación de las cepas mutantes atenuadas por delección de los genes *rpoS* y *phoP* se llevó a cabo utilizando el protocolo "one-step", desarrollado y descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko and Wanner, 2000), con algunas modificaciones.

S. Choleraesuis transformada con el plásmido pKD46, fue cultivada y electroporada tal y como explicamos en el apartado anterior. Este plásmido es termosensible, replica a temperaturas inferiores a los 37°C y contiene el sistema λ -Red que permite la recombinación homóloga de un fragmento de PCR con secuencias homólogas al ADN cromosómico donde queremos introducirlo. Los protocolos de PCR para generar los fragmentos a integrar en el cromosoma bacteriano fueron estándar (Ausubel, 1992). Los productos de PCR empleados que contenían el gen de resistencia a la Km, flanqueado por sitios FRT de reconocimiento de la enzima Flipasa (FLP) y las secuencias flanqueantes de los genes a deleccionar, se consiguieron utilizando los primers *rpoS*-1D, *rpoS*-1R para obtener el mutante en *rpoS* ($\Delta rpoS$) y *phoP*-1D, *phoP*-1R para deleccionar *phoP* y obtener ($\Delta phoP$). Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos *rpoSN*-1D-*rpoSC*-1R y *phoP*-1D-*phoPC*-1R para analizar las construcciones realizadas. Todos los oligonucleótidos utilizados en nuestro trabajo se recogen en la Tabla A3 del Anexo 1.

Los productos de PCR fueron en primer lugar precipitados con el kit Pellet-Paint™ Co-Precipitant (Novagen), en segundo lugar, purificados de un gel de agarosa utilizando el kit SpinPrep™ Gel DNA (Novagen), a continuación, digeridos con la enzima de restricción *DpnI* para retirar posibles restos de ADN metilado, y por último, se realizó una nueva purificación con el kit SpinPrep™ PCR Clean-up (Novagen), utilizando como buffer de elución agua bidestilada.

Tras la electroporación con el producto de PCR purificado y tras la consiguiente incubación a 37°C, las bacterias se sembraron en medio LB agar enriquecido con el antibiótico Km (30 μ g/ml) para seleccionar las colonias Km^R. Todas las mutaciones fueron comprobadas por secuenciación automática de ADN (Secugen S. L., Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid) tras realizar una PCR estándar utilizando oligonucleótidos específicos.

Etiquetado de proteínas de *Salmonella*

Para la construcción de las estirpes $\Delta rpoS$ *pagC*::3xFLAG, $\Delta phoP$ *pagC*::3xFLAG, WT *pagC*::3xFLAG, $\Delta rpoS$ *ssaG*::3xFLAG, $\Delta phoP$ *ssaG*::3xFLAG y WT *ssaG*::3xFLAG se siguió el protocolo de etiquetado de genes en el cromosoma de *Salmonella* (Uzzau *et al.*, 2001), utilizando los oligonucleótidos pagCFLAG-1D, pagCFLAG-1R, ssaGFLAG-1D y ssaGFLAG-1R (descritos en la tabla A3 del Anexo I) y el plásmido pSUB11 como ADN molde. De este modo, mediante una PCR estándar pero con un tiempo de elongación de 1 hora, generábamos fragmentos de ADN que contenían en sus extremos la secuencia de los genes a etiquetar. También estos fragmentos contenían el gen de resistencia a la kanamicina, flanqueado por sitios FRT de reconocimiento de la recombinasa FLP. Los productos de PCR se introdujeron en el cromosoma tal y como se describe en el apartado anterior.

Retirada de los marcadores de resistencia antibiótica

Finalmente, una vez obtenidas las cepas delecionadas o marcadas en los genes de elección, se realizó una segunda transformación con el plásmido pCP20, que contiene la secuencia de la enzima recombinasa FLP, la cual, reconoce los sitios FRT que flanquean el cassette de resistencia a la Km, facilitando su retirada mediante recombinación entre las secuencias FLP (Cherepanov and Wackernagel, 1995).

Curvas de crecimiento bacteriana

Las curvas de crecimiento bacterianas desarrolladas en nuestro trabajo, se realizaron en matraces de 250 ml de medio de cultivo. Los medios se inocularon diluyendo en proporción 1:100 precultivos de 18 horas en LB que previamente se habían obtenido depositando una colonia fresca (sembrada en LB agar en un plazo de tiempo menor a una semana) en 5 ml de LB. El crecimiento bacteriano se midió regularmente determinando la DO de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro *BenchMark Plus* (BIORAD) cada hora hasta llegar a las 13 horas. Para garantizar la linealidad de los resultados, las mediciones se realizaron sobre

diluciones apropiadas del cultivo, de tal forma que la DO nunca fuese superior a 1, calculándose la DO final multiplicando por el correspondiente factor de dilución.

3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ADN

- Extracción de ADN

Para obtener ADN genómico de las bacterias a analizar por PCR, se inoculó una colonia bacteriana en 50 µl de agua bidestilada estéril y se hirvió a 99°C durante 10 minutos en un termobloque (ThermoStat Plus, eppendorf), obteniendo las muestras por shock térmico.

- PCR

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen de 25 µl con 10 ng aproximadamente de ADN molde, 2 mM de MgCl₂ (incluido en el Buffer de la Taq), 200 µM de dNTPs, 0,3 µM de oligonucleótidos y 0,05 U/µl de Taq polimerasa (Hot Master Taq ADN polimerasa eppendorf 5u/µl, para generar los productos de PCR que se utilizaron en la construcción de las cepas por delección génica y Taq Biotools ADN polimerasa 5 u/µl como polimerasa de chequeo rutinario). Se utilizó un termociclador (Mastercycler Gradient, eppendorf), siguiendo el siguiente programa: (i) 5 minutos a 94°C, (ii) 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52 o 50°C (en función del fragmento a generar o testar) y 2 minutos a 68°C ,(iii) 10 minutos o 1 hora a 68°C (necesitamos una hora de elongación final para generar los fragmentos de PCR que se utilizaron en el protocolo de etiquetado de proteínas).

- Purificación de los productos de PCR

Al utilizar los fragmentos de ADN para deleccionar un gen diana o etiquetar una proteína, los productos de PCR tuvieron que ser en primer lugar, precipitados con el kit Pellet-Paint™ Co-Precipitant (Novagen), en segundo lugar, purificados a partir de un gel de

agarosa utilizando el kit SpinPrep™ Gel DNA (Novagen), a continuación, digeridos con la enzima de restricción *DpnI* para retirar posibles restos de ADN metilado, y por último, purificados con el kit SpinPrep™ PCR Clean-up (Novagen) utilizando como buffer de elución agua bidestilada.

ARN

- Extracción de ARN y Transcripción Reversa (RT)

El ARN fue extraído y purificado utilizando Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN purificado fue tratado con DNasa I (TURBO DNA-free™ kit; Ambion) y, para obtener el cADN se sometió el ARN a transcripción reversa utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), según indicaciones del fabricante. En síntesis, la mezcla para llevar a cabo la transcripción reversa se realizó utilizando 2 µg de ARN total en 20 µl de mezcla, se incubó a 25°C durante 10 minutos, se calentó a 42°C durante 120 minutos y finalmente se inactivó a 85°C durante 5 segundos. Los cADN obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta la realización de la PCR cuantitativa a tiempo real.

- PCR cuantitativa a tiempo real para el análisis de la expresión de 3xFLAG

Para la cuantificación de los niveles de expresión del epítipo 3xFLAG por parte de *Salmonella* en infecciones intracelulares, los ensayos de PCR cuantitativa se realizaron sobre 1/20 del cADN obtenido en la transcripción reversa de las muestras de ARN, utilizándose como molde para la amplificación de ADN. Se utilizaron los oligonucleótidos específicos, qFLAG-2D/qFLAG-2R (para la detección de los niveles de 3xFLAG) y qmβactin-1R/qmβactin-1D (para la detección de la proteína celular β-actina, usada a modo de control endógeno), generados utilizando el programa PrimerExpress versión 1.5 (Applied Biosystems), ver Tabla A4 del Anexo I. Las reacciones de PCR, en las que se utilizaron controles negativos sin cADN, se realizaron con la unidad de amplificación ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems), usando SYBR Green como

sistema de detección del producto amplificado (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). El programa de amplificación se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. Los niveles de expresión de 3xFLAG se normalizaron utilizando como control endógeno el gen que codifica la β -actina, valor que permanece constante en células infectadas y no infectadas. Las muestras fueron analizadas por triplicado y fueron incluidos controles negativos. Los resultados de la qRT-PCR fueron calculados utilizando el modelo matemático $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001) para calcular la expresión relativa (RE), normalizando los resultados mediante el uso de la β -actina como control endógeno y, como calibrador, se utilizaron las muestras procedentes de las cepas bacterianas que contienen el plásmido pCMV β m2A sin 3xFLAG, donde $\Delta C_t = C_{tmuestra} - C_{t \beta-actin}$ y $\Delta\Delta C_t = C_{tmuestra} - C_{t pCMV\beta m2A}$.

Proteínas

- Preparación de extractos de proteínas

Para la obtención de extractos de proteínas totales de *Salmonella* en medio de cultivo, se inoculó una colonia fresca en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionaria (DO_{600} de 2,8-3,0). Posteriormente, las bacterias se recogieron mediante centrifugación a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C y, se resuspendieron en PBS a 4°C. Tras realizar dos lavados con PBS, el sedimento se resuspendió en un valor determinado de PBS, ajustando todas las muestras para que 7 μ l correspondiesen a 0,005 unidades de DO_{600} , es decir, unas 5×10^6 bacterias (UFC). A estas muestras se le añadió el tampón de lisis o Loading Buffer 4x (350 mM Tris-HCl pH 6.8, 600 mM ditiotretitol, 30% glicerol, 10% SDS, 0.012% azul de bromofenol), tras lo cual, se hirvieron a 99°C durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm y se almacenaron a -20°C hasta su uso en geles de poliacrilamida.

Para la obtención de proteínas totales de fibroblastos, macrófagos y células dendríticas infectadas con *Salmonella*, los fibroblastos, macrófagos y células dendríticas se incubaron en medio DMEM o RPMI, de acuerdo al protocolo que explicaremos posteriormente,

utilizando placas de 6 pocillos (9.5 cm², Nunc). Se infectaron con *S. Choleraesuis* WTΔ *rpoS*, Δ *phoP* y sus cepas isogénicas construidas etiquetando las proteínas SsaG y PagC, de acuerdo a los protocolos de infección que desarrollaremos posteriormente. Después de los diferentes tiempos post-infección, las células se lavaron 4 veces con PBS atemperado y se agregaron 100 μl de tampón de lisis 1x. A continuación, con la ayuda de un raspador celular, se recogió el lisado de las células y se transfirió a tubos eppendorf de 1,5 ml. Las muestras se hirvieron a 99°C durante 10 minutos y, a continuación, se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

- Inmunodetección de proteínas en soportes de membranas (“Western Blot”)

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles del 8% ó 12 % de poliacrilamida y tampón Tris-HCl/tricina (Schagger and von Jagow, 1987). Se utilizó el equipo *Mini-Protean 3 Cell* (BIO-RAD) y una fuente *Power Pac* (BIO-RAD) para efectuar la electroforesis. A continuación, las proteínas, ya separadas en el gel de poliacrilamida en función de su Peso Molecular, fueron transferidas a membranas de polivinilideno difluorado (PDVF, Immobilon-P Millipore) humedecidas en metanol y equilibradas en Buffer de Transferencia (Tris-Hcl 48mM, glicina 39mM, 0,036% de SDS y metanol 20% a pH 8,5). La transferencia se realizó en un aparato *Trans-Blot Semi-Dry transfer Cell* de BIO-RAD durante 40 minutos a 20 V. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon mediante secado a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, las membranas se rehidrataron en TBS-T (Tris-HCl 20mM a pH 7,5; NaCl 150mM con 0,1% de Tween-20), para seguidamente, añadir el anticuerpo primario utilizado a la dilución adecuada en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Tras esta incubación, se lavó nuevamente con TBS-T 3 veces y, se añadió el anticuerpo secundario (conjugado con Peroxidasa) diluido de nuevo en TBS-T, esta incubación también se realizó a temperatura ambiente y en agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y, la posición y cantidad relativa de las proteínas reconocidas por los anticuerpos utilizados se detectó mediante un ensayo de quimioluminiscencia basado en la reacción luciferina-

luminol (*Super Signal West* Pico Chemiluminiscent Substrate, Thermo Scientific).

3.5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

Aislamiento de cultivos primarios de macrófagos procedentes de lámina propia y fibroblastos intestinales porcinos

Los macrófagos porcinos procedentes de lámina propia de intestino (SIM) se aislaron aplicando una técnica enzimática (Sato *et al.*, 2004). Esta técnica consistió en incubar a 37°C durante tres incubaciones sucesivas de 30 minutos cada una en solución salina balanceada de Hanks (HBSS), tiras de tejido intestinal procedentes de intestino delgado de cerdo. Este medio HBSS está enriquecido con un 2% de suero fetal bovino (FBS), carece de calcio y magnesio y contiene 1mM de dithiothreitol y 1.5mM de EDTA. Durante este tratamiento se eliminaron el mucus, los linfocitos intraepiteliales y las células epiteliales de las muestras intestinales. A continuación, las muestras de tejido que contienen los macrófagos de la lámina propia, se homogeneizaron mediante el corte con la ayuda de dos tijeras (chopping) y se incubaron en medio RPMI suplementado con 2% de FBS y 0,4 unidades Wünsch/ml de enzima colagenasa (Blendzyme I, Roche) durante 30 minutos. Tras esta incubación, la muestra se filtró a través de un filtro de 100 µm (cell strainer, Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) con la ayuda de una jeringa, eliminando así agregados de tejido e incubándose nuevamente durante otros 30 minutos en otro preparado con la misma enzima colagenasa. Los *pellets* procedentes de sendas incubaciones con enzima colagenasa se unificaron, volvieron a filtrarse por un filtro de 100 µm, y, tras ésto, se lavaron con RPMI con el 2% de FBS y, las células depositadas en estos *pellets*, se separaron utilizando un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. De este modo, las células situadas en la capa superior del gradiente se recuperaron, se lavaron dos veces con RPMI 2% FBS y, finalmente se resuspendieron en 10 ml RPMI con 10% FBS, 0,625 mM HEPES, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 0,25 µg/ml de fungizona. Para obtener los macrófagos, se depositaron las células en placas de cultivo (Nunc) a 37°C y 5% CO₂ durante 1 hora y, transcurrido ese tiempo, se eliminaron las células

no adheridas mediante un lavado con PBS atemperado. La pureza del cultivo primario de macrófagos porcinos obtenidos (SIM), se comprueba a través de inmunofluorescencia, utilizando el marcador de superficie celular específico para los monocitos-macrófagos CD14 (ratón anti-porcino CD14 AbD, SEROTEC).

Los fibroblastos porcinos (SIF) procedentes de cultivos primarios, fueron obtenidos utilizando la técnica de explantes de tejido (Strong *et al.*, 1998). Se limpiaron bien las tiras de intestino delgado para retirar el mucus y células epiteliales con la ayuda de papel absorbente. A continuación, se cortaron las tiras de tejido en pequeñas piezas de 0,2 cm x 0,2 cm con un bisturí y, se depositaron de 10 a 15 de estas piezas de pared intestinal en una placa de cultivo en la que, también con el bisturí, previamente habíamos labrado una cuadrícula para facilitar la adhesión de las piezas tisulares. Finalmente, cubrimos con 2 ml de medio mínimo esencial de Dulbecco suplementado con 10% FBS, 0,625 mM HEPES, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 0,25 µg/ml fungizona. Las muestras se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ cambiando el medio 2 veces a la semana. Una vez que los fibroblastos procedentes de los explantes de tejido alcanzaron la confluencia adecuada, se pasaron en una proporción 1:2, estableciendo cultivos primarios estables a los que se reemplazó el medio 2 veces a la semana y que se pasaban con una frecuencia semanal.

Aislamiento de células dendríticas procedentes de médula ósea murina

Las células dendríticas (DCs) procedentes de médula ósea de ratones BALB/c se obtuvieron a partir de los fémures y tibias de una hembra de entre 4 y 6 semanas de edad. Para su aislamiento, se seccionaron las epífisis proximal y distal de las distintas piezas óseas y se perfundieron con 1 ml de PBS estéril que se recogió en un tubo eppendorf de 1,5 ml de capacidad. A continuación, se unificaron todas las muestras perfundidas en un tubo falcon de 15 ml que se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 25 ml de medio RPMI suplementado con 10% FBS, 10 mM HEPES, 1 µg/ml mezcla antibióticos, 1 µg/ml gentamicina y

1% L-glutamina, y a este medio, se le añadieron 20 ng/ml de GM-CSF (PEPROTECH, LONDON). La mezcla obtenida, procedente de la resuspensión, se transfirió a una botella de cultivo Nunc de 175 cm² que se mantuvo en el incubador de células a 37°C y 5% CO₂ durante 7 días, añadiendo 25 ml de medio fresco cada 3 días. Tras estos 7 días de incubación, el fenotipo de las células dendríticas se analizó a través de citometría de flujo. En este momento, se recogieron las células dendríticas (no adheridas), se pasaron a tubos falcon de 50 ml y se centrifugaron 4 minutos a 1200 rpm. El pellet obtenido se resuspendió con el mismo medio RPMI suplementado utilizado en todo el proceso y las células dendríticas se depositaron en placas de cultivo de 6 pocillos, ajustándose a una concentración de 1 x 10⁶ células/pocillo, 24 h antes de llevar a cabo las infecciones con *Salmonella*.

Líneas celulares utilizadas

Las líneas celulares establecidas, utilizadas en los experimentos de expresión *in vitro* del antígeno 3xFLAG vehiculado por un plásmido mediante infecciones bacterianas de líneas celulares, fueron J774-A2, línea celular macrofágica murina y 3T3 línea de fibroblastos murinos. Compradas en el servicio de cultivos celulares del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC de Madrid.

Medios de cultivo utilizados

En el mantenimiento de las líneas celulares y cultivos primarios fueron utilizados los medios de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, BioWhittaker, LONZA) y RPMI 1640 (*BioWhittaker*, LONZA) con 10% de FBS, 2% L-glutamina, 2,5% HEPES, y 1% de una mezcla de penicilina, estreptomycin y fungizona que no añadíamos en el cultivo previo a los experimentos de infección bacteriana. El PBS utilizado en los lavados fue estéril, específico para cultivos celulares (LONZA) y con un pH de 7,4.

Infección de cultivos celulares

Para los ensayos de infección, las bacterias se incubaron a 37°C, sin agitación, durante unas 18 horas. 24 horas antes de llevar a cabo la

infección, los fibroblastos se cultivaron en DMEM enriquecido con 10% de FBS, 2% L-glutamina y 2,5% HEPES, utilizando placas de 6 pocillos (Nunc) o placas P-100 (Nunc) para conseguir una confluencia de aproximadamente el 70%-80% (5×10^5 células). En el caso de los macrófagos, para obtener una confluencia del 70%-80%, se realizó el pase a la placa de 6 pocillos 48 horas antes de la infección, utilizando medio RPMI enriquecido con 10% de FBS, 2% L-glutamina y 2,5% HEPES.

Las células se infectaron a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 50:1 (bacteria:célula) en el caso de los fibroblastos y 10:1 en el caso de los macrófagos. Tras 15 (macrófagos) o 30 (fibroblastos) minutos de invasión, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS estéril atemperado. A continuación, se añadió el medio de cultivo correspondiente, DMEM (fibroblastos) o RPMI (macrófagos) suplementado con 10% de FBS, 2% L-glutamina, 2,5% HEPES y 100 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico gentamicina, que no puede atravesar la membrana plasmática de las células eucariotas y actúa inactivando las bacterias que no hayan ingresado en las células, sin afectar la viabilidad de aquéllas que se encuentran en el interior celular (Finlay and Falkow, 1988). A las 2 horas postinfección se cambiaba el medio adecuado, DMEM o RPMI, por medio fresco suplementado con sólo 10 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina.

Las muestras se recogieron a las 2, 6 y 24 horas post-infección en el caso de infecciones utilizadas para establecer la expresión del antígeno 3xFLAG a través de inmunodetección de proteínas en soportes de membrana, o a las 2 y 24 horas post-infección cuando las muestras se utilizaban para la detección de 3xFLAG utilizando la RT-qPCR o para calcular el índice de proliferación intracelular.

Ensayos para calcular el índice de proliferación intracelular (Ipro)

A las 2 y 24 horas post-infección se lisaron las células infectadas (de acuerdo al protocolo explicado en el apartado anterior) con el detergente Tritón X-100 al 1% en PBS estéril. El número de bacterias viables se determinó sembrando distintas diluciones del lisado en placas de LB agar y contando el número de colonias. Para

cada estirpe y tiempo se infectaron dos pocillos y los extractos de cada pocillo se sembraron por duplicado. El Ipro se calculó como el cociente entre el número de bacterias viables intracelulares a las 24 horas frente a las existentes a las 2 horas post-infección.

Microscopía de inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia, los fibroblastos o macrófagos se cultivaron sobre lentillas de 12 mm de diámetro (Marienfeld) que se situaron dentro de placas Nunc de 24 pocillos y la infección se llevó a cabo según el protocolo descrito con anterioridad. A las 2 y 24 horas post-infección, se lavaron las células con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS se reservaron a 4°C hasta que se realizó la tinción.

Previamente a la tinción, las células debían ser bloqueadas y permeabilizadas en una solución de bloqueo que contiene 2% de suero de cabra y 0,2% saponina (SIGMA) en PBS, en esta solución se bloquearon durante 10 minutos a temperatura ambiente. En esta misma solución se prepararon las diluciones de los distintos anticuerpos a utilizar, y tras cada paso de la incubación, las muestras se lavaron tres veces con PBS. Todas las incubaciones se realizaron durante una hora a temperatura ambiente. Los sueros y anticuerpos utilizados, así como sus correspondientes diluciones, fueron las siguientes: suero anti-*Salmonella* (antígeno O) Poly B (BD) formulado en conejo, se usó a una dilución 1/500, anticuerpo ratón anti-CD14 porcino (AbD Serotec), a una dilución 1/20, los conjugados: cabra anti-conejo Alexa 488, dilución 1/500 y cabra anti-ratón Alexa 594, dilución 1/500 y para teñir los núcleos de las células eucariotas se utilizó DAPI (4,6-diamino-2-fenolindol) a 1 µg/ml durante 5 minutos. Además, para llevar a cabo experimentos de viabilidad celular, las células se incubaron en presencia de Ioduro de Propidio (permite diferenciar células viables de las que no lo son) a una concentración de 2 µg/ml, a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de llevar a cabo la permeabilización y tinción con los distintos anticuerpos. Finalmente, las lentillas se montaron en un portaobjetos con Prolong Gold Antifade (Molecular Probes) y se sellaron con esmalte de uñas.

Las muestras fueron analizadas usando un microscopio de inmunofluorescencia (ECLIPSE TE 200, Nikon). Las imágenes fueron recopiladas digitalmente y procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop.

3.6. ENSAYOS *in vivo* UTILIZANDO A NIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Modelo murino de infección experimental

Para los ensayos con ratones se utilizaron siempre hembras *Nramp-/-* de la estirpe BALB/c de entre 6 a 8 semanas de edad, suministradas por Harlan. Los animales se mantuvieron en el animalario de la facultad de medicina y/o biología de la Universidad Complutense de Madrid, con alimentación y agua *ad libitum*, excepto en los experimentos en los que fue necesaria su retirada, nunca por más de 12 horas. El mantenimiento en condiciones de humedad relativa y ciclos de luz-oscuridad adecuados se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos de los animalarios de la UCM. El sacrificio se efectuó por asfixia en una cámara de CO₂ o bien mediante dislocación cervical, siempre de acuerdo a técnicas aprobadas por los comités éticos para experimentación animal de la UCM.

Inoculación de ratones BALB/c con las diferentes estirpes de *S. Choleraesuis* utilizadas en este trabajo

Para la preparación de los inóculos, las bacterias se incubaron en diferentes volúmenes de LB a 37°C y sin agitación durante 18 horas. Cuando los volúmenes necesarios eran muy elevados (500 ml), el cultivo se realizó en dos pasos, primero un precultivo de 5 ml y, cuando éste había alcanzado la fase de crecimiento exponencial, se realizaba una dilución 1/100 en medio LB para obtener el inóculo definitivo. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación (7000 rpm, 10 minutos, 4°C) y se lavaron dos veces con PBS estéril frío. A continuación, se resuspendieron en PBS de acuerdo a la dosis que debía inocularse intraperitonealmente (10⁵-10⁶ UFC/200 µl) o administrarse a través de sondaje por vía oral (10⁹-10¹⁰ UFC/200 µl). Como control del inóculo, se sembraron, por duplicado, en LB

agar, al menos tres diluciones decimales del inóculo (10^6 - 10^7 - 10^8), realizadas en PBS estéril.

La inoculación intraperitoneal se realizó con aguja de insulina (25 Gauges), en el tercio inferior de la cavidad abdominal, en las regiones laterales a la línea alba. Posicionamos al animal en decúbito supino para conseguir un ligero desplazamiento de las vísceras abdominales y evitar su daño al inyectar. Siempre antes de introducir los 200 μ l por ratón, aspiramos, para comprobar que estamos en el espacio peritoneal. Para administrar el inóculo bacteriano por vía oral se utilizó una sonda rígida autoclavable. Previa a la administración bacteriana oral, se retiró el agua y alimento a los animales, el alimento la noche anterior a la administración y, el agua, dos horas antes. 20 minutos antes a la administración oral de las bacterias, se administraron 200 μ l de una solución de bicarbonato sódico al 10%, también por sondaje oral, para actuar como tampón frente al pH ácido gástrico que produciría una inactivación bacteriana. En los experimentos de inmunización, la administración oral fue realizada en 3 aplicaciones, espaciadas aproximadamente entre 10-14 días cada una, los animales fueron sacrificados 10 días después de la última administración.

Obtención de muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal. La sangre completa, almacenada en tubos de 1,5 ml estériles se dejó desuerar y, cuando se había formado un coágulo visible, perfectamente separado del suero (mínimo de 4 horas tras su obtención), se centrifugaba a 400 g durante 10 minutos y a 10°C. De este modo, se obtenían las muestras de suero, que se almacenaban a -80°C hasta su utilización en las diferentes técnicas de evaluación de la respuesta inmunitaria frente a las cepas bacterianas.

Obtención de muestras de lavados intestinales

El día de sacrificio en los experimentos de inmunización, se obtuvieron muestras procedentes de lavados intestinales del intestino delgado de los ratones, para evaluar la cantidad de IgA. Una vez sacrificado el ratón, se llevaba a cabo todo el procedimiento

de disección y obtención de muestras en una cabina de flujo laminar. Tras retirar el intestino delgado, desde la válvula pilórica hasta la válvula ileocecal, se cortaban en aproximadamente 3 ó 4 partes y, con ayuda de unas pinzas y una jeringa con una cánula, se introducían 3 ml de PBS estéril al que se le habían añadido dos pastillas de un *cocktail* de inhibidores de proteasas (Roche). Las muestras se recogían en una placa de Petri estéril desde donde se llevaban a 2 tubos de 2 ml cada uno, desde su obtención hasta su centrifugación, todas las muestras se mantenían en hielo. Para retirar los detritus intestinales arrastrados durante los lavados, las muestras eran vortexadas enérgicamente durante 5 minutos y a continuación, centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue retirado y almacenado a -80°C hasta su utilización.

Obtención de muestras de bazo, hígado y nódulos mesentéricos

Cuando por razones experimentales se debían obtener muestras de órganos, se obtuvieron realizando la necropsia en una cabina de flujo laminar e inmediatamente tras el sacrificio del animal. Se tomaron el bazo, un lóbulo hepático, los nódulos mesentéricos y en último lugar las Placas de Peyer, para evitar contaminación fecal de las muestras. Cuando se utilizó el bazo para obtener esplenocitos en los ensayos de linfoproliferación, se recogió en 5 ml de medio RPMI completo (con 10% de FBS, 2% L-glutamina, 1% de una mezcla de Penicilina, Estreptomicina y Fungizona, 1% de piruvato sódico 100x y 1% de aminoácidos esenciales 100x).

Modelo porcino de infección experimental

El modelo porcino de infección experimental se utilizó en los ensayos de índice de competición. Para ello, se utilizaron 12 lechones de entre 5-6 semanas de edad de la línea híbrida Large White x Landrace, libres de *Salmonella spp.* Los animales se mantuvieron en un animalario de nivel de contención P3 situado en las instalaciones del CISA (Centro de Investigación en Sanidad Animal), Valdeolmos, Madrid. La alimentación y bebida estuvieron a libre disposición, exceptuando las 24 horas previas al experimento de inoculación,

cuando se retiró el alimento. Las condiciones de mantenimiento fueron las establecidas por el animalario, siempre de acuerdo a protocolos éticos en experimentación animal. La identificación de los animales se realizó mediante su división en grupos de 3 animales que eran identificados mediante crotales adheridos a las orejas según numeración del animalario y/o la explotación de origen. Antes de realizar el experimento, los animales se aclimataron a las instalaciones durante un periodo de una semana. Durante dicha aclimatación, se tomaron muestras mediante hisopos sin medio de transporte del recto y, se llevó a cabo una siembra selectiva para aislamiento de *Salmonella* utilizando un medio de preenriquecimiento, agua de peptona, un medio de preenriquecimiento selectivo, caldo de tetrionato, y finalmente se sembró en placas de agar McConkey y agar verde brillante, chequeando por PCR las colonias con aspecto compatible con ser *Salmonella*, no encontrando ninguna positiva. Para preparar la mezcla a inocular, (20 ml/lechón), se incubaron las bacterias en LB caldo, en estático y a 37°C. Los inoculos se administraron por vía oral mediante sondaje orogástrico, previamente los animales fueron sedados con Ketamina (Zoletil), a una dosis de 20 mg/kg peso vivo que se administró intramuscularmente 20 minutos antes de sondear, y se tamponó la acidez gástrica mediante la administración de 25 ml de bicarbonato sódico 10% por lechón unos 15-20 minutos previos a la administración del inóculo bacteriano. Durante los días que duró el experimento, se tomó la temperatura rectal dos veces al día, para descartar reacciones adversas al inóculo como podría ser la aparición de fiebre elevada (valores mayores a 40°C, la temperatura normal de un lechón oscila entre los 38,4°C y los 39°C). A los 5 días post-inoculación, se llevó a cabo el sacrificio de los animales en las instalaciones del CISA. Previo a su sacrificio, los animales fueron sedados con Ketamina y a continuación, fueron sacrificados con pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol). Inmediatamente tras el sacrificio, se efectuó la necropsia, obteniendo una porción de bazo, hígado, placas de peyer y nódulos mesentéricos de manera aséptica, que se transportaron en tubos con PBS estéril a 4°C hasta su homogeneización en bolsas de Stomacher y su posterior siembra en los medios correspondientes.

3.7. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA MEDIR LA RESPUESTA INMUNE

Durante los ensayos de inmunización llevados a cabo utilizando el modelo murino de infección experimental, se utilizaron diversas técnicas con el objetivo de medir la respuesta inmune de los ratones frente a diferentes componentes de la cepas bacterianas como el LPS bacteriano y el epítipo comercial 3xFLAG.

Ensayos de linfoproliferación a partir de esplenocitos

En primer lugar, se extrajeron los bazo tal y como se ha detallado anteriormente. Se homogeneizaron con ayuda de un émbolo de jeringa y, a continuación, se recogió el lisado para ser centrifugado en tubos de 15 ml con fondo cónico (Falcon) a 400g, 5 minutos a 10°C. El sedimento fue resuspendido con medio RPMI completo y tras dos lavados, finalmente el sedimento celular fue resuspendido en buffer de lisis (ACK, LONZA), que permite lisar los eritrocitos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con medio RPMI completo, de este modo, se resuspendieron los linfocitos obtenidos en 2 ml de medio RPMI completo y se midió el número de células viables mediante la exclusión con la tinción vital Azul Tripán al 0,2%. Finalmente, se ajustó la cantidad de linfocitos viables a una concentración de 5×10^6 células/ml, para ser finalmente dispensadas e incubadas en placas de 96 pocillos (Nunc), donde se realizó el ensayo de linfoproliferación utilizando como sistema indicador el colorante Alamar Blue (Serotec), que cambia de azul a rojo al ser reducido en presencia directa de intermediarios metabólicos celulares, lo que refleja una actividad metabólica aumentada en el proceso de proliferación. Las distintas muestras se ensayaron siempre por cuadruplicado con las siguientes cantidades por pocillo: antígeno de *Salmonella* 80 μ l de una concentración de 13 OD/ml (preparado a partir de un cultivo de *Salmonella* en condiciones estáticas a 37°C y tras ser lavado con PBS e inactivado a 99°C durante 20 minutos), 1 μ g del péptido 3xFLAG (SIGMA), y 0,4 μ g de concanavalina A (preparado a 5 mg/ml en medio RPMI completo). El colorante, Alamar Blue se añadió en el momento del ensayo a una concentración del 10%. Para valorar la linfoproliferación en respuesta a los diversos antígenos, se midió la DO a 600 ó 630 nm y

a 540 ó 570 nm a diferentes intervalos: 1, 2 y 3 días tras añadir el Alamar Blue, en algunos casos, la medición se realizó a los 4 y 5 días tras añadir el Alamar Blue. Las mediciones se llevaron a cabo con el lector de placas de ELISA (*Microplate spectrophotometer*, Benchmark plus, BIORAD). El porcentaje de reducción del Alamar Blue, que indica el porcentaje de linfoproliferación se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción} = \frac{117,216 \times A_{570} - 80,586 \times A_{600}}{155,677 \times A'_{600} - 14,652 \times A'_{570}} \times 100$$

A = Absorbancia pocillo problema

A' = Absorbancia pocillo control negativo

Ensayo de detección de citoquinas

Para la detección de las citoquinas IL-10, IL-4 e IFN- γ , se utilizaron los kit comerciales IL-10 ELISA set, Mouse IFN- γ (AN-18) ELISA set, Mouse IL-4 ELISA set, BD OptEIA. Todos los kit fueron utilizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras ensayadas fueron obtenidas de manera similar a las utilizadas para los ensayos de linfoproliferación, con la salvedad, de que no se les añadió el colorante Alamar Blue y se recogieron tras 3 días de incubación. Para la detección de IL-4 e IL-10 se empleó una dilución 1/10 de las muestras y, en el caso de la detección de IFN- γ la dilución fue de 1/100 en los buffer correspondientes incluidos en los diferentes kits comerciales. Al finalizar el ensayo, se cuantificó mediante un lector de ELISA (*Microplate spectrophotometer*, Benchmark plus, BIORAD) a una longitud de onda de 450 y 570 nm.

Ensayo para la detección de anticuerpos en los sueros problemas de Anti-3xFLAG y anticuerpos frente a *Salmonella* mediante un ELISA de captura de antígeno

Se utilizaron diluciones 1/100 (detección de anticuerpos anti-LPS) o diluciones 1/10 (detección de anticuerpos frente a 3xFLAG) de los sueros obtenidos previos a la inmunización, en los días 7, 14 y 21 tras la primera inoculación y por último el día del sacrificio, realizado aproximadamente el día 35 a 37 tras la primera inmunización. Las

diluciones se realizaron en PBS-T con un 0,1% de BSA. Las muestras de suero utilizadas se depositaron en placas de 96 pocillos (Nunc), tapizadas con una solución de *Salmonella* inactivada (se ajustó a una DO de 0,2 OD/ml, diluidas en buffer coating, que contiene Na₂CO₃ y NaHCO₃) o bien tapizadas con el antígeno 3xFLAG concentración final de 5 µg/ml (SIGMA), posteriormente, las placas se bloquearon con 100 µl/pocillo de PBS-Tween con 1% BSA, 1h a 37°C. Tras realizar tres lavados con PBS-T, se añadieron los sueros a las diluciones adecuadas en un volumen de 100 µl/pocillo. Se incubó 1 hora a 37°C y, a continuación, se lavaron 3 veces con PBS-T. Se añadió el anticuerpo conjugado con Peroxidasa, cabra anti-ratón peroxidasa (SIGMA), en el caso de la detección de anticuerpos frente a 3xFLAG, y cabra anti-conejo peroxidasa (SIGMA), para detectar anticuerpos frente a *Salmonella*. Los anticuerpos conjugados se añadieron a una dilución 1/5000 en PBS-T 0,1% BSA y en una cantidad de 100 µl/pocillo. Se incubó 1h a 37°C, tras lo cual se realizaron 3 lavados con PBS-T. Finalmente, se añadió 100 µl/pocillo de sustrato, ABTS (ROCHE) que se incubó durante 20 minutos en oscuridad. Tras los 20 minutos, o cuando la reacción colorimétrica era lo suficientemente intensa, se añadió 100 µl/pocillo de solución de parada (ácido oxálico, 0,3 M), e inmediatamente se leyó en el lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm.

Utilizamos como control positivo de la reacción frente a *Salmonella* el anticuerpo anti-OmpA B desarrollado por la empresa InmunoStep y, el anticuerpo comercial Anti-M2 3xFLAG (SIGMA) como control positivo frente a 3xFLAG.

Análisis de la respuesta inmune a nivel de mucosas

Para medir la respuesta inmune a nivel de mucosas, se empleó un ELISA de captura para medir los niveles de IgA frente a *Salmonella* y frente a 3xFLAG. Teniendo en cuenta la variación en las cantidades totales de IgA obtenidas, los valores de IgA específicos a cada antígeno fueron ponderados con respecto al nivel de IgA total de la muestra. Las muestras utilizadas son las procedentes de los lavados intestinales que se obtuvieron tras el sacrificio de los ratones el último día del experimento de inmunización. Las muestras se utilizaron a una dilución 1/5 en PBS y, previa a su dilución, se

vortexaron. La prueba se desarrolló de la misma manera que en la detección de anticuerpos en suero con la salvedad de que las placas de 96 pocillos fueron tapizadas también con 100µl de 5 µg/ml de anti-IgA (preparada en buffer coating a una concentración de 1mg/ml, SIGMA). Las dos últimas filas de cada placa fueron tapizadas con diluciones seriadas de IgA total (1mg/ml, IgA de ratón, Bethyl laboratories) en PBS, para construir una curva patrón y ponderar la cantidad relativa de IgA frente a 3xFLAG y *Salmonella* con respecto a la cantidad total de IgA de la muestra. El protocolo del ELISA de captura, incluyendo la medición a una longitud de onda de 405 nm fue exactamente igual al explicado en apartados anteriores.

3.8. OTRAS TÉCNICAS

Ensayo de índice de competición

Los ensayos de índice de competición se realizaron de acuerdo a los protocolos desarrollados por Beuzon y Holden (Beuzon and Holden, 2001). Los ensayos se realizaron *in vitro* e *in vivo*, tanto en el modelo murino como en el modelo porcino de infección experimental.

- Índice de competición *in vitro*

Para llevar a cabo estos experimentos, se emplearon las cepas bacterianas marcadas con el gen de resistencia al antibiótico kanamicina ($\Delta phoP::km$ y $\Delta rpoS::km$), de tal manera que podían ser diferenciadas de la cepa parental y de la cepa vacunal comercial, incapaces de crecer en medios suplementados con este antibiótico. Las 4 cepas bacterianas a comparar, $\Delta phoP::km$, $\Delta rpoS::km$, WT y SC-54 fueron incubadas en 5 ml de LB a 37°C y 175 rpm la noche anterior al experimento. Al día siguiente, se mezclaron 500 µl de las cepas mutantes con la misma cantidad de la cepa WT o de la cepa SC-54, en un ratio 1:1 (1 unidad de DO_{600} /ml cultivo en cada cepa a comparar) y se realizó un subcultivo 1:100 en 50 ml de LB caldo. Al realizar la mezcla, se mezclaron bien y se sembraron por duplicado diluciones seriadas en PBS en placas de LB agar y de LB agar enriquecido con km (30 µg/ml). Tras incubar a 37°C durante 24 h

estas placas, se obtuvo el número de UFC correspondientes a lo que se denomina *INPUT* de las cepas mutantes con respecto a la cepa parental y a SC-54. Los cultivos resultantes de la mezcla de las cepas a comparar, se incubaron en una estufa con balancín incorporado (*Infors HT*, Bottmingen) a 37°C y 175 rpm durante 24 h. A continuación, se sembraron de la misma manera en placas de LB y LB+km para determinar el valor del *OUTPUT* de las cepas construidas con respecto a la cepa parental y la vacuna comercial existente. El índice de competición se calculó de acuerdo al siguiente algoritmo:

$$\text{El Índice de Competición (CI)} = \frac{\text{OUTPUT}}{\text{INPUT}}$$

Dónde, el *INPUT* se obtiene al dividir la cantidad de UFC/ml correspondientes a las cepas mutantes (las que crecen en LB + km) entre las UFC/ml correspondientes a la cepa parental o la cepa SC-54. El *OUTPUT* se obtuvo de manera similar, pero las colonias procedían de las placas sembradas tras incubar la mezcla de cepas bacterianas durante 24 h.

- Índice de competición *in vivo*

El inóculo que corresponde al *INPUT* se obtiene tras una incubación O/N de cada una de las cepas bacterianas ensayadas en LB caldo a 37°C y 175 rpm, su posterior centrifugado y lavado una vez con PBS estéril. En el caso de los ratones, una mezcla de la cepa construida a comparar y de la cepa parental o vacunal comercial a un ratio 1:1, 5×10^5 UFC mutante y 5×10^5 UFC cepa parental o SC-54. El inóculo se administró a los ratones a través de una inoculación intraperitoneal de 200 μ l/ratón, estableciendo grupos de 3 ratones por cada mezcla de cepa construida/parental y construida/SC-54.

En el modelo porcino, se mezclaron 10^8 UFC/ml de WT con respecto a 10^9 UFC/ml de cada una de nuestras cepas mutantes y, 10^9 UFC/ml de SC-54 con respecto a la misma cantidad Δ de *rpoS* y Δ *phoP*, en un volumen total de 10 ml que se administraron mediante sondaje orogástrico, previa sedación y, tras tamponar el pH gástrico estomacal con 25 ml de bicarbonato al 10%. Al igual que en el caso

de los ratones, reservamos parte del inóculo que, tras diluir en PBS, sembramos en LB y LB+km para obtener el valor del *INPUT*.

Para obtener el *OUTPUT in vivo*, se sacrificaron los animales a las 72 h post-inoculación o en el momento en el que estuvieran en estado moribundo en el caso de los ratones, y 72 h p.i en el caso de los cerdos, cuya temperatura rectal fue registrada a lo largo del experimento. Tras el sacrificio, se obtuvieron muestras del bazo, hígado, linfonódulos mesentéricos y placas de Peyer. Todos los órganos fueron macerados en PBS estéril y, diferentes diluciones decimales de los mismos fueron sembradas, por duplicado, en placas de LB y medio LB enriquecido con km. A través del recuento de las UFC en las placas, establecimos el *OUTPUT* para cada órgano y, el IC se calculó de igual manera que en el experimento *in vitro*.

Ensayos de estabilidad plasmídica

- Estabilidad plasmídica *in vitro*

Para analizar la persistencia del plásmido en la cepa parental, WT, las cepas por delección desarrolladas en nuestro trabajo, *phoP* y *ΔrpoS* y la cepa vacunal comercial, SC-54, se realizaron cultivos seriados de todas las cepas en medio LB sin ampicilina durante un periodo de 8 días. Para ello, se partió de un cultivo O/N a 37°C y 150 rpm en LB sin la presión selectiva de la ampicilina y, al día siguiente, se realizó una dilución 1/500 en LB caldo, acción que repetimos de manera consecutiva hasta el día 8. Todos los días, se sembraron varias diluciones por duplicado, en medio LB y LB suplementado con ampicilina, para analizar si las colonias seguían manteniendo el plásmido en ausencia de la presión selectiva de la ampicilina y en qué porcentaje de acuerdo al siguiente algoritmo:

$$\text{ESTABILIDAD PLASMÍDICA} = \frac{\text{UFC en las placas LB+AMP}}{\text{UFC en las placas LB}} \times 100$$

- Estabilidad plasmídica *in vivo*

Para analizar la estabilidad *in vivo*, se utilizaron grupos de 10 ratones de la estirpe BALB/c por cada cepa bacteriana a analizar. Los inóculos fueron preparados de igual manera que en el experimento de estabilidad *in vitro*, aplicando por vía oral una dosis comprendida entre 10^9 - 10^{10} UFC/200 μ l, mediante el procedimiento explicado con anterioridad. Siempre se reservó una cantidad de inóculo que fue sembrada en placas de LB y LB+Amp, para cuantificar la dosis real administrada a los animales. A diferentes intervalos de tiempo tras la inoculación oral (días 1, 3, 5, 7 y 15), se fueron sacrificando los animales inoculados y se tomaron asépticamente muestras de bazo, nódulos mesentéricos y placas de Peyer, que fueron recogidos en tubos estériles con 5 ml de PBS. Las muestras se homogeneizaron y 100 μ l de las mismas, tras realizar diluciones seriadas en PBS estéril, fueron sembradas por duplicado en placas de LB y LB+Amp. La estabilidad plasmídica *in vivo* fue calculada utilizando la misma fórmula que la estabilidad plasmídica *in vitro*, para cada tiempo y cepa bacteriana empleada.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados usando el test *t* de Student. Posteriormente se utilizó un análisis ANOVA y por último una comparación múltiple de Tukey-Kramer con un intervalo de confianza del 95%. En todos los casos las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el programa informático GraphPad InStat (versión 3.5).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1

**Construcción y caracterización de dos cepas
atenuadas de *Salmonella enterica* subespecie
enterica serovar Choleraesuis**

El desarrollo de vacunas efectivas, de bajo coste y racionalmente diseñadas para los animales domésticos con importancia económica, es uno de los objetivos esenciales de la inmunología veterinaria cuyo fin es reducir las pérdidas económicas relacionadas con las enfermedades infecciosas. Sin embargo, la falta de cepas adecuadas disponibles como vectores es el principal factor limitante para el desarrollo de este tipo de vacunas. El éxito de las vacunas recombinantes vivas dependerá en gran parte de la consecución de una nueva generación de vectores con características optimizadas en cuanto a seguridad e inmunogenicidad se refiere.

Desde hace algunos años se reconoce el beneficio potencial de emplear vacunas vivas atenuadas de *Salmonella*, e incluso existe un pequeño número de ellas disponibles comercialmente (Dueger et al., 2003a). Tradicionalmente se han empleado mutantes auxótrofos de *Salmonella* como cepas vacunales atenuadas vivas. Sin embargo, se ha demostrado en el modelo murino que son poco inmunogénicas. Otro grupo bien estudiado de cepas atenuadas de *Salmonella* lo constituyen mutantes en genes implicados en la regulación de su virulencia. Así, se han construido y analizado como candidatos para cepas vacunales mutantes en la metilasa de adeninas de ADN (Dam)(Dueger et al., 2003b) y mutantes nulos en el sistema global de regulación de la virulencia de *Salmonella* (PhoP/PhoQ, codificado por *phoP/phoQ*) (Hohmann et al., 1996a; Hohmann et al., 1996b). Además, se ha demostrado que mutantes de *S. Typhimurium* nulos en PhoP/Q (Δ *phoP*) y otros reguladores de virulencia, como RpoS (factor sigma alternativo), aunque totalmente atenuados, presentan un fenotipo de proliferación en cultivos celulares normalmente no permisivos, como fibroblastos (Cano et al., 2001b). Con el objetivo de conseguir nuevas cepas de *Salmonella* caracterizadas por presentar un especial tropismo por el ganado porcino y una alta capacidad de invasión sistémica del organismo, junto con la existencia de un modelo murino de infección experimental, decidimos utilizar el serovar Choleraesuis. Teniendo presente que los factores de virulencia no se pueden extrapolar de un serovar a otro y, mucho menos, de un hospedador a otro, basándonos en los conocimientos descritos en la patogénesis de *S. Typhimurium*, nos

planteamos la posibilidad de construir cepas de *S. Choleraesuis* portadoras de deleciones irreversibles en los reguladores RpoS y PhoP/PhoQ.

RESULTADOS

4.1. Construcción de cepas vivas a tenuadas de *S. Choleraesuis*

Para la construcción de dos nuevas cepas nulas en el sistema regulador *phoP/Q* ($\Delta phoP/Q$) y *rpoS* ($\Delta rpoS$) (factor sigma alternativo) de *S. Choleraesuis* hemos optimizado para el serovar *Choleraesuis* (CECT 915) el método previamente descrito para *Escherichia coli* y *S. Typhimurium* (Datsenko and Wanner, 2000) y que se describe con detalle en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Las secuencias empleadas como moldes en el diseño de los oligonucleótidos utilizados para deleccionar *rpoS* y *phoP* (RpoS-1D/-1R y PhoP-1D/-1R, respectivamente) se obtuvieron realizando alineamientos de las secuencias de los genomas de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, utilizando las secuencias consenso. Además, con la posterior publicación de la secuencia completa del genoma de *S. Choleraesuis* (Chiu et al., 2005), todas las secuencias han sido confirmadas. La mutación se ha comprobado con oligonucleótidos flanqueantes a la región deleccionada (véase Fig. 1). Finalmente, se ha eliminado del cromosoma el gen de resistencia antibiótica mediante la flipasa codificada en el plásmido termosensible pCP20, obteniendo las cepas nulas en el sistema regulador *phoP/Q* ($\Delta phoP$) y *rpoS* ($\Delta rpoS$) (véase Fig. 1).

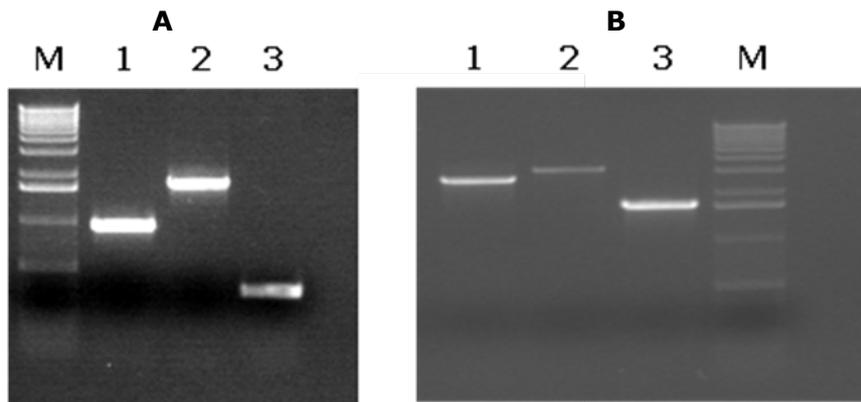


Figura 1. Comprobación de la construcción de las cepas nulas en *phoP* (panel **A**) y *rpoS* (panel **B**). En el panel A la línea M coincide con el marcador de peso molecular, en la línea 1, se presenta la cepa silvestre, WT, en la línea 2, la construcción $\Delta phoP::Km$ y en la línea 3, $\Delta phoP$ después de haber perdido el cassette de resistencia

a antibióticos. En el panel B, la línea 1 muestra la cepa WT, la línea 2 la cepa $\Delta rpoS::Km$, la línea 3 $\Delta rpoS$ y la línea M el marcador de peso molecular.

4.2. Valoración de la bioseguridad de las nuevas cepas construidas

Iniciamos la caracterización preliminar de los mutantes obtenidos, estudiando en detalle su fenotipo con el fin de detectar la posible presencia de alteraciones en otros caracteres como consecuencia de la ausencia de RpoS o PhoP/Q. Para ello, se analizó la capacidad de crecimiento en medio líquido, LB a 37°C (véase Fig.2), la morfología y pigmentación de las colonias, el perfil de utilización de azúcares (analizado con el sistema API 50CH de *biomerieux*) de los mutantes en comparación con los de su cepa parental, no detectándose diferencias significativas en ningún caso. Además, se realizó un estudio de competición *in vitro*, en medio rico, entre las cepas construidas y su cepa parental, no observándose diferencias significativas (Tabla 1). Finalmente, se estudió la competición *in vitro* de las cepas construidas y una cepa viva atenuada comercial, SC-54, suministrada por Boehringer Ingelheim (Roof et al., 1992), nuevamente, no se registraron diferencias. Estos datos hacían descartar que las diferencias que se pudieran observar en adelante, pudiesen ser atribuidas a una diferencia de crecimiento o competición entre las diferentes cepas.

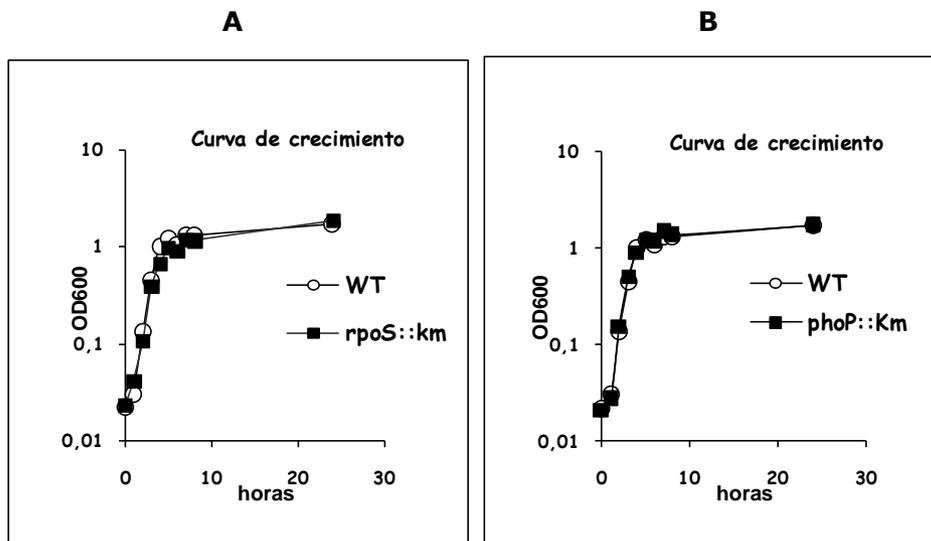


Figura 2. Curvas de crecimiento de *S. Choleraesuis* WT y sus mutantes $\Delta rpoS$ (A) y $\Delta phoP$ (B), cultivados en LB a 37°C durante 24 horas. La densidad óptica se midió a 600

nm. Ambas cepas mutantes presentaron cinéticas de crecimiento idénticas a las de su cepa parental.

4.2.1. Valoración de l grado de a tenuación de l as c cepas construidas

Para comenzar a estudiar la atenuación de la virulencia en el modelo murino, se emplearon ratones BALB/c en un ensayo de infección mixta sistémica con dosis subletales (cepa vacunal/cepa silvestre) por vía intraperitoneal (ip) y determinando el denominado índice de competición (IC) (Beuzon and Holden, 2001) y, como es lógico, a menos IC mayor grado de atenuación. Los datos obtenidos, indicaron que tanto la cepa $\Delta phoP$ como $\Delta rpoS$ presentaban un alto grado de atenuación con respecto a su cepa parental silvestre (Tabla 1). Además, las dos cepas desarrolladas presentaron una significativa reducción de la virulencia con respecto a la cepa viva atenuada comercial SC-54 (que se caracteriza por haber sido atenuada por pases en neutrófilos porcinos y haber perdido el plásmido de virulencia pSCV50, además de otras mutaciones desconocidas).

Tabla 1

Índice de competición de las cepas atenuadas en ratones BALB/c

Cepas comparadas	Vía de inoculación	IC (DS)			
		In vitro	In vivo		
				N ¹	Atenuación
<i>phoP</i> : :km vs. WT	i.p.	1.25 (± 0.42)	0.00016 (± 0.00019)	5	Sí
<i>rpoS</i> : :km vs. WT	i.p.	0.96 (± 0.22)	0.0018 (± 0.0016)	5	Sí
<i>phoP</i> : :km vs. SC-54	i.p.	1.24 (± 0.68)	0.0000094 (± 0.0000073)	3	Sí
<i>rpoS</i> : :km vs. SC-54	i.p.	1.09 (± 0.77)	0.025 (± 0.025)	4	Sí

¹ únicamente se tuvieron en cuenta los animales que se encontraban en estado moribundo

Una vez comprobada la drástica atenuación en el modelo murino, profundizamos en el análisis de la virulencia realizando ensayos en el modelo porcino mediante infecciones mixtas por vía oral entre la cepa silvestre, las cepas atenuadas ($\Delta phoP$, $\Delta rpoS$) y la vacuna viva atenuada comercial (SC-54), calculando los niveles de competición en la colonización de diferentes órganos a través del cálculo del índice de competición (IC). Se observó que los mutantes de *S. Choleraesuis* nulos en los reguladores PhoP/Q ($\Delta phoP$) y RpoS ($\Delta rpoS$) mostraron una gran atenuación de su virulencia con respecto a la cepa silvestre. Además, la atenuación en el caso de $\Delta phoP$ es incluso mayor que la cepa viva atenuada que constituye la vacuna comercial SC-54 (Tabla 2).

Tabla 2. Índice de competición en nódulos mesentéricos de lechones

	Lechón 1	Lechón 2	Lechón 3	Medias	DE
$\Delta phoP$ /WT	NB ¹	NB ¹	0,000013	0,000013	
$\Delta rpoS$ /WT	0,021	0,016	0,029	0,022	0,006
$\Delta phoP$ /SC-54	NB ¹	0,000218	0,000011	0,00011	0,0001
$\Delta rpoS$ /SC-54	0,14	3,00	0,80	1,31	5

¹ No se encontraron bacterias a los tres días postinoculación
 Los datos de IC \leq 0,4 indican atenuación

4.2.2. Capacidad de invasión y proliferación de *S. Choleraesuis* $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ *in vitro*

Para poder estudiar la capacidad de invasión y proliferación de *S. Choleraesuis* en fibroblastos y macrófagos como importantes células que participan en la patogénesis y la inmunidad de *Salmonella*, y con el fin de que reproduzcan de forma más exacta lo que puede ocurrir *in vivo*, se realizó, conforme se describe en materiales y métodos, la obtención, cultivo y expansión de cultivos primarios de fibroblastos y de macrófagos a partir de la lámina propia intestinal de lechones (véase Fig.3).

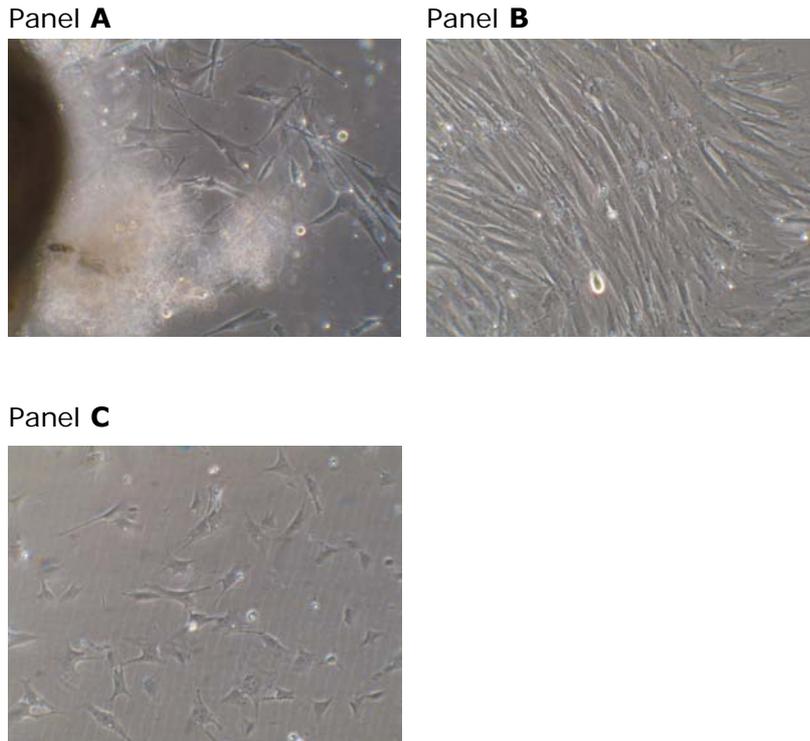


Figura 3. Aspecto de cultivos primarios de fibroblastos porcinos a partir de explantes de mucosa de íleon el sexto día de cultivo (**panel A**). Imagen de cultivo primario establecido de fibroblastos porcinos tras cuatro pases y 28 días post-extracción (**panel B**). Aspecto de macrófagos obtenidos a partir de la lámina propia de íleon (**panel C**)

Para examinar el comportamiento de las cepas atenuadas en cultivos primarios de macrófagos intestinales porcinos (SIM) de la lámina propia se realizó un ensayo de protección a gentamicina. La tasa de crecimiento o persistencia de la bacteria en el interior de estas células se expresó como “índice de proliferación” (I_{pro}), que se calculó como el cociente del número de bacterias intracelulares a las 2 y 24 horas postinfección (Cano et al., 2001a). La comparación de los valores de I_{pro} de las cuatro estirpes, mostró que la tasa de crecimiento intracelular de los mutantes $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ era ligeramente superior a la de la estirpe silvestre (véase Fig. 3), y especialmente destacable, que las tres cepas logran persistir e incluso proliferar en macrófagos extraídos de la lámina propia intestinal mientras que, la cepa vacunal comercial es eliminada prácticamente al cabo de las 24 horas postinfección (Fig. 4).

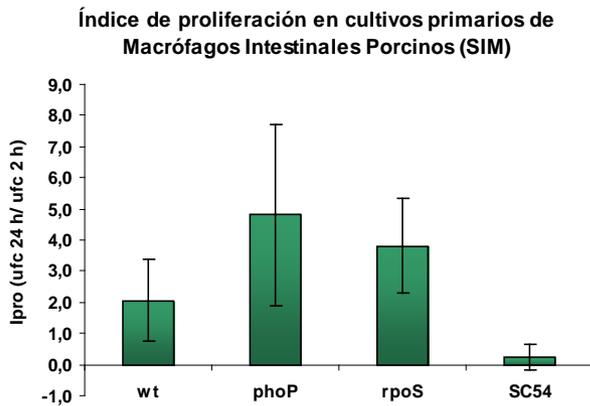


Figura 4. Índice de proliferación (Ipro) del serovar *Choleraesuis* y los mutantes isogénicos $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, así como la cepa vacunal SC-54 en el interior de cultivos primarios de macrófagos intestinales de lechón. El valor de Ipro resulta de calcular el cociente entre el número de bacterias viables a las 2 y a las 24 horas postinfección. Los valores mostrados son la media y el error estándar de un mínimo de tres experimentos independientes

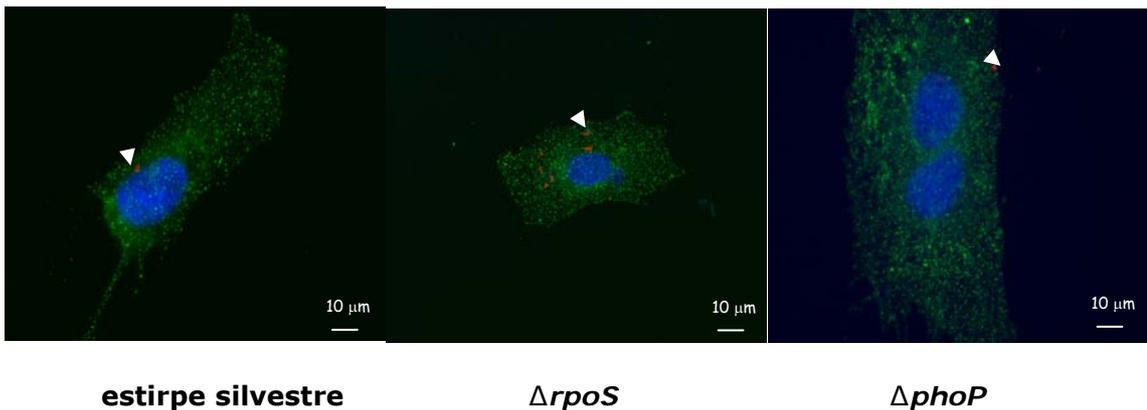


Figura 5. Persistencia intracelular a las 24 horas postinfección de *S. Choleraesuis* en el interior de macrófagos procedentes de cultivos primarios de intestino delgado de lechones. SC-54 no sobrevive y por eso no se muestran datos. Para visualizar la bacteria (señalada con flechas) se realizó un inmunomarcaje con anticuerpo frente a LPS (rojo). El marcador específico de superficie de macrófagos CD14 se detecta mediante anti-CD14 porcino (Serotec) y se observa como punteado verde en toda la superficie celular. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

Los fibroblastos de regiones anatómicas distintas presentan características fenotípicas que se mantienen incluso después de ser cultivados *in vitro* durante periodos de tiempo prolongados (Buckley et al., 2001). Se utilizaron lechones de entre 3 y 5 semanas para

aislar fibroblastos del intestino delgado (íleon) que se expandieron hasta conseguir un cultivo primario. Una vez que el cultivo presentó un aspecto homogéneo (Fig. 3), las células se infectaron con la estirpe silvestre, la vacuna comercial SC-54 y los mutantes $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$.

La capacidad de las estirpes para proliferar en el interior de estos fibroblastos en cultivo primario se examinó mediante un ensayo de protección a gentamicina, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. La tasa de crecimiento de la bacteria en el interior de estas células no se pudo expresar como "índice de proliferación" (Ipro) calculado de la misma forma que en el caso de los macrófagos (recuento bacteriológico en medios de cultivo), porque comprobamos que existía un porcentaje de células muertas en las que las bacterias crecían considerablemente y enmascaraba el comportamiento de lo que ocurría en las células vivas, que son las que nos interesan como dianas de los vehículos vacunales. Con estos antecedentes, se decidió determinar de forma más precisa el número de bacterias en el interior de células vivas individuales, a las 2 y 24 horas postinfección (p.i.) mediante observación microscópica de 100 células infectadas procedentes de tres experimentos independientes. Las bacterias se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello, se cultivaron las células sobre lentillas de 11 mm antes de las infecciones, posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con saponina al 0,2% según protocolos estándares (Cano et al., 2001a). Para detectar *Salmonella* se utilizaron anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-LPS (Lipopolisacarido) (Difco) y anticuerpos secundarios anti-conejo marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma, Chemicon, Alexa 488 –verde- y alexa 594 –rojo-; Molecular Probes). Finalmente, se usó DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; 1 μ g/ml) para teñir los núcleos celulares. En la figura 6 se muestra el porcentaje de células infectadas conteniendo un número bajo <5; medio 6-20; o elevado >21, de bacterias a las 2 y 24 horas p.i. Casi la totalidad de las células infectadas con la estirpe silvestre (95,1%) contenían entre 1-5 bacterias a las 2 horas p.i, y un pequeño porcentaje (4,9%) 6-20 bacterias (véase Fig. 6A). A las 24 horas p.i., la proporción de células infectadas con bajo número de bacterias (1-5) disminuyó hasta el 63,1%, aumentando el número de células

que presentaban un número medio de bacterias intracelulares (6-20) (24,2%) y apareciendo un pequeño porcentaje de células con un elevado número de bacterias (12,7%) (véase Fig. 6A). Cuando se analizó la población de células infectadas con $\Delta phoP$ a las 2 horas p.i., la mayoría presentaron 1-5 bacterias en su interior (véase Fig. 6B). Sin embargo, a las 24 horas p.i., un gran número de estas células (69,6%) presentaban más de 20 bacterias intracelulares. Estas bacterias se alojaban en grandes vacuolas (véase Fig. 7D). Del mismo modo que sucedió en $\Delta phoP$, el 71,9% de las células infectadas con $\Delta rpoS$ a las 2h p.i., contenían entre 1 y 5 bacterias (véase Fig. 7C). Veintidós horas más tarde, la distribución de células infectadas se invertía y un 79,9% de las células infectadas presentaban grandes bolsas con más de 20 bacterias mientras que, únicamente un 10,6% presentaría entre 1-5 (véanse Fig. 7C y 7F). Finalmente, no se muestran los datos obtenidos con la cepa vacunal comercial SC-54 porque no se pudieron encontrar células vivas infectadas tras 24 horas p.i, incluso a las 2 horas p.i. el número de células infectadas era muy escaso y todas ellas presentaban un número de bacterias comprendido entre 1 y 5.

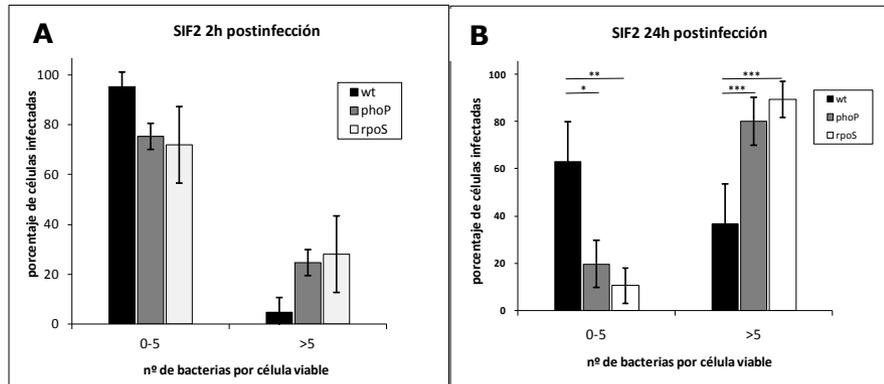
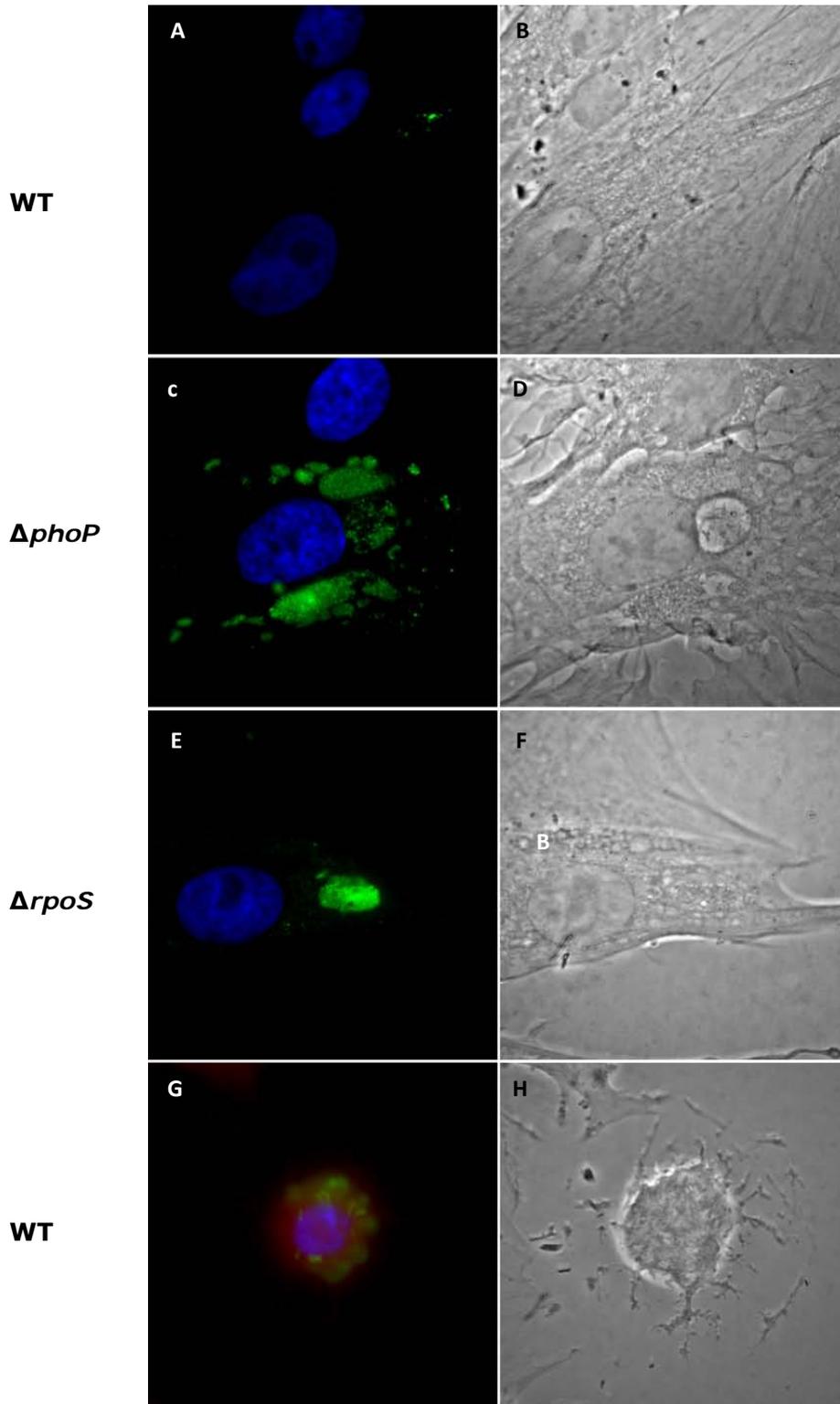


Figura 6. Estimación del número de bacterias intracelulares en el interior de fibroblastos primarios de intestino de lechón. Las células fueron infectadas con la estirpe silvestre (negro), $\Delta phoP$ (gris) y $\Delta rpoS$ (blanco). Mediante inmunomarcaje con anti-LPS y observación microscópica de las muestras, se cuantificó el número de bacterias intracelulares en un total de 100 células infectadas viables por cada estirpe a las 2 y 24 horas postinfección en tres experimentos independientes. Las gráficas reflejan la media aritmética del porcentaje de células que estaban infectadas con diversos intervalos de número de bacterias (1-5, 6-20, >21). El análisis estadístico se realizó mediante el cálculo de la t de Student, en el que las diferencias entre los valores señalados mediante el análisis de varianza se corresponden con una* $p < 0.05$ diferencias considerablemente significativas; ** $p < 0.01$, muy significativas; *** $p < 0.001$, extremadamente significativas.

Figura 7. Inmunofluorescencia (columna de la izquierda) y contraste de fase (columna de la derecha) de cultivos primarios de fibroblastos intestinales de cerdo infectados por el serovar *Choleraesuis* y los mutantes isogénicos $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$. Los paneles A y B muestran fibroblastos en cultivo infectados por la estirpe silvestre a las 24 horas postinfección (p.i.). Los paneles C y D corresponden a fibroblastos infectados por $\Delta phoP$ a las 24 horas p.i. En los paneles E y F se observa a $\Delta rpoS$ en el interior de fibroblastos intestinales transcurridas 24 horas de la infección. G y H se corresponden a células muertas llenas de *Salmonella* WT a las 24 horas p.i.



DISCUSIÓN

En este capítulo se han construido dos cepas nulas en el sistema regulador *phoP/Q* ($\Delta phoP$) y *rpoS* ($\Delta rpoS$) (factor sigma alternativo) con unas características que las cualifican para ser consideradas como excelentes candidatos para desarrollar vehículos vacunales altamente adaptados al cerdo como hospedador. Los métodos empleados para su construcción cumplen con los requerimientos indispensables de seguridad biológica que deben presentar las vacunas de nueva generación modificadas genéticamente ya que, por una parte, se asegura la estabilidad de las mutaciones puesto que, la reversión al fenotipo silvestre está totalmente impedida debido a la ausencia de dianas requeridas para la recombinación homóloga o ilegítima a partir de poblaciones naturales de bacterias y, por otra, las cepas vacunales construidas carecen de marcadores de resistencia a antibióticos. Entre los diversos serovares de *Salmonella enterica*, Choleraesuis presenta, por su especial tropismo por el cerdo y su alta capacidad de invasión en el organismo, especiales ventajas para ser propuesta como vehículo de inmunización a nivel de las mucosas (Chiu et al., 2004).

La cuidadosa elección del tipo de mutación escogida para diseñar cepas atenuadas constituye un factor esencial para dirigir las características y la calidad de la respuesta inmunitaria que se pretende alcanzar. Tradicionalmente se han empleado mutantes auxótrofos de *Salmonella* como cepas vacunales atenuadas. Sin embargo, se ha demostrado en el modelo murino que son poco inmunogénicas (Daudel et al., 2007). Otro grupo bien estudiado de cepas atenuadas de *Salmonella* lo constituyen mutantes en genes implicados en la regulación de su virulencia. Entre éstos, cepas bacterianas deficientes en los genes *phoP* y *phoQ*, que forman parte de un sistema regulador de dos componentes, fundamental en la virulencia de *Salmonella* (Hohmann et al., 1996a; Hohmann et al., 1996b), y cepas deficientes en *rpoS* que codifica el factor sigma alternativo (RpoS) (Coynault et al., 1996), han sido construidos y ampliamente estudiados como potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas frente a la fiebre tifoidea humana y murina.

Los productos de los genes controlados por el sistema regulador PhoP/Q juegan un papel determinante en la patofisiología de *S. Typhi* y *S. Typhimurium*, esencialmente promoviendo una resistencia frente a los mecanismos de defensa de la respuesta inmunitaria innata. RpoS constituye también un regulador global que controla la expresión de numerosos genes necesarios para la virulencia de *S. Typhi* y *S. Typhimurium* (Coynault *et al.*, 1996).

Debido, fundamentalmente, a la posibilidad de trabajar con el ratón como modelo experimental sencillo y económico, gran parte de los trabajos realizados en cuanto a la atenuación de las cepas de *Salmonella* se han basado en el serovar *Typhimurium*. Sin embargo, los factores de virulencia no se pueden extrapolar de un serovar a otro y, mucho menos, de un hospedador a otro. Por eso, recientemente, se han abierto líneas de investigación que han dado lugar a cepas vacunales frente a *Salmonella* de aplicación en cerdos basadas en genes metabólicos (Kelly *et al.*, 1992) o a mutantes atenuados afectados en genes esenciales para la persistencia de *Choleraesuis* en cerdo (Ku *et al.*, 2005). En este capítulo, hemos construido mutantes deficientes en los sistemas reguladores PhoP/Q (Δ *phoP*) y RpoS (Δ *rpoS*) de *S. Choleraesuis* y en consonancia con los resultados descritos previamente en *S. Typhimurium*, muestran una drástica atenuación de su virulencia en el modelo murino de infección. Además, se corroboró esta atenuación en el cerdo como hospedador adaptado para el serovar *Choleraesuis*. Es interesante resaltar la mayor atenuación en la virulencia de *phoP* en los dos modelos animales de infección experimental. Aunque este resultado está de acuerdo con el comportamiento descrito por Δ *phoP* de *S. Typhimurium* en el modelo murino por otros autores, (Coynault *et al.*, 1996; Hohmann *et al.*, 1996b), desconocemos de momento si puede tener repercusión en la inmunidad inducida por las cepas atenuadas cuando se utilicen como vehículos vacunales. Existen en el mercado vacunas atenuadas de *S. Choleraesuis*, como SC-54, atenuadas empíricamente mediante pases en cultivos celulares de neutrófilos porcinos (Roof and Doitchinoff, 1995) y que a pesar de sus buenos resultados inmunogénicos, presenta cierta virulencia residual, lo cual no la hace apta para su uso en zonas endémicas para *S. Choleraesuis* como Taiwán (Ku *et al.*, 2005). Sorprendentemente, tanto Δ *phoP* como Δ *rpoS* presentan una mayor

atenuación con respecto a SC-54 en infecciones mixtas en el modelo murino. Además, la atenuación de $\Delta phoP$ en el modelo porcino sigue siendo superior a la presentada por la cepa comercial, SC-54.

Salmonella es un patógeno intracelular facultativo, y como tal, ha evolucionado para poder residir y multiplicarse en el interior de células dendríticas y macrófagos localizadas en las placas de Peyer y otros tejidos linfoides situados en el intestino delgado, que constituyen las principales vías de entrada del patógeno a través de la mucosa intestinal (Hopkins *et al.*, 2000). De esta forma, se desarrolla una respuesta inmunitaria local variable en función de la velocidad y el mecanismo de entrada de la bacteria (Martinoli *et al.*, 2007; Niess *et al.*, 2005).

La falta de supervivencia y proliferación en células dianas del sistema inmunitario constituye uno de los principales inconvenientes en la utilización de bacterias intracelulares atenuadas como vehículos vacunales. Los resultados obtenidos en este capítulo, muestran como $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ presentan un comportamiento similar a la cepa silvestre en el interior de macrófagos primarios obtenidos a partir de la lámina propia intestinal porcina (SIM). Estos resultados contrastan con el comportamiento de la cepa atenuada comercial SC-54, que es incapaz de sobrevivir en el interior de estas células del sistema inmunitario.

La ausencia del sistema regulador PhoP-PhoQ se ha relacionado con la capacidad de supervivencia en el interior de macrófagos por parte de *Salmonella* (Groisman and Ochman, 1997; Ohi and Miller, 2001). Sin embargo, la bibliografía relacionada con la proliferación de *Salmonella* en el interior de macrófagos en cultivo muestra con cierta frecuencia resultados discordantes. Así, hay trabajos que describen incrementos en el número de bacterias que van desde un ligero aumento hasta dos logaritmos a las 24 horas postinfección, una escasa o casi nula proliferación e incluso una disminución en el número de bacterias viables (Buchmeier and Heffron, 1989a; Okamura *et al.*, 2005b; Pietila *et al.*, 2005; Schwan *et al.*, 2000b). Variables como el tipo de cultivo utilizado, la opsonización o no de la

bacteria antes de la invasión, el fondo genético de las células, el binomio serovar-hospedador y el grado de activación de los macrófagos, son posibles causas de estas discrepancias. Las líneas celulares de macrófagos estables resultan más permisivas a la proliferación intracelular de *Salmonella* que los cultivos primarios (Buchmeier and Heffron, 1989a; Schwan et al., 2000b). También se ha demostrado que el serovar Typhi es capaz de sobrevivir y proliferar en el interior de macrófagos humanos pero no en el interior de macrófagos de ratón, mientras que el serovar Typhimurium sobrevive y prolifera en el interior de macrófagos murinos pero no humanos (Schwan et al., 2000b; Vladoianu et al., 1990). Además, en la bibliografía disponible sobre el regulador RpoS se han descrito nuevamente resultados controvertidos, en los que algunos autores lo consideran esencial en la respuesta de *Salmonella* frente al ataque de los macrófagos (Cano et al., 2001b; Coynault et al., 1996), mientras otros señalan que mutantes $\Delta rpoS$, aunque atenuados, son capaces de replicarse en el interior de cultivos de macrófagos (Khan et al., 1998a; Nickerson and Curtiss, 1997). Además, la supervivencia de *S. Choleraesuis* en el interior de macrófagos alveolares porcinos parece no correlacionarse directamente con su virulencia en cerdos (Paulin et al., 2007; Watson et al., 2000), estos resultados apoyan los resultados obtenidos en este apartado, en el que la atenuación de $\Delta rpoS$ en el modelo porcino se relaciona con una capacidad para sobrevivir en el interior de macrófagos procedentes de cultivos primarios del intestino de cerdo. Según estos datos, la supervivencia intracelular en SIM de las cepas construidas en *S. Choleraesuis* podría estar relacionada con un polinomio cepa-serovar-hospedador-origen celular.

En la lámina propia intestinal encontramos un nuevo tipo celular que parece jugar un importante papel en la respuesta inmunitaria del hospedador, los fibroblastos (Adegboyega et al., 2002; Buckley et al., 2001). Hasta hace poco tiempo, los fibroblastos eran considerados una población homogénea de células con las únicas funciones de prestar un soporte estructural a los tejidos y de reparación de lesiones tisulares. Sin embargo, en la actualidad se sabe que los fibroblastos constituyen una población heterogénea formada por distintas subpoblaciones que intervienen en procesos

tan variados como la organogénesis, el control de la motilidad intestinal o la respuesta inmunitaria (Powell et al., 1999a, b; Smith et al., 1997). Los fibroblastos participan activamente en la generación de la respuesta inflamatoria aguda y en su transición hacia la respuesta inmunitaria adquirida (Buckley et al., 2001). Se las considera células centinela del sistema inmunitaria en los tejidos, donde responden a daños tisulares o a la invasión de microorganismos produciendo matriz extracelular y liberando quimiocinas que median la atracción, acumulación, supervivencia y diferenciación de las células inflamatorias (Buckley et al., 2001; Parsonage et al., 2005).

Ha sido descrito que, cuando *Salmonella* infecta líneas celulares de tipo fibroblasto, la bacteria intracelular no inicia la fase de crecimiento ni causa citotoxicidad como en otros tipos celulares, sino que permanece en un estado de persistencia (Cano et al., 2001b; Martínez-Moya et al., 1998), este dato se ha corroborado *in vivo*, demostrando la presencia de *S. Typhimurium* en el interior de células no fagocíticas de la lámina propia intestinal en el ratón (Boyle et al., 2007; Tierrez and Garcia-del Portillo, 2005). Sin embargo, mutantes en los sistemas reguladores RpoS y PhoP/PhoQ producen un sobrecrecimiento de *S. Typhimurium* en líneas celulares inmortalizadas de fibroblastos de rata (Cano et al., 2001a). Basándonos en los conocimientos descritos en la patogénesis de *S. Typhimurium*, planteamos la posibilidad de que mutantes en los reguladores RpoS y PhoP/PhoQ de *S. Choleraesuis* tuvieran un comportamiento similar, especialmente interesante para su aplicación como cepas vacunales. Los datos obtenidos al analizar el comportamiento de las cepas bacterianas $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$, WT y SC-54 al interactuar con cultivos primarios de fibroblastos procedentes de lámina propia intestinal (SIF) mediante el cálculo del denominado índice de proliferación (Ipro), revelan un incremento neto de la cantidad total de bacteria en todos los casos. Sin embargo, la determinación del Ipro proporciona un dato esencialmente cuantitativo del aumento del número de bacterias intracelulares de tal manera que este incremento podía ser debido a un discreto crecimiento intracelular de *Salmonella* en todas las células infectadas o, por el contrario, a una mayor tasa de multiplicación bacteriana en

sólo un grupo de células. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se realizó un estudio más exhaustivo mediante el recuento del número de bacterias en el interior de células individuales a las 2 y 24 horas postinfección (p.i.) y se constató que únicamente $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ presentan un fenotipo de proliferación en el interior de SIF, en claro contraste con el estado de no proliferación mostrado por WT y SC-54. Las discrepancias entre los dos métodos para medir la proliferación bacteriana podrían ser explicadas por el hecho de que en el caso de WT, se observaron grandes bolsas de bacterias proliferando en células eucariotas muertas, que evidentemente no presentan interés desde un punto de vista biotecnológico, y que enmascaraban la carga neta total intracelular. Este comportamiento no fue exclusivo de la cepa silvestre, sino que también se observó en el caso de $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$. Una posible explicación podría encontrarse en el efecto letal de las bacterias en el interior de fibroblastos, sin embargo esto no parece muy plausible ya que en el caso de $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, también se localizaron numerosas células vivas repletas de bacterias. Por lo tanto, un escenario más probable para explicar estos hallazgos podría ser el hecho de una multiplicación en células previamente moribundas o muertas sin defensas para establecer una correcta interacción célula-bacteria. Teniendo en cuenta estos datos, sólo se estimaron las bacterias presentes en el interior de células viables. Con estas consideraciones, es interesante destacar que a diferencia de lo que ocurre en *S. Typhimurium*, en la que $\Delta rpoS$ presenta una menor proliferación que $\Delta phoP$ (Cano et al., 2001b), en *S. Choleraesuis* ambos mutantes exhiben un fenotipo similar. Por el momento, desconocemos la posible influencia en estos resultados de las propiedades específicas de cada serovar, la utilización de líneas celulares no inmortalizadas o la mayor precisión de los ensayos de proliferación en los que sólo se han tenido en cuenta bacterias presentes en células vivas.

En cultivos celulares de macrófagos y células epiteliales, *Salmonella* se multiplica hasta alcanzar un alto número de bacterias intracelulares. Sin embargo, *in vivo*, las células infectadas no suelen albergar más de 1-2 bacterias (Brown et al., 2006; Mastroeni and Sheppard, 2004; Sheppard et al., 2003). Un excesivo crecimiento intracelular podría tener como resultado la destrucción de la célula

hospedadora y la consiguiente liberación de la bacteria al medio extracelular. Una vez libre, el patógeno quedaría expuesto a la acción de células fagocíticas, especialmente células dendríticas, que actuarían como células presentadoras de antígeno de los linfocitos T, lo que incrementaría la respuesta inmunitaria frente a la bacteria por lo que constituiría una estrategia de suicidio bacteriano (Sundquist *et al.*, 2004). Estos resultados pueden proporcionar a $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ importantes ventajas biotecnológicas para utilizarse como vehículos de expresión de antígenos heterólogos o bien de vehículos para vacunas de ADN (como veremos en los capítulos siguientes).

Considerando los resultados de este capítulo en su conjunto, podemos afirmar que la construcción de los mutantes $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$ nos ha permitido desarrollar un nuevo concepto de atenuación de la virulencia de *Salmonella*. Así, empleando cultivos celulares primarios de cerdo (obtenidos por primera vez en nuestro laboratorio) normalmente no permisivos para el crecimiento de *S. Choleraesuis* (fibroblastos de la lámina propia intestinal) las cepas construidas presentan un fenotipo de proliferación elevado en células viables, a diferencia de lo que ocurre con la cepa silvestre e incluso con una vacuna viva atenuada comercial (SC-54). Además, persisten en cultivos de macrófagos primarios obtenidos de la lámina propia de la mucosa intestinal, a diferencia de lo que ocurre con la cepa viva atenuada comercial que es eliminada, lo que podría proporcionar una mayor estimulación de la respuesta inmunitaria. Estos hechos nos llevan a considerar a las cepas $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ como excelentes candidatos para desarrollar vehículos vacunales altamente adaptados al cerdo como hospedador lo que, de momento, se ha traducido en la concesión y publicación de una patente en la Oficina Española de Patentes y Marcas sobre la aplicación como vehículo vacunal de $\Delta rpoS$ de *S. Choleraesuis*.

Capítulo 2

Utilización de $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Choleraesuis como vehículos de bacto-fección

Comparadas con otros métodos de inmunización, las vacunas de ADN ofrecen importantes ventajas como la facilidad de su desarrollo, su alto perfil de bioseguridad, adaptación a los animales de laboratorio, facilidad de producción en masa, y su capacidad potencial para desencadenar una respuesta inmunitaria de base humoral y celular (Daudel et al., 2007). Sin embargo, su principal desventaja es la baja inmunogenicidad en comparación con los métodos tradicionales de vacunación. Para intentar subsanar este importante inconveniente, se han utilizado novedosas estrategias, entre ellas, el aumento de la eficiencia de transfección (Dietrich et al., 2003b; van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2004) y la liberación a nivel de mucosas de ADN plasmídico a través de bacterias intracelulares de administración oral (Dietrich et al., 2003b), concepto que se ha denominado bacto-fección (Daudel et al., 2007).

Durante los últimos años, se ha desarrollado un interesante sistema que implica la utilización de *Salmonella* en la liberación del ADN que se expresa en las células eucariotas infectadas por la bacteria (Dietrich et al., 2003b). Mediante el empleo de cepas de *Salmonella* para liberar vacunas de ADN, se puede lograr que dichas vacunas induzcan inmunidad frente a la cepa de *Salmonella* utilizada como vehículo y frente al antígeno (o antígenos) heterólogo codificado por la vacuna de ADN (Weiss, 2003). Sin embargo, la falta de cepas adecuadas disponibles como vectores es el principal factor limitante para el desarrollo de este tipo de vacunas. El éxito de las vacunas recombinantes vivas dependerá en gran parte, de la consecución de una nueva generación de vectores con características optimizadas en cuanto a seguridad e inmunogenicidad y un aspecto que no ha sido considerado hasta ahora, la adaptación a un hospedador determinado, en nuestro caso, el ganado porcino.

En el capítulo anterior describíamos cómo dos cepas atenuadas del serovar Choleraesuis $\Delta rpoS$ $y\Delta phoP$, reunían un conjunto de características idóneas para ser utilizados como vehículos vacunales (Dominguez-Bernal et al., 2008). En este capítulo, vamos a describir su utilización como vehículos de bacto-fección de un antígeno modelo, 3xFLAG en el modelo murino.

El esquema general de este capítulo se describe en la fig. 1.

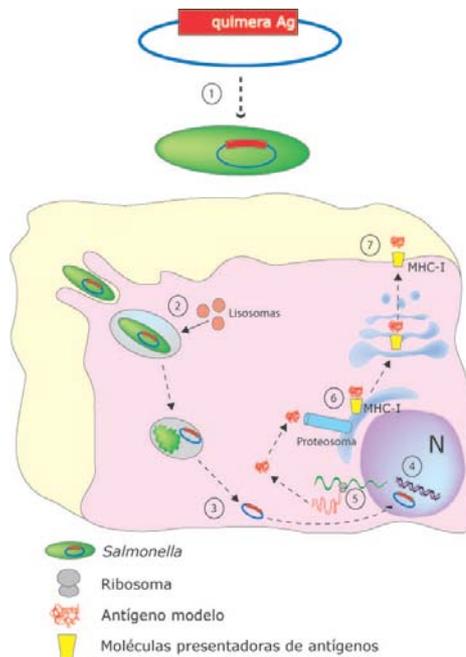


Figura 1. Esquema resumen de la estrategia que se va a desarrollar en este capítulo. (1) Introducción del vector en *Salmonella*. (2) Entrada de *Salmonella* en la célula. (3) Lisis de la bacteria y liberación del vector al citoplasma celular. (4) Transcripción del vector en el núcleo. (5) Traducción en el citoplasma del ARNm. (6) Degradación de la proteína antigénica por el proteosoma y unión con la molécula del MHC clase I. (7) Presentación del complejo antígeno/MHC I en la superficie celular.

RESULTADOS

4.1. Construcción de l vector e específico de l liberación de l antígeno

Con el fin de evaluar la capacidad de $\Delta rpoS$ y $\Delta phoP$ como vehículos de ADN, iniciamos el estudio mediante la construcción de un "cassette inmunogénico" (Fig. 2) que codifica un antígeno modelo formado por 23 aminoácidos (epítipo 3xFLAG®, SIGMA), fácilmente evaluable mediante anticuerpos comerciales. Para construir este cassette, se han diseñado oligonucleótidos de gran tamaño con capacidad para hibridarse entre sí mediante una PCR con tiempos de

elongación muy cortos. Estos oligonucleótidos presentan en sus extremos secuencias para dianas de restricción que posteriormente, nos permitieron clonar el cassette en el vector de expresión eucariota seleccionado. La reciente publicación de un artículo (Bauer et al., 2005) en el que se describía el vector de expresión eucariota pCMV β m2A como plásmido de elección por su estabilidad para la expresión de antígenos heterólogos en *Salmonella*, nos impulsó a utilizarlo como vector de elección para clonar el cassette 3xFLAG, y así, hemos construido el vector pCMV::3xFLAGm2A que ha sido introducido mediante electroporación en las cepas vacunales $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y en SC-54 como control, para ser analizado como vacuna de ADN de un antígeno modelo, 3xFLAG, empleando $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ como vehículos (véase esquema en Fig. 1).

Cassette 3xFLAG®

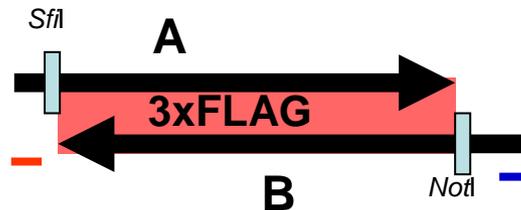
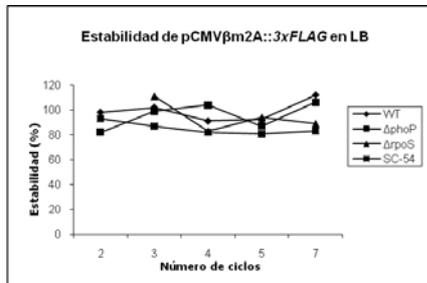


Figura 2 . Representación esquemática del cassette formado por los dos oligonucleótidos que hibridan entre sí (A y B) y originan el epítipo modelo (3xFLAG®). En los extremos de los oligos se representan las dianas de restricción (*SfiI* y *NotI*) para clonarlo en pCMV β m2A.

4.2. Estabilidad *in vitro* del vector pCMV::3xFLAGm2A en *Salmonella*

El estudio de la estabilidad del vector construido en las cepas de *S. Choleraesuis* constituye un importante parámetro para lograr una vacunación satisfactoria. Los resultados muestran que de acuerdo con lo que se había publicado para pCMV β m2A en el serovar Typhimurium (Bauer et al., 2005), pCMV::3xFLAGm2A se mantiene estable en *S. Choleraesuis* al menos durante una semana, sin la presencia de la presión selectiva antibiótica.

A



B

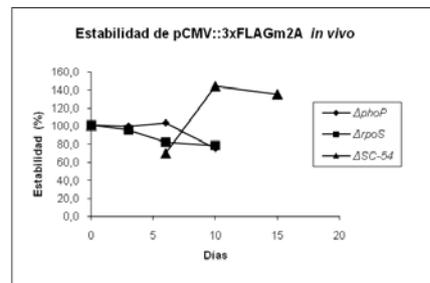


Figura 3. Representación esquemática de la estabilidad de pCMV::3xFLAGm2A en *S.Choleraesuis* WT, $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54 *in vitro* (A) e *in vivo* (B) La estabilidad del vector en las diferentes cepas se determinó, *in vitro*, mediante el recuento en medio bacteriológico LB con y sin antibiótico, de una dilución de un cultivo tras 24 horas de incubación y tras varios ciclos de cultivo en LB líquido sin antibiótico. *In vivo*, se obtuvieron muestras a partir de linfonódulos mesentéricos a lo largo de 20 días y hasta que desaparecieron las bacterias.

4.3. Estabilidad *in vivo* del vector p CMV::3xFLAGm2A en *Salmonella*

Con el fin de analizar la permanencia del vector en las cepas vacunales presentes en los órganos diana de *Salmonella* en el modelo murino de infección, se realizaron inoculaciones de cada cepa vacunal con dosis de inmunización de 10^9 ufc por vía oral a grupos de 10 ratones BALB/c, que se sacrificaron cada dos días durante un periodo de 15 días. Se analizó la colonización de bazo, hígado y nódulos mesentéricos así como la presencia del plásmido en las bacterias recuperadas, mediante siembra en placas de LB con y sin antibiótico, de homogeneizados de los citados órganos. Los resultados se muestran en la fig. 3B. Se comprobó que el vector se mantiene estable hasta que se puede hacer un recuento de bacterias en órganos, con diferencias inherentes a la variabilidad de los experimentos *in vivo*. Estos datos nos permiten afirmar que $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ constituyen vectores para la bacto-fección de antígenos heterólogos en células eucariotas, con excelentes posibilidades para ser empleados como vacunas orales de ADN vehiculadas en *S. Choleraesuis*.

4.4. **Análisis de los niveles de expresión del antígeno modelo 3xFLAG vehiculado como vacuna de ADN por $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ en macrófagos murinos**

Con el objetivo de estudiar si se producía la expresión de 3xFLAG *in vitro*, se han realizado infecciones con las cepas vacunales portadoras de pCMV::3xFLAGm2A y pCMV β m2A en macrófagos murinos. Los niveles de expresión se han determinado mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) a partir de cADN obtenido del mRNA extraído de células infectadas, como se describe según protocolos incluidos en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Como se puede observar en la fig.4, las dos cepas desarrolladas en este proyecto son capaces de inducir la expresión del antígeno vehiculado en macrófagos a niveles similares, o incluso superiores (en el caso de $\Delta phoP$) que los inducidos por WT. Estos datos contrastan claramente con la ineficiencia como elemento de bacto-fección por parte de la cepa vacunal comercial SC-54.

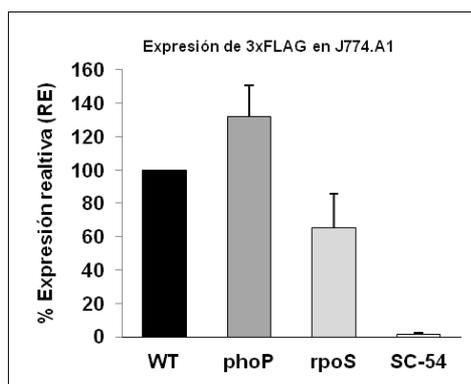


Figura 4. Niveles de expresión de 3xFLAG en macrófagos murinos. Los datos representan los valores de expresión obtenidos mediante qPCR a partir de cultivos de macrófagos infectados con cada una de las cepas que contienen el vector pCMV::3xFLAGm2A, relativizado con los valores de la misma cepa portadora del plásmido pCMV β m2A. Cada valor fue normalizado con los niveles de expresión de β actina obtenidos para cada muestra. Finalmente, se representan los datos considerando 100 % de expresión los niveles presentados por la cepa WT.

4.5. Evaluación de la respuesta inmunológica de la vacuna de ADN vehiculada por $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ usando 3xFLAG como antígeno modelo

Una vez estudiados los elevados niveles de expresión mediante bactofoección con $\Delta phoP/pCMV::3xFLAGm2A$ y $\Delta rpoS/pCMV::3xFLAGm2A$ en macrófagos murinos, decidimos analizar la eficacia e inmunogenicidad de dichas cepas, comparadas con SC-54/pCMV::3xFLAGm2A en el modelo murino. Para ello, se inocularon vía oral con dosis de $0,5-1 \times 10^{10}$ ufc en el caso de $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ y 1×10^9 en SC-54, tres lotes de cinco animales (hembras BALB/c entre 6 y 8 semanas de edad), en los que se incluyeron cada una de las cepas vacunales además de un control no vacunado. En todos los casos (salvo el control inmunizado con PBS) se realizó una reinmunización a las 3 semanas. La seguridad de las vacunas se evaluó monitorizando el estado clínico de los ratones durante 6 semanas, no encontrándose sintomatología reseñable. Las muestras de sangre para serología se obtuvieron el día de la vacunación (previamente a la misma), a los 21, y 41 (fecha de sacrificio) días postinoculación (p.i.). La respuesta sistémica humoral en suero (IgG) y en la mucosa intestinal (IgA) frente a *Salmonella* y frente al antígeno vehiculado (3xFLAG) se evaluó mediante ELISA indirecto. Como se puede observar en la fig. 5A, a lo largo del experimento se obtuvieron niveles elevados y estadísticamente significativos ($P < 0.0001$) de IgG séricos específicos frente a *Salmonella* en todos los grupos de ratonas inmunizadas con las cepas $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54, con respecto al grupo control inmunizado con PBS. Estos resultados indican que los antígenos bacterianos han sido correctamente capturados, procesados y presentados por las células presentadoras de antígeno. Cuando se analizaron los niveles de IgG específicos frente al epítipo 3xFLAG a lo largo del experimento, se observaron niveles elevados en los grupos de ratonas inmunizadas con las cepas $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54, con valores estadísticamente significativos con respecto al grupo control (véase fig. 5B). Los niveles de IgG se incrementaron rápidamente después de la primera inmunización, obteniéndose los mayores valores a las 3 semanas p.i.. Sorprendentemente, los niveles de IgG específicos frente a 3xFLAG disminuyeron después de la segunda inmunización, llegando a ser en el caso de $\Delta rpoS$, aunque los valores fueron más elevados

que los que presentaba el grupo control, no estadísticamente significativos (véase fig.5B).

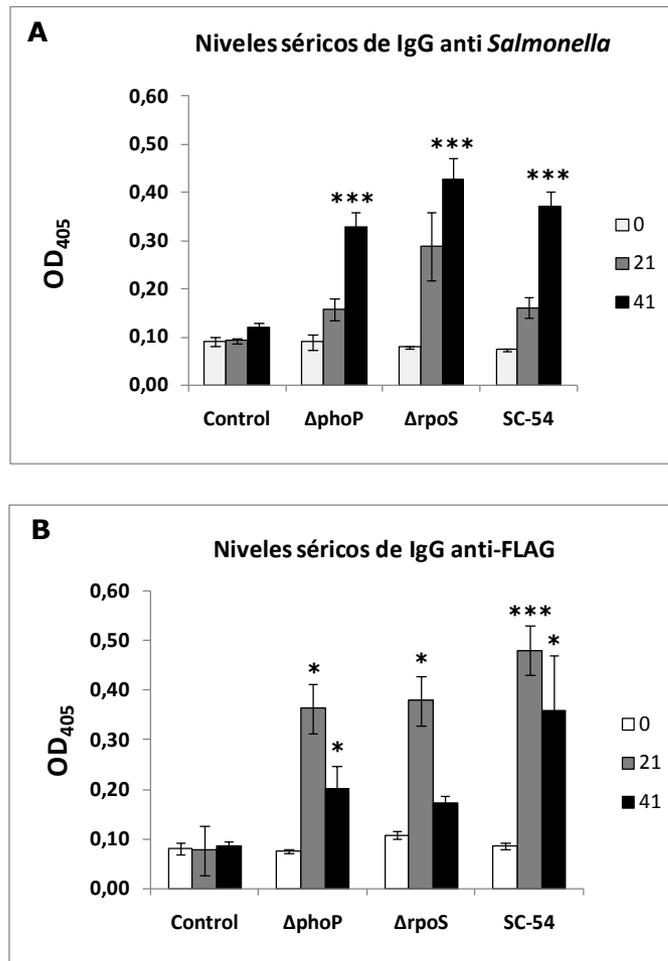


Figura. 5. Respuesta serológica de ratonas BALB/c inmunizadas con *S. Choleraesuis*. . Se representa la producción de IgG séricas específicas frente a *Salmonella* (A) y frente a 3xFLAG (B) a partir de sueros obtenidos de animales inmunizados con *S. Choleraesuis* $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54 transportando el vector pCMV3xFLAGm2A. Grupos de 4-6 ratonas fueron inoculadas vía oral los días 0 y 21 con una dosis de $0,5-1 \times 10^{10}$ ufc en el caso de cada uno de los mutantes, 1×10^9 ufc en el caso de SC-54 y PBS en el grupo control. Los sueros se recogieron en el día 0, previo a la inoculación, en el día 21, antes de la segunda dosis y en el día 41 (sacrificio) y se determinaron los niveles de IgG mediante ELISA indirecto. El suero fue diluido en PBS 1:100 para determinar los niveles anti-*Salmonella* y 1:5 para anti-3xFLAG. Los valores de absorbancia son las medias de datos individuales de cada ratón de todos los grupos \pm el error estándar de la media (S.E.M) de un experimento representativo realizado por duplicado. El análisis estadístico se realizó usando el test de Student; * $P < 0.05$ se considera significativo; ** $P < 0.01$, muy significativo; *** $P < 0.001$, extremadamente significativo.

Niveles elevados y estadísticamente significativos de IgA específicos frente a *Salmonella*, se encontraron a partir del fluido intestinal en los tres grupos de animales inmunizados con respecto al grupo control (véase fig. 6A). Además, niveles elevados y estadísticamente significativos ($P < 0.01$) de IgA específicos frente a 3xFLAG, se pudieron cuantificar en los grupos de animales inmunizados con $\Delta rpoS$ y SC-54 con respecto al grupo control. Sin embargo, en el caso de los animales inmunizados con $\Delta phoP$, no se encontraron niveles de IgA específicos frente a 3xFLAG estadísticamente significativos con respecto al grupo control (véase fig. 6B).

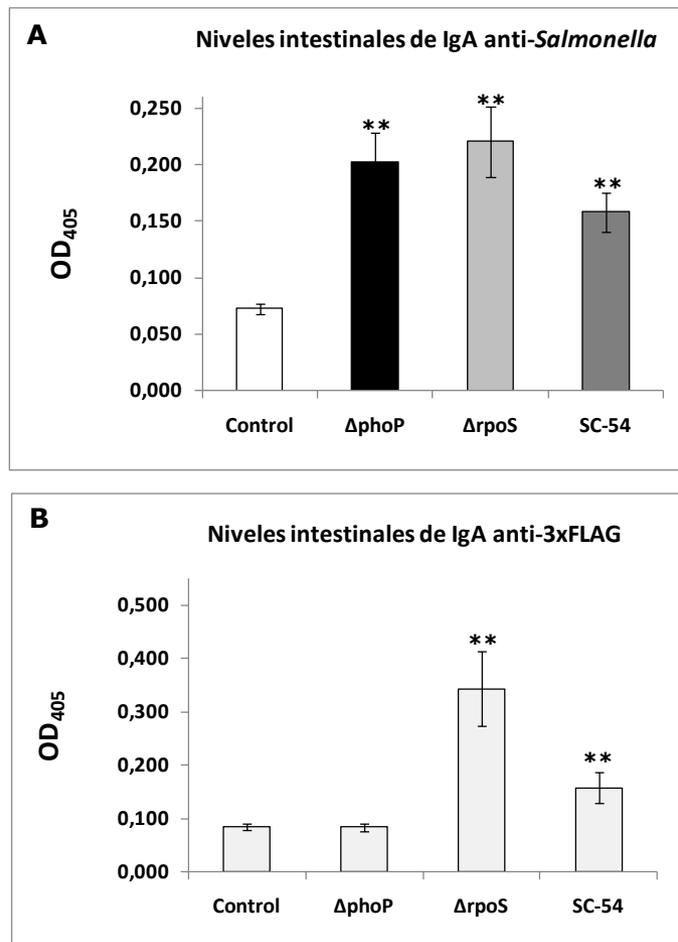


Figura 6 . Respuesta humoral a nivel de la mucosa intestinal de ratonas BALB/c inmunizadas con *S. Choleraesuis*. Se representa la producción de IgA intestinales específicas frente a *Salmonella* (A) y frente a 3xFLAG (B) a partir de lavados intestinales recogidos de animales inmunizados con *S. Choleraesuis* $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54 transportando el vector pCMV3xFLAGm2A. Las inmunizaciones se realizaron como se describe en la leyenda de la figura 5, los días 0 y 21 y se determinaron los niveles de IgA mediante un ELISA indirecto a partir de diluciones 1:5 en PBS de los lavados intestinales obtenidos inmediatamente después del sacrificio, tal y como se describe en materiales y métodos. Los valores de absorbancia son la media de los datos de los ratones de cada grupo \pm el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó usando el test de Student; * $P < 0.05$ se considera significativo; ** $P < 0.01$, muy significativo; *** $P < 0.001$, extremadamente significativo.

Una vez comprobada la eficacia de la respuesta inmunitaria humoral a nivel sistémico y a nivel de la mucosa intestinal, decidimos valorar la respuesta inmunitaria mediada por células. Para ello, se ha estudiado la producción de IL-2, IL-4, IL-10 y γ -IFN en sobrenadantes de esplenocitos en respuesta a la re-estimulación con extracto de *Salmonella* y a proteína FLAG. Los esplenocitos se obtuvieron a partir de los bazo de los distintos grupos de animales inmunizados y el control, sacrificados a los 41 días p.i. Los experimentos de estimulación se realizaron por triplicado para cada animal, y posteriormente, se mezclaron los sobrenadantes de cada grupo de inmunización para cuantificar las diferentes citoquinas (por duplicado), de acuerdo a las instrucciones de los kits de BD OptEIA™ específicos para cada citoquina (véase apartado correspondiente de materiales y métodos). No se pudieron detectar niveles cuantificables de IL-2, IL-4 e IL-10 en ninguno de los grupos. Sin embargo, se obtuvieron niveles de 3157,5pg/ml de γ -IFN en el grupo de animales inmunizados con $\Delta phoP$ (véase fig. 7). Los datos presentados indican que $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54 expresando 3xFLAG mediante bacto-fección desde pCMV::3xFLAGm2A, inducen una respuesta inmunitaria específica frente a 3xFLAG sesgada, caracterizada por un predominio de la respuesta celular asociada a linfocitos Th1 en $\Delta phoP$ mientras que, es la respuesta inmunitaria de base humoral a nivel de las mucosas, la que predomina en $\Delta rpoS$ y SC-54.

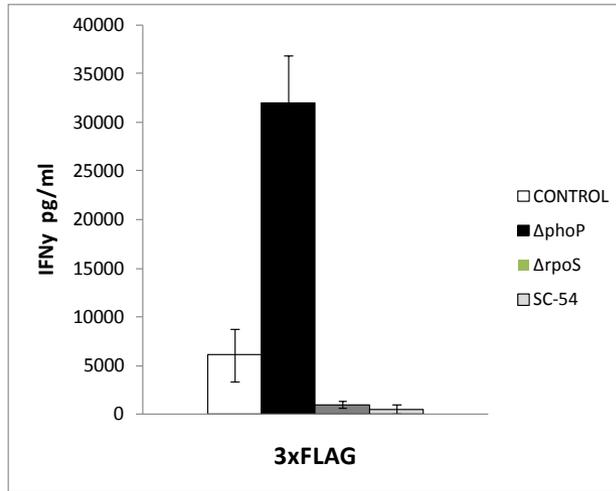


Figura. 7. Producción de γ -IFN tras re-estimular con 3xFLAG esplenocitos obtenidos a partir de ratonas inmunizadas. Se muestra la producción de γ -IFN a partir de sobrenadantes de esplenocitos (5×10^4 células/pocillo) procedentes de ratonas inmunizadas con PBS (control), *S. Choleraesuis* $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54 transportando el vector pCMV3xFLAGm2A tal y como se describe en la leyenda de la figura 5, tras ser re-estimulados con 3xFLAG (12,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 horas. Los niveles de γ -IFN se calcularon utilizando el kit para cuantificación de γ -IFN (pg/ml) de BD OptEIA™. Los datos representan la media \pm el error estándar de la media (SEM) de esplenocitos procedentes de cinco animales por grupo. Los esplenocitos se cultivaron en triplicado. La cuantificación de γ -IFN se realizó por duplicado mezclando los sobrenadantes de las muestras obtenidas por triplicado. Los datos corresponden con los resultados de un experimento representativo de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

En este capítulo se ha estudiado la capacidad de las dos cepas de *S. Choleraesuis* construidas en el primer capítulo, $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, comparándolas con la cepa atenuada comercial, SC-54, como vehículos para vacunas de ADN utilizando el péptido comercial 3xFLAG como epítipo modelo. Este concepto se ha denominado recientemente como bactofoección (Daudel et al., 2007). Se ha demostrado que 3xFLAG se expresa en macrófagos murinos vehiculado por $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, cualificándolas como vectores de elección preferente para constituir vehículos de bactofoección. Mediante ensayos de inmunización de ratonas por vía oral con $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54, se ha comprobado la inducción de una respuesta inmunitaria humoral IgG sistémica específica frente a 3xFLAG. Además, se ha logrado la inducción de una respuesta inmunitaria sesgada en la que predomina la respuesta humoral frente a 3xFLAG a nivel de las mucosas en $\Delta rpoS$ y SC-54 y una respuesta de base celular en $\Delta phoP$.

Las vacunas de ADN se pueden aplicar por diferentes vías de inmunización con el objetivo de favorecer una respuesta inmunitaria sistémica o a nivel de las mucosas. Uno de los mayores inconvenientes en esta estrategia de vacunación lo constituye la baja eficiencia de las vacunas de ADN, que es inherente a las diferentes vías de liberación, junto a la gran cantidad y pureza de ácido desoxirribonucleico que se necesita (Daudel et al., 2007; Dietrich et al., 2003b; Weiss, 2003). Por todo ello, es esencial desarrollar nuevos sistemas de transporte que incrementen de manera considerable la eficacia de transfección. La utilización de bacterias intracelulares como vehículos para vacunación genética, constituye una estrategia sencilla y atractiva que combina las propiedades intrínsecas proporcionadas por los dos sistemas. Sin duda, una consideración esencial al optimizar la eficacia de las vacunas de ADN radica en la correcta elección del plásmido de expresión eucariota. En este capítulo, se ha optado por elegir como el plásmido más adecuado para el transporte de ADN por *Salmonella* a pCMV β m2A, de acuerdo a los resultados previamente descritos (Bauer et al., 2005).

La inestabilidad de los plásmidos de expresión en un vector vacunal puede afectar la vacuna y alterar el éxito final de la vacunación (Coulson *et al.*, 1994; Du and Wang, 2005; Mollenkopf *et al.*, 2001). En este estudio, el plásmido construido, pCMV3xFLAGm2A, se mantiene en las cepas atenuadas de *S. Choleraesuis* aisladas en los nódulos mesentéricos, durante al menos 15 días después de la inoculación oral de ratones. La inoculación con las cepas atenuadas diseñadas $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, portadoras de pCMV3xFLAGm2A, no producen sintomatología en los ratones inmunizados, incluso a dosis superiores a las proporcionadas de la cepa comercial atenuada de *S. Choleraesuis*, SC-54. Estos datos no son sorprendentes y corroboran los resultados descritos en el capítulo anterior, en los que se observaba una mayor atenuación de las dos cepas construidas, $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, con respecto a SC-54. Estos datos en su conjunto indican que $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, más que SC-54, pueden ser usados como vehículos de bactofoeción seguros para inmunización oral de ratones.

La administración oral de $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$, y SC-54 portadores de pCMV3xFLAGm2A desencadena una respuesta humoral sérica específica frente a *Salmonella* significativamente superior al grupo control, siendo esta respuesta mayor en el grupo inmunizado con $\Delta rpoS$. Sorprendentemente, los niveles de anticuerpos IgG específicos frente a 3xFLAG descienden después del segundo recuerdo en todos los grupos. Además, la reducción de anticuerpos fue mayor en $\Delta rpoS$, en el que los títulos de IgG frente a *Salmonella* habían sido superiores. Los datos disponibles actualmente en la bibliografía son controvertidos, así, existen discrepancias entre autores en cuanto al impacto que tiene un contacto previo con *Salmonella*, y por tanto una preinmunización, en la respuesta inmunitaria frente al antígeno vehiculado por *Salmonella* como vector (Gahan *et al.*, 2008). Mientras algunos autores plantean una disminución de la respuesta inmunitaria específica frente al antígeno vehiculado debido a una exposición previa a *Salmonella* (Domenech *et al.*, 2005; Gahan *et al.*, 2008), otros autores describen la ausencia de influencia o incluso la potenciación de la respuesta inmunitaria tras la primo infección con *Salmonella* (Daudel *et al.*,

2007; Dietrich et al., 2003b; Weiss, 2003). Estas discrepancias podrían deberse a múltiples factores, como el tiempo entre desafíos, la invasividad de las cepas y su capacidad para colonizar el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal, o la naturaleza del antígeno liberado (Gahan et al., 2008). En cualquier caso, estos parámetros constituyen elementos de especial importancia para tener en cuenta en el desarrollo de futuros vectores en los que se emplee *Salmonella* como vehículo vacunal, y las nuevas estrategias a desarrollar necesitarán solucionar el impacto, en el caso de que exista, del contacto previo con la bacteria. En este sentido, en el capítulo siguiente se describirá un nuevo abordaje para solventar este inconveniente encontrado en el capítulo actual.

Se han medido elevados niveles de anticuerpos IgA intestinales específicos frente a 3xFLAG en los animales inmunizados con $\Delta rpoS$, estos datos contrastan con su ausencia en los animales inmunizados con $\Delta phoP$. Este comportamiento podría ser debido a una pobre colonización de los tejidos murinos por parte de $\Delta phoP$. Sin embargo, esta hipótesis parece poco probable ya que, tanto $\Delta phoP$ como $\Delta rpoS$, muestran una respuesta similar de IgA específicas frente a *Salmonella*, por lo que las diferencias de patogenicidad en el modelo murino entre ambas cepas parece una explicación más probable. Se sabe que es clave para un patógeno utilizado como vehículo vacunal, el lograr un equilibrio entre la pérdida de la capacidad para causar enfermedad y su habilidad para persistir e inducir una correcta respuesta inmunitaria. Este resultado concuerda con el alto nivel de atenuación descrito en el capítulo anterior cuando se comparaba $\Delta phoP$ con $\Delta rpoS$ y SC-54 (Dominguez-Bernal et al., 2008). Además, también en SC-54 se ha observado una menor respuesta humoral específica frente a 3xFLAG con respecto a $\Delta rpoS$, en este caso, podría ser un reflejo de los menores niveles de expresión de 3xFLAG mostrados por esta cepa vacunal comercial en macrófagos murinos.

La respuesta inmunitaria de base celular específica frente al antígeno vehiculado por $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ y SC-54 se evaluó midiendo la producción de IL-2, IL-4, IL-10 y γ -INF por esplenocitos obtenidos de los distintos grupo de ratones inoculados. Únicamente en los animales inoculados con $\Delta phoP$ se detectaron niveles significativos de

γ -INF específicos a una re-estimulación con 3xFLAG. En ninguno de los casos se obtuvieron valores detectables de IL-2, IL-4, IL-10. Una respuesta de tipo Th1 caracterizada por la producción de γ -INF y supresión de IL-2, IL-4 y IL-10 se ha descrito tras la inoculación de *Salmonella* (Mittrucker and Kaufmann, 2000; Tam *et al.*, 2008). Considerando que la producción de γ -IFN es un mecanismo fundamental de defensa frente a infecciones víricas (Kagi and Hengartner, 1996), la aplicación de Δ *phoP* como vehículo de bacto-fección para antígenos víricos puede constituir una interesante aplicación en futuros abordajes.

En su conjunto, estos resultados muestran que las dos cepas atenuadas previamente descritas en el capítulo 1 de esta tesis, pueden ser utilizadas como vehículos orales de vacunas de ADN (bacto-fección). La bacto-fección con Δ *phoP* y Δ *rpoS* usando pCMV3xFLAGm2A induce una respuesta inmunitaria potente específica del epítipo vehiculado, caracterizada por presentar un perfil humoral a nivel de la mucosa intestinal en Δ *rpoS* y una respuesta con perfil celular en Δ *phoP*. Con estos resultados, presentamos, además de SC-54, dos nuevas cepas atenuadas de *S. Choleraesuis* con un gran potencial para su aplicación en la industria porcina, en la que se persiguen sistemas de inmunización en masa orientados a minimizar los costes laborales y el estrés a los animales. Además, nos permite abrir una nueva vía de estudios en la que se puede desplazar el epítipo modelo por nuevos antígenos de enfermedades infecciosas con especial relevancia en la industria porcina.

Capítulo 3

**Aplicación de $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ de *S. Choleraesuis*
como vehículos de expresión antigénica heteróloga
restringida en el espacio y el tiempo**

El empleo de cepas vivas atenuadas de *Salmonella* como vehículos vacunales no está restringido a vacunas de ADN. Otro abordaje empleado en la actualidad, consiste en expresar antígenos heterólogos a partir de estos vehículos vacunales, constituyendo la base de vacunas multivalentes aplicadas en diferentes hospedadores mamíferos (Curtiss *et al.*, 1990; Chatfield *et al.*, 1994; Cheminay and Hensel, 2008; Garmory *et al.*, 2002; Hormaeche, 1991; Husseiny and Hensel, 2009; Loessner *et al.*, 2008; Spreng *et al.*, 2006). Estos vectores bacterianos mimetizan la infección natural, interaccionan con los diferentes compartimentos del sistema inmune y por ello, inducen una respuesta inmunitaria de calidad a nivel de las mucosas y a nivel sistémico. Pueden ser considerados como "factorías vacunales", en las que el vehículo bacteriano sintetizaría una proteína heteróloga con el fin de estimular una respuesta inmunitaria en el hospedador frente a los antígenos bacterianos y los antígenos heterólogos vehiculados (Curtiss, 2002). Al replicarse en el hospedador, estos vectores vacunales favorecerían una exposición prolongada al antígeno, incrementando la respuesta inmunitaria y además, incorporando moléculas, como el LPS, que con un marcado carácter inmunoestimulador actuarían a modo de adyuvantes naturales (Roland *et al.*, 2005).

Sería deseable que las cepas bacterianas atenuadas utilizadas como vehículos de antígenos heterólogos guardaran un equilibrio entre su virulencia y su inmunogenicidad. Las cepas vacunales construidas en el capítulo 1 de esta tesis, $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, han mostrado un elevado grado de atenuación en los modelos murino y porcino de infección experimental pero, al mismo tiempo, al utilizarlas como vehículos bacterianos para vacunas de ADN, observamos su efectividad para estimular una respuesta inmunitaria en ratones (véase capítulo 2 y (Bartolome *et al.*, 2010)) En este capítulo, vamos a estudiar su capacidad como potenciales vehículos para la expresión de antígenos heterólogos. El éxito de esta estrategia depende de una correcta expresión en el tiempo (promotor inducido *in vivo*) y en el espacio (inducción nicho-específica). La elección de un promotor adecuado tiene un peso fundamental en la posterior cantidad de antígeno producido y en la inmunogenicidad de la vacuna (Dunstan *et al.*, 1999; Hohmann *et al.*, 1995; McKelvie *et al.*, 2004)

En este capítulo proponemos utilizar las especiales condiciones de expresión espacio-temporal (en el interior de células eucariotas y esencialmente células dendríticas, macrófagos y fibroblastos) de los promotores dependientes del sistema PhoP/Q para vehicular el epítipo modelo utilizado en el capítulo anterior, 3xFLAG, como antígeno de expresión heteróloga en *Salmonella*.

RESULTADOS

4.3. Optimización de las cepas vivas atenuadas de *S. Choleraesuis* mediante la inserción de la secuencia antigénica en el cromosoma bacteriano fusionada a los promotores de los genes *ssaG* y *pagC*

Con el fin de incrementar la expresión de los antígenos heterólogos, restringirla al interior de las células eucariotas dianas, y dirigir en el espacio (inducción nicho-específica –células del sistema inmunológico-) y en el tiempo (inducibles exclusivamente *in vivo*), decidimos analizar la expresión de dos promotores P_{ssaG} y P_{pagC} mediante fusiones en fase a *ssaG* y *pagC* del epítipo 3xFLAG® que actuaría a modo de etiqueta para permitirnos valorar los niveles de expresión de los mencionados promotores. Para ello, se ha ido siguiendo exactamente el protocolo descrito por Uzzau *et al.* 2001 que consiste en una pequeña modificación del método descrito para generar los mutantes de delección descrito en el capítulo 1. Nuevamente, se eliminó mediante la enzima flipasa (FLP) toda resistencia al marcador antibiótico empleado. Estas fusiones con el epítipo comercial 3xFLAG se introdujeron en las cepas vacunales $\Delta rpoS$, $\Delta phoP$ y la cepa silvestre parental, WT como control, de tal manera que se han generado las cepas $\Delta rpoS pagC::3xFLAG$, $\Delta phoP pagC::3xFLAG$, $\Delta rpoS ssaG::3xFLAG$, $\Delta phoP ssaG::3xFLAG$, WT $pagC::3xFLAG$ y WT $ssaG::3xFLAG$. En la fig. 1 se muestran los productos amplificados que permiten comprobar la introducción del epítipo 3xFLAG en el lugar adecuado del cromosoma y la eliminación del marcador de resistencia antibiótica.

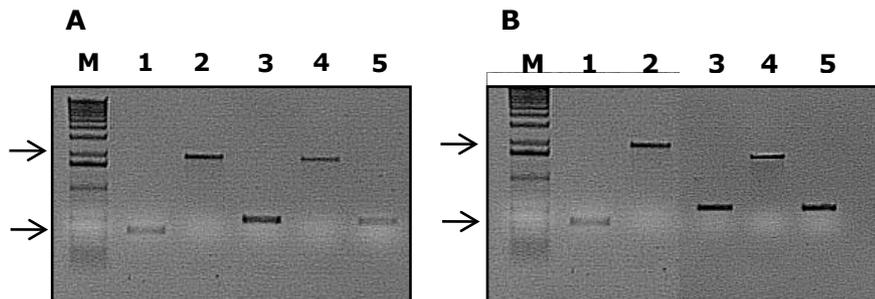


Figura 1. Comprobación mediante PCR del etiquetado obtenido por la incorporación de 3xFLAG en *pagC* (**Panel A**) o *ssaG* (**Panel B**). La reacción de PCR se realizó a partir de lisados de colonias obtenidos como se detalla en materiales y métodos y,

utilizando oligonucleótidos que flanquean la región de recombinación *ssaG* (*ssaG2D-2R*) (Panel A) o *pagC* (*pagC2D-2R*) (Panel B). (M) indica marcador de peso molecular, (1) la cepa silvestre de *S. Choleraeausis*, WT; En el Panel A, (2) Δ *phoP pagC::3xFLAG-km*; (3) Δ *phoP pagC::3xFLAG*; (4) Δ *rpoS pagC::3xFLAG-km* y (5) Δ *rpoS pagC::3xFLAG*. En el Panel B, (2) Δ *phoP ssaG::3xFLAG-km*; (3) Δ *phoP ssaG::3xFLAG*; (4) Δ *rpoS ssaG::3xFLAG-km* y (5) Δ *rpoS ssaG::3xFLAG-km*. El tamaño de los amplicones obtenidos está indicado con flechas. Se muestra la incorporación del cassette de kanamicina, de 1,6 kb aproximadamente (carriles 2 y 4), y su eliminación (carriles 3 y 5). Se comprueba que el tamaño en las cepas etiquetadas es ligeramente superior al presentado por la cepa silvestre, debido a la secuencia codificante de 3xFLAG (69 pb).

4.4. Optimización de *S. Choleraeausis* como vehículo vacunal mediante la búsqueda de promotores inducidos *in vivo*

Estudios previos realizados en el serovar Typhimurium habían descrito que los promotores *pagC* y *ssaG* presentaban una restricción para expresarse específicamente en el interior de las células eucariotas (McKelvie et al., 2004; Valdivia and Falkow, 1997). Con el fin de estudiar los niveles de expresión y su posible restricción a la presencia de *S. Choleraeausis* en el interior de las células eucariotas, decidimos analizar los niveles de producción del epítipo 3xFLAG bajo el control de ambos promotores. Para ello, se realizaron experimentos de infección en cultivos primarios de células dendríticas murinas obtenidas a partir de médula ósea, donde se han valorado los niveles de expresión de 3xFLAG obtenidos a partir de *pagC* o *ssaG* en los fondos genéticos silvestre, Δ *phoP* y Δ *rpoS*. Como se puede observar en la fig. 2, sólo fuimos capaces de detectar la producción de 3xFLAG a partir de *PpagC*, que se inducía en condiciones intracelulares cuando comparábamos con su expresión extracelular en medio rico (LB). La no detección de *PagC* en el fondo genético deficiente en *PhoP* en bacteria intracelular y la no detección de *SsaG* tanto extracelular como intracelularmente podría ser un problema de sensibilidad del método utilizado. Estos experimentos de infección se realizaron inicialmente en placas de cultivo con una superficie de 9,5 cm², lo que permite cargar en cada pocillo del gel un máximo de aproximadamente 10⁵ bacterias, después de hacer la extracción de proteínas a las 24 horas post-infección. En este momento, estamos optimizando el método de preparación de extractos de proteínas totales para incrementar los niveles de detección pero por el momento no hemos obtenido resultados satisfactorios.

En resumen, estos resultados demuestran que existe una fuerte expresión asociada al promotor *PpagC* en *S. Choleraesuis*, que se induce en el interior de células dendríticas y que en consonancia con una regulación dependiente de PhoP/PhoQ, es mayor en la cepa $\Delta rpoS$.

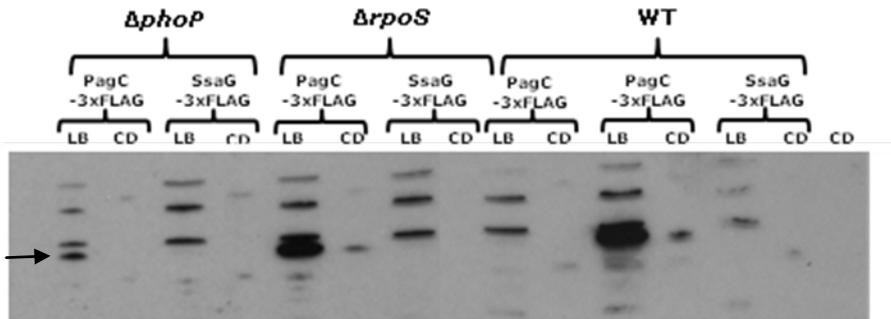


Figura 2. Niveles de las proteínas SsaG y PagC en *S. Choleraesuis* tras la infección de células dendríticas murinas. Se infectaron los cultivos celulares tal y como se describe en el apartado correspondiente de materiales y métodos con las estirpes: WT *pagC*::3xFLAG, WT *ssaG*::3xFLAG, $\Delta phoP$ *pagC*::3xFLAG, $\Delta phoP$ *ssaG*::3xFLAG, $\Delta rpoS$ *pagC*::3xFLAG y $\Delta rpoS$ *ssaG*::3xFLAG. Tras 24 horas post-infección se realizó una extracción de proteínas totales de las células infectadas. Todos los carriles contienen cantidades de volumen iguales (correspondientes a $1,5 \times 10^5$ ufc bacteria). Además, se prepararon extractos de proteínas totales de bacteria crecida durante 18 horas en agitación constante en medio de cultivo de LB (correspondiendo a 4×10^7 ufc bacteria por pocillo). Las proteínas SsaG-3xFLAG y PagC-3xFLAG se detectaron utilizando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2. Como controles se utilizaron la proteína de membrana externa de *Salmonella* OmpA y el anticuerpo monoclonal anti- β tubulina.

4.5. Evaluación de la respuesta inmunogénica de le pítopo heterólogo 3xFLAG vehiculado por $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ a partir de P_{ssaG} o P_{pagC}

Una vez estudiados los niveles de expresión en cultivos celulares murinos del epítipo heterólogo 3xFLAG vehiculado a partir del promotor de *pagC* en las dos cepas vacunales $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, y aún no disponiendo de datos para poder comprobar la expresión a partir de *ssaG*, decidimos analizar la eficacia e inmunogenicidad específica frente al epítipo modelo heterólogo, en el modelo murino. Para ello, se inocularon vía oral lotes de seis animales (hembras BALB/c entre 6 y 8 semanas de edad) con dosis de $0,5-1 \times 10^{11}$ UFC en el caso de $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ y PBS en el caso de los grupos controles. En todos los grupos (salvo el control inmunizado con PBS) se realizaron dos

reinmunizaciones con intervalos de dos semanas entre cada una. La seguridad de las vacunas se evaluó monitorizando el estado clínico de los ratones durante 6 semanas, no encontrándose sintomatología reseñable. Las muestras de sangre para serología se obtuvieron el día de la vacunación (previamente a la misma), a los 21, 35 y 45 (fecha de sacrificio) días postinoculación (p.i.). La respuesta sistémica humoral en suero (IgG) y en la mucosa intestinal (IgA) frente a *Salmonella* y frente al antígeno heterólogo vehiculado (3xFLAG) se evaluó mediante ELISA indirecto. Como se puede observar en la fig. 3A, a lo largo del experimento se obtuvieron niveles elevados de IgG séricos específicos frente a *Salmonella* en todos los grupos de ratonas inmunizadas con las cepas $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ cuya diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.0001$ en el día 45 p.i.) con respecto al grupo control inmunizado con PBS. Además, existe un efecto recuerdo en todos los grupos, observándose un incremento con respecto a los valores anteriores al recuerdo de los niveles de IgG después de cada reinmunización. Estos resultados indican que los antígenos bacterianos han sido correctamente capturados, procesados y presentados por las células presentadoras de antígeno. Cuando se analizaron los niveles de IgG específicos frente al epítipo 3xFLAG a lo largo del experimento, se observaron niveles elevados en los grupos de ratonas inmunizadas con las cepas $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$, con valores estadísticamente significativos con respecto al grupo control (véase fig. 3B). Es interesante destacar que, a diferencia de lo observado en el capítulo 2 cuando se realizaba bactoefección de 3xFLAG, los niveles de IgG específicos frente a 3xFLAG no disminuyeron después de la segunda inmunización, sino que se incrementaron, obteniéndose los mayores valores en el día del sacrificio, no observándose un efecto de inmunosupresión debido al contacto previo con *Salmonella*. Además, en las ratonas inmunizadas con las construcciones en $\Delta rpoS$ vehiculadas mediante el promotor de *ssaG* y $\Delta phoP$ vehiculada mediante *pagC* se registraron los niveles más elevados de IgG específicos frente a 3xFLAG. Curiosamente, en contra de lo que cabría esperar, estos datos coinciden con aquellas construcciones en las que se obtuvo una menor producción de 3xFLAG (véase fig.1). Estos resultados indican que en contra de lo que nos planteamos en el inicio del estudio, se obtiene una mayor respuesta inmunitaria humoral en aquellas cepas que transportan cassettes de antígenos

heterólogos controlados por promotores que inducen débiles niveles de expresión *in vivo*.

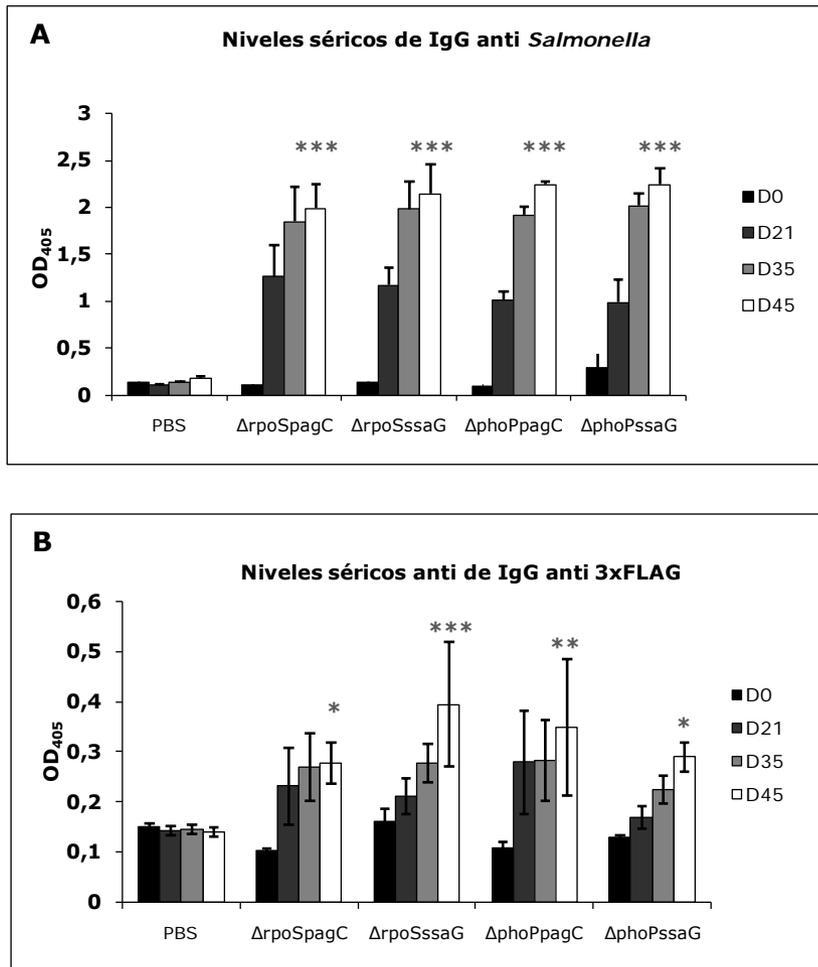


Figura 3. Respuesta serológica de ratonas BALB/c inmunizadas con *S. Choleraesuis*. Se representa la producción de IgG séricas específicas frente a *Salmonella* (A) y frente a 3xFLAG (B) a partir de sueros obtenidos de animales inmunizados con *S. Choleraesuis* $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ transportando en cromosoma el epítipo comercial 3xFLAG, vehiculado por los promotores *pagC* o *ssaG*. Grupos de 5-6 ratonas fueron inoculadas vía oral los días 0, 21 y 35 con una dosis de $0,5-1 \times 10^{11}$ UFC en el caso de cada uno de los mutantes y PBS en el grupo control. Los sueros se recogieron en el día 0 previo a la inoculación, en el día 21 antes de la segunda dosis, en el día 35 antes de la tercera dosis y en el día 45 (sacrificio) y se determinaron los niveles de IgG mediante ELISA indirecto. El suero fue diluido en PBS 1:100 para determinar los niveles anti-*Salmonella* y 1:5 para anti-3xFLAG. Los valores de absorbancia son las medias de datos individuales de cada ratón de todos los grupos \pm el error estándar de la media (S.E.M) de un experimento representativo realizado por duplicado. El análisis estadístico se realizó usando el test de Student; * $P < 0.05$ se considera significativo; ** $P < 0.01$, muy significativo; *** $P < 0.001$, extremadamente significativo.

A pesar de que se han obtenido niveles elevados y estadísticamente significativos de IgA específicos frente a *Salmonella* a partir del fluido intestinal, en los cuatro grupos de animales inmunizados con respecto al grupo control (véase fig. 4), no se pudieron detectar niveles de IgA específicos frente a 3xFLAG estadísticamente significativos con respecto al grupo control.

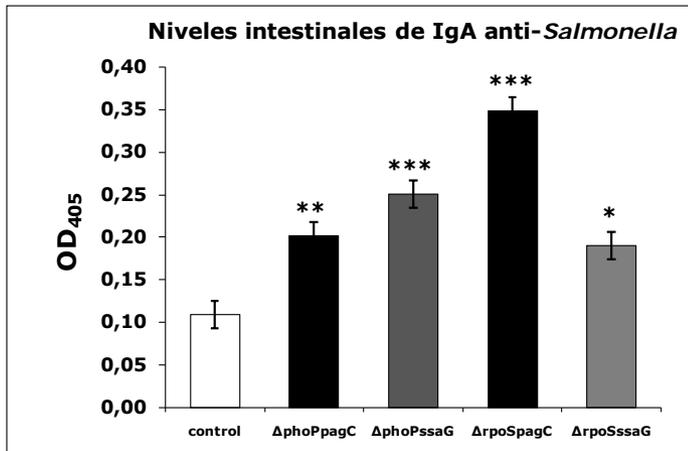


Figura 4. Respuesta humoral a nivel de la mucosa intestinal de ratonas BALB/c inmunizadas con *S. Choleraesuis*. Se representa la producción de IgA intestinales específicas frente a *Salmonella* a partir de lavados intestinales recogidos de animales inmunizados con *S. Choleraesuis* $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ que incluyen en su cromosoma el epítipo 3xFLAG bajo el control de los promotores de inducción *in vivo* P_{pagC} y P_{ssaG} . Las inmunizaciones se realizaron como se describe en el apartado de material y métodos, los días 0, 21 y 35, determinándose los niveles de IgA mediante un ELISA indirecto a partir de diluciones 1:5 en PBS de los lavados intestinales obtenidos inmediatamente después del sacrificio realizado el día 45 tras el inicio del experimento. Los valores de absorbancia son la media de los datos de los ratones de cada grupo \pm el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó usando el test de Student; * $P < 0.05$ se considera significativo; ** $P < 0.01$, muy significativo; *** $P < 0.001$, extremadamente significativo.

Una vez comprobada la eficacia de la respuesta inmunitaria humoral a nivel sistémico y la falta de respuesta específica frente a 3xFLAG a nivel de la mucosa intestinal, decidimos valorar la respuesta inmunitaria mediada por células. Para ello, se estudió la producción de IL-4, IL-10 y γ -IFN en sobrenadantes de esplenocitos en respuesta a la re-estimulación con la proteína 3xFLAG, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos. Los esplenocitos se obtuvieron a partir de los bazo de los distintos grupos de

animales inmunizados y el control, sacrificados a los 45 días p.i. Los experimentos de estimulación se realizaron por triplicado para cada animal, y posteriormente, se mezclaron los sobrenadantes de cada grupo de inmunización para cuantificar las diferentes citoquinas (por duplicado) de acuerdo a las instrucciones de los kits de BD OptEIA™ específicos para cada citoquina (véase apartado correspondiente de materiales y métodos). En general, los niveles que se detectaron de citoquinas fueron muy bajos en todos los grupos. Sin embargo, se obtuvieron valores, superiores en 210,68 pg/ml de γ -IFN a los producidos por los esplenocitos no estimulados, exclusivamente en el grupo de animales inmunizados con $\Delta rpoS$ *pagC::3xFLAG*. Esta estimulación es compatible con una respuesta inmunitaria de tipo Th1, que se correspondería con un menor componente humoral, tal y como se mostraba en la fig. 3. Por otro lado, se ha comprobado un incremento en la producción de IL-10 con respecto a los esplenocitos no estimulados de 49,17 pg/ml en el grupo inmunizado con $\Delta phoP$ *pagC::3xFLAG* que coincide con una mayor intensidad en los niveles de respuesta humoral sistémica (véase fig.3). Estos datos parecen indicar que existe una clara dependencia entre el fondo genético de la cepa vacunal utilizada, $\Delta phoP$ o $\Delta rpoS$, y el promotor empleado para vehicular el antígeno heterólogo, P_{ssaG} o P_{pagC} . De tal manera que, si bien en todos los casos se induce una respuesta inmunitaria humoral sistémica específica frente a 3xFLAG, ésta presenta un perfil claramente sesgado, predominando la respuesta celular asociada a linfocitos Th1 en $\Delta rpoS$ y una respuesta asociada a linfocitos Th2 en $\Delta phoP$. En ambos casos, el promotor que favorece una mayor eficiencia en la inducción de respuesta inmunitaria específica frente al antígeno heterólogo es el mismo, P_{pagC} , que como hemos comprobado en el apartado 2 de este capítulo, no se induce con la misma intensidad en $\Delta phoP$ o $\Delta rpoS$. Con estos resultados en su conjunto, podemos afirmar que para obtener una mejor y más completa respuesta inmunitaria, no sólo se requiere seleccionar un vehículo vacunal apropiado, ni unos mayores niveles de expresión del antígeno heterólogo, sino una correcta conjunción de ambos parámetros.

DISCUSIÓN

En este capítulo se ha utilizado una nueva estrategia para la generación de vehículos vacunales basándonos en la capacidad de las dos cepas atenuadas de *S. Choleraesuis* construidas en el capítulo primero, $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$, para expresar un antígeno heterólogo modelo (3xFLAG) bajo el control de los promotores de los genes *pagC* (P_{pagC}) y *ssaG* (P_{ssaG}), con el fin de restringir e incrementar su expresión en el interior de las células eucariotas dianas, aprovechando la capacidad de estos promotores para responder y activarse con las señales detectadas en el interior de las células (Cirillo et al., 1998; Knodler et al., 2002). Mediante ensayos de inmunización de ratonas por vía oral con $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ se ha comprobado la inducción de una respuesta inmunitaria humoral IgG sistémica específica frente a 3xFLAG, vehiculado a partir de cualquier promotor en los dos fondos genéticos. Además, se ha logrado la inducción de una respuesta inmunitaria sesgada en la que predomina la respuesta Th1 frente a 3xFLAG en $\Delta rpoS$ y una respuesta Th2 en $\Delta phoP$ en ambos casos, utilizando el promotor de *pagC* como inductor de la expresión de 3xFLAG.

El sistema empleado para la construcción de los nuevos sistemas vacunales se basa en la tecnología de recombinación cromosómica en un único paso desarrollada inicialmente por Datsenko y Wanner (Datsenko and Wanner, 2000) y posteriormente modificada por Uzzau y col. (Uzzau et al., 2001) para introducir etiquetas en los genes dianas elegidos del cromosoma. De esta forma, se obtienen cepas con las mismas ventajas que $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$ (descritas en el primer capítulo), como son la ausencia de marcadores de resistencias antibióticas y la estabilidad genética. De este modo, *Salmonella* se utiliza como "factoría vacunal", de tal manera que la bacteria produce proteínas heterólogas (Curtiss, 2002), y al replicarse en el hospedador, permite una exposición al antígeno heterólogo de forma sostenida en el tiempo, aumentando el tipo y nivel de respuesta inmunitaria desencadenada. Además, los vectores bacterianos poseen moléculas inmunoestimuladoras como el LPS y los flagelos que actúan a modo de adyuvantes naturales. Esta

estrategia se ha utilizado con gran éxito en estudios previos (Chinchilla et al., 2007; Garmory et al., 2003b; Hall et al., 2009; Husseiny and Hensel, 2009; Luo et al., 2007).

La integración en el cromosoma de antígenos heterólogos proporciona una interesante plataforma para la generación de vacunas recombinantes frente a diferentes agentes patógenos. Sin embargo, frente a la mayor estabilidad de la expresión con respecto a otros sistemas extracromosómicos, como plásmidos, podríamos encontrarnos con la limitación de obtener una disminución en la producción del antígeno cromosómico que se encuentra en monocopia con respecto a los niveles obtenidos cuando se expresa a partir de sistemas en multicopia, como son los plásmidos ((Covone et al., 1998; Fouts et al., 1995; Ryan et al., 2000). En un principio, se describió la utilización de promotores de expresión constitutiva, bajo el lema de "más es mejor", la síntesis constante del antígeno desencadenó problemas metabólicos en el vector bacteriano, lo que resultó en una disminución de la viabilidad del vector bacteriano, hiperatenuación y por consiguiente, menor inmunogenicidad (Curtiss, 2002). Posteriormente, se escogieron promotores de inducción *in vivo*, que permiten dirigir la expresión antigénica espacio-temporalmente, consiguiendo un nivel de expresión antigénica que se produciría en el momento adecuado y en el nicho adecuado, dirigiendo la respuesta inmunitaria de forma específica e interfiriendo mínimamente con el metabolismo del vector bacteriano (Bumann, 2001).

Inicialmente, consideramos la utilización de promotores que se indujeran *in vivo* con altos niveles de expresión, y por tanto, que pudieran estimular una elevada producción de antígenos heterólogos, como la mejor elección para obtener una respuesta inmunitaria más eficaz y que hiciera predecir una protección más satisfactoria en posteriores experimentos de vacunación. Para ello, elegimos dos promotores previamente descritos en *S. Typhimurium*, por un lado, el promotor P_{pagC} , que controla la expresión de *pagC* y codifica una proteína de 188 aminoácidos que forma parte del regulón PhoP/PhoP y cuya expresión en *S. Typhimurium* se encuentra incrementada 77 veces en el interior de macrófagos murinos. P_{pagC} se ha estudiado ampliamente como herramienta que

se induce *in vivo* para el transporte de antígenos heterólogos en *S. Typhimurium*, incrementando la inmunogenicidad en el modelo murino en comparación con promotores que presentan un patrón de expresión constitutivo (Hohmann et al., 1995). Aunque en el serovar *Choleraesuis* no se disponen de estudios previos sobre el control del regulador PhoP/PhoQ en el P_{pagC} , teniendo en cuenta que íbamos a emplear un fondo genético deficiente en el regulador PhoP, $\Delta phoP$, consideramos conveniente valorar, por otro lado, el promotor de *ssaG* (P_{ssaG}), que forma parte de un SST3 en *Salmonella* y *Yersinia spp*, perteneciente al regulón SsrA-SsrB en *Salmonella* y que presenta moderados niveles de expresión *in vivo* además de que se ha utilizado con éxito en la liberación de antígenos heterólogos a partir de estos géneros bacterianos (Evans et al., 2003; Gundel et al., 2003; Russmann et al., 1998). De esta forma, hemos podido comparar la eficacia para la expresión de 3xFLAG de los dos promotores en diferentes fondos genéticos, $\Delta phoP$ y $\Delta rpoS$.

El promotor de *ssaG* (P_{ssaG}) induce una pobre expresión de los genes sometidos a su control, al menos, en condiciones de laboratorio en las que no se utilizan condiciones de inducción (McKelvie et al., 2004). De hecho, desafortunadamente, no hemos obtenido niveles detectables de 3xFLAG vehiculados a partir de P_{ssaG} en ningún fondo genético. Sin embargo, hemos comprobado elevados niveles de expresión vehiculados por P_{pagC} en un fondo $\Delta rpoS$, que alcanza valores superiores con respecto a la cantidad de bacteria en localizaciones intracelulares. Además, en un fondo $\Delta phoP$, los niveles vehiculados por P_{pagC} descendieron drásticamente, pero manteniendo niveles detectables de 3xFLAG, estos datos confirman el control parcial ejercido por el regulón PhoP/PhoQ en *S. Choleraesuis*.

A pesar de estos resultados, y teniendo en cuenta que a menudo los sistemas *in vitro* fallan a la hora de predecir la respuesta *in vivo* cuando se utilizan vectores bacterianos atenuados, ya que no reproducen los complejos mecanismos de interacción de la bacteria con el hospedador (Xu et al., 2010), se llevaron a cabo experimentos de inmunización mediante la administración por vía oral de las cepas construidas, $\Delta phoP pagC::3XFLAG$, $\Delta phoP$

ssaG::3XFLAG, $\Delta rpoS$ *pagC::3XFLAG* y $\Delta rpoS$ *ssaG::3XFLAG*, que no produjeron sintomatología en los ratones inmunizados, en consonancia con los resultados descritos en los dos capítulos anteriores de esta tesis, corroborando el mantenimiento de los altos niveles de bioseguridad de las cepas bacterianas obtenidas.

En todos los lotes de animales inmunizados, exceptuando el control inoculado con PBS, fue estimulada una respuesta humoral sérica específica frente a *Salmonella* y al antígeno vehiculado, 3XFLAG, significativamente superior a la estimulada en el grupo control. Sorprendentemente, aunque no pudimos detectar producción de 3xFLAG a partir de P_{ssaG} , se produjo una respuesta inmunitaria humoral específica frente a 3xFLAG vehiculado por este promotor en los dos fondos genéticos analizados. Los niveles de IgG séricos específicos frente a 3xFLAG no descienden tras la segunda inmunización, sino que reflejan el efecto recuerdo, incrementando de forma estadísticamente significativa sus niveles después de cada *boost* o nueva dosis de recuerdo. Estos datos difieren de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, en los que cuando se vehiculaba 3xFLAG mediante bactofoeción, los niveles de IgG frente a 3xFLAG disminuían tras el recuerdo. Con estos datos, corroboramos las hipótesis de los autores que describen la ausencia o incluso la potenciación de la respuesta inmunitaria tras la primo infección con *Salmonella* (Daudel et al., 2007; Dietrich et al., 2003b; Weiss, 2003) y apoyan la utilización de *Salmonella* como vehículos de antígenos heterólogos independientemente de la existencia de un contacto previo.

Es interesante destacar que los niveles de IgG sistémicos específicos frente a 3xFLAG mostraron valores superiores aunque no estadísticamente significativos en los lotes de animales inoculados con $\Delta rpoS$ *ssaG::3XFLAG* y $\Delta phoP$ *pagC::3XFLAG*, presentando una respuesta frente a *Salmonella* similar en todos los casos. Estos datos se corresponden con niveles de expresión *in vitro* del antígeno vehiculado menores que en el resto de los lotes de ratones. En contra de lo que anticipábamos, observamos que las mayores respuestas inmunitarias humorales no estaban directamente relacionadas con los niveles de expresión de los promotores elegidos.

La respuesta inmunitaria de base celular específica frente a 3xFLAG se evaluó midiendo la producción de IL-2, IL-4, IL-10, y γ -INF por esplenocitos obtenidos de los distintos grupos de ratonas inoculadas y, posteriormente estimulados con 3xFLAG. Únicamente en los animales inoculados con $\Delta rpoS$ *pagC*::3XFLAG se detectaron niveles significativos de γ -INF, en consonancia con una respuesta con un perfil de tipo Th1, asociada con un menor nivel de IgG sistémico específico frente a 3xFLAG. Sólo en $\Delta phoP$ *pagC*::3XFLAG se detectaron niveles significativos de IL-10 compatibles con un perfil de respuesta inmunitaria de tipo Th2. En ambos casos, *P_{pagC}* ha sido el promotor implicado en la expresión de 3xFLAG. Parece ser que independientemente del fondo genético en el que se encuentre el antígeno heterólogo, los diferentes niveles de expresión podrían determinar el sesgo de la respuesta inmunitaria específica frente al mismo, de tal manera que ante valores bajos (en fondo $\Delta phoP$ en el que no hay regulación positiva por PhoP/PhoQ) predominaría una respuesta tipo Th2, mientras que con incrementos en los niveles de expresión la respuesta tendría un perfil Th1. Recientemente se ha descrito que promotores con altos niveles de expresión que se traducen en elevados niveles de producción de antígenos heterólogos, inducen valores elevados de estimulación de linfocitos T *in vitro*, pero en experimentos de vacunación en modelos animales, los resultados de inducción de la respuesta inmunitaria protectora es claramente inferior con respecto a la que se produce en el caso de antígenos controlados por promotores de baja expresión, probablemente por una sobreatenuación debido al gasto energético generado en la cepa portadora por la sobreexpresión antigénica (Xu et al., 2010). Teniendo en cuenta estos datos, parece imprescindible que en el diseño de un vector vacunal adecuado, la elección del promotor inducible *in vivo* y sus niveles de expresión son factores determinantes del tipo e intensidad de respuesta inmunitaria que se va a inducir, de tal manera que, elevados niveles de expresión no siempre van a traducirse en respuestas inmunitarias más eficaces. Una correcta conjunción entre el fondo genético y niveles de expresión adecuados de los promotores elegidos serán los responsables de no sobreatenuar el vehículo desarrollado y contribuir a su optimización.

Se han encontrado elevados niveles de anticuerpos IgA intestinales específicos frente a *Salmonella* en todos los grupos de animales inmunizados, excepto en el grupo control. Lamentablemente, aunque los niveles de IgA específicos frente a 3xFLAG han sido ligeramente superiores a los que presenta el grupo control, las diferencias no son estadísticamente significativas. La presencia de IgA frente a *Salmonella*, indica una adecuada invasión intestinal y posiblemente una presentación antigénica óptima a nivel de las placas de Peyer, por lo que, la falta de respuesta específica frente a 3xFLAG podría estar relacionada con el elevado nivel de atenuación de las cepas empleadas, junto con unos niveles de expresión del antígeno vehiculado no demasiado elevados. Desgraciadamente, no hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio en el que se valore la respuesta de IgA específica frente a antígenos vehiculados a partir de inserciones cromosómicas en monocopia. Teniendo en cuenta la importancia de obtener una respuesta inmunitaria eficaz a nivel de las mucosas, como un requisito fundamental en la obtención de formulaciones vacunales basadas en *Salmonella* que sean eficaces (Goni *et al.*, 2008), es preciso mejorar la estrategia de vacunación descrita en este estudio. Para ello, estamos llevando a cabo experimentos en los que se modifica la localización y configuración espacial del antígeno heterólogo, utilizando una familia de autotransportadores de las bacterias Gram negativas que permitirían exportar el antígeno a la superficie bacteriana, aumentando su inmunogenicidad (Kramer *et al.*, 2003; Spreng *et al.*, 2003). Se han publicado trabajos en los que se emplea el dominio autotransportador C-terminal de AIDA-I (adhesina de *E. coli* implicada en la adhesión difusa) para presentar en la superficie de una cepa vacunal de *Salmonella*, fragmentos antigénicos de la ureasa A de *Helicobacter pylori*, e inducir eficazmente inmunidad protectora en un modelo murino de infección experimental con *Helicobacter* (Rizos *et al.*, 2003). Esta estrategia para expresar en la superficie, y con la conformación adecuada, diferentes antígenos se conoce como *autodisplay* (Kjaergaard *et al.*, 2002).

En su conjunto, los resultados presentados muestran que la correcta elección de los promotores de expresión *in vivo* integrados en un fondo genético determinado, constituyen parámetros críticos en el óptimo diseño de las estrategias de vacunación basadas en

Salmonella. Hemos descrito que parece existir una compleja interconexión entre los distintos niveles de expresión *in vivo* y el resultado final en el sesgo e intensidad de la respuesta inmunitaria. Aunque la estrategia de vacunación descrita en este capítulo presenta algunas ventajas con respecto a la bacto-fección descrita en el capítulo anterior (como son la ausencia de marcadores antibióticos, la estabilidad antigénica y el control temporal y restricción *in vivo* de la expresión heteróloga), el fracaso en la inducción de una correcta respuesta inmunitaria a nivel de las mucosas hace imprescindible seguir optimizando este sistema de vacunación en monocopia a partir del cromosoma bacteriano. Nuevas mejoras consistirían en lograr una correcta expresión no sólo en el tiempo (promotor inducido *in vivo*), sino también en el espacio (inducción nicho-específica), así como mejorar la topología de la expresión de los antígenos heterólogos (Hohmann et al., 1995). Actualmente nos encontramos perfeccionando las cepas construidas en este trabajo para que sean capaces de expresar esencialmente en el interior de las células eucariotas, en la superficie de *Salmonella* y con una conformación adecuada, diferentes antígenos de importantes enfermedades infecciosas en sanidad animal.

PRIMERA. Se han construido dos cepas nulas en los reguladores *phoP/Q* ($\Delta phoP/Q$) y *rpoS* ($\Delta rpoS$) con unas características que las cualifican para ser consideradas como excelentes candidatos para desarrollar vehículos vacunales. Los métodos empleados para la construcción de las cepas atenuadas de *S. Choleraesuis* cumplen con los requerimientos indispensables de seguridad biológica de las vacunas de nueva generación modificadas genéticamente ya que, por una parte, se asegura la estabilidad de las mutaciones, puesto que la reversión al fenotipo silvestre está totalmente impedida debido a la ausencia de dianas requeridas para la recombinación homóloga o ilegítima a partir de poblaciones naturales de bacterias y, por otra, las cepas vacunales construidas carecen de marcadores de resistencia a antibióticos.

SEGUNDA. Los mutantes de *S. Choleraesuis* nulos $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$ muestran una gran atenuación de su virulencia que es incluso mayor que la atenuación de la virulencia de la cepa viva atenuada utilizada como vacuna comercial, SC-54.

TERCERA. La construcción de los mutantes $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$ nos ha permitido desarrollar un nuevo concepto de atenuación de la virulencia de *Salmonella*. Así, empleando cultivos celulares primarios de cerdo (obtenidos por primera vez en nuestro laboratorio), normalmente no permisivos para el crecimiento de *S. Choleraesuis* (fibroblastos de la lámina propia intestinal), las cepas construidas presentan un fenotipo de proliferación elevado en células viables, a diferencia de lo que ocurre con la cepa silvestre e incluso con SC-54. Además, persisten en cultivos de macrófagos primarios obtenidos de la lámina propia de la mucosa intestinal, a diferencia de lo que ocurre con la cepa viva atenuada comercial que es eliminada, lo que aseguraría una mayor estimulación de la respuesta inmunitaria. Estos hechos nos llevan a considerar a las cepas $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$ como excelentes candidatos para desarrollar vehículos vacunales altamente adaptados al cerdo como hospedador.

CUARTA.- El nuevo vector de expresión eucariota construido, pCMV::3xFLAGm2a, cuando se introduce en el interior de las cepas $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$, es estable tanto *in vitro* como *in vivo* sin la presencia de marcadores de selección.

QUINTA.- La utilización de los mutantes $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$ para vehicular vacunas de ADN (estrategia conocida con el término de bacto-fección) empleando el plásmido pCMV::3xFLAGm2a, proporciona buenos niveles de expresión del antígeno codificado. Esto se traduce en la estimulación de una respuesta inmunitaria específica frente al antígeno vehiculado, tanto sistémica como a nivel de la mucosa digestiva. Esta respuesta presenta un sesgo hacia un perfil de tipo humoral a nivel de las mucosas en la bacto-fección mediada por un fondo genético $\Delta rpoS$ y una respuesta celular asociada a linfocitos Th1 en $\Delta phoP/Q$.

SEXTA.- Mediante el empleo de los mutantes $\Delta phoP/Q$ y $\Delta rpoS$ como vectores de expresión heteróloga del antígeno modelo 3XFLAG se induce una respuesta inmunitaria humoral específica frente a 3xFLAG, de mayor intensidad después del primer contacto frente a *Salmonella*, por lo que la respuesta inmunitaria conseguida es independiente a la primoinfección con *Salmonella*, característica que hace más atractivo el uso de *S. Choleraesuis* como vehículo de vacunación.

SÉPTIMA.- La conjunción de un promotor de expresión intracelular adecuado junto a un determinado fondo genético incrementa la respuesta inmunitaria y el sesgo del tipo de respuesta que se pretende inducir. Además, una mayor expresión del antígeno heterólogo no se corresponde con la inducción de una mayor respuesta inmunitaria. Por lo que, en un diseño racional de nuevos vehículos vacunales, hay que efectuar una evaluación detallada de la interacción entre parámetros tan diferentes como la estrategia de vacunación, los niveles de expresión y su restricción espacio-temporal, el fondo genético de las cepas atenuadas y la localización antigénica en el vector bacteriano para conseguir el tipo de respuesta inmunitaria deseada.

6 BIBLIOGRAFÍ

- Abrahams, G.L., Hensel, M., 2006, Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cell Microbiol* 8, 728-737.
- Adegboyega, P.A., Mifflin, R.C., DiMari, J.F., Saada, J.I., Powell, D.W., 2002, Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps. *Arch Pathol Lab Med* 126, 829-836.
- Alaniz, R.C., Cummings, L.A., Bergman, M.A., Rassoulian-Barrett, S.L., Cookson, B.T., 2006, *Salmonella typhimurium* coordinately regulates FliC location and reduces dendritic cell activation and antigen presentation to CD4+ T cells. *J Immunol* 177, 3983-3993.
- Alpuche-Aranda, C.M., Berthiaume, E.P., Mock, B., Swanson, J.A., Miller, S.I., 1995, Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect Immun* 63, 4456-4462.
- Alpuche Aranda, C.M., Swanson, J.A., Loomis, W.P., Miller, S.I., 1992, *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10079-10083.
- Altekruse, S.F., Cohen, M.L., Swerdlow, D.L., 1997, Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 3, 285-293.
- Amer, A.O., Swanson, M.S., 2002, A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol* 5, 56-61.
- Arai, T., Hiromatsu, K., Nishimura, H., Kimura, Y., Kobayashi, N., Ishida, H., Nimura, Y., Yoshikai, Y., 1995, Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 600-607.
- Arrach, N., Porwollik, S., Cheng, P., Cho, A., Long, F., Choi, S.H., McClelland, M., 2008, *Salmonella* serovar identification using PCR-based detection of gene presence and absence. *Journal of clinical microbiology* 46, 2581-2589.
- Attridge, S.R., Davies, R., LaBrooy, J.T., 1997, Oral delivery of foreign antigens by attenuated *Salmonella*: consequences of prior exposure to the vector strain. *Vaccine* 15, 155-162.
- Attridge, S.R., Vindurampulle, C.J., 2005, Vector-primed mice display hyporesponsiveness to foreign antigen presented by recombinant *Salmonella* regardless of the route of delivery. *Microb Pathog* 39, 1-7.
- Ausubel, F.M., 1992, Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology, 2nd Edition. Greene Pub. Associates ; Wiley-Interscience, [Brooklyn, N.Y.] New York, 1 v. (various pagings) p.
- Bacon, G.A., Burrows, T.W., Yates, M., 1950, The effects of biochemical mutation on the virulence on *Bacterium typhosum*: the induction and isolation of mutants. *Br J Exp Pathol* 31, 703-713.
- Bacon, G.A., Burrows, T.W., Yates, M., 1951, The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*; the loss of virulence of certain mutants. *Br J Exp Pathol* 32, 85-96.

- Bader, M.W., Sanowar, S., Daley, M.E., Schneider, A.R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R.E., Le Moual, H., Miller, S.I., 2005, Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 122, 461-472.
- Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., Lee, C.A., 1996, Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Molecular microbiology* 22, 703-714.
- Bakowski, M.A., Braun, V., Brumell, J.H., 2008, *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* 9, 2022-2031.
- Bar-Meir, M., Raveh, D., Yinnon, A.M., Benenson, S., Rudensky, B., Schlesinger, Y., 2005, Non-Typhi *Salmonella* gastroenteritis in children presenting to the emergency department: characteristics of patients with associated bacteraemia. *Clin Microbiol Infect* 11, 651-655.
- Bartolome, A., Herrero-Gil, A., Horcajo, P., Orden, J.A., de Fuente, R., Dominguez-Bernal, G., 2010, *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* derivatives harbouring deletions in *rpoS* and *phoP* regulatory genes as vehicles for DNA vaccines. *Vet Microbiol* 141, 81-88.
- Bauer, H., Darji, A., Chakraborty, T., Weiss, S., 2005, *Salmonella*-mediated oral DNA vaccination using stabilized eukaryotic expression plasmids. *Gene Ther* 12, 364-372.
- Baumler, A.J., Gilde, A.J., Tsolis, R.M., van der Velden, A.W., Ahmer, B.M., Heffron, F., 1997, Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *Journal of bacteriology* 179, 317-322.
- Baumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F., 1996, The *Ipf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 279-283.
- Bearson, B.L., Wilson, L., Foster, J.W., 1998, A low pH-inducible, *PhoPQ*-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *Journal of bacteriology* 180, 2409-2417.
- Behlau, I., Miller, S.I., 1993, A *PhoP*-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. *Journal of bacteriology* 175, 4475-4484.
- Beuzon, C.R., Holden, D.W., 2001, Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes Infect* 3, 1345-1352.
- Bijlsma, J.J., Groisman, E.A., 2005, The *PhoP/PhoQ* system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology* 57, 85-96.
- Blanc-Potard, A.B., Groisman, E.A., 1997, The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *The EMBO journal* 16, 5376-5385.
- Blanc-Potard, A.B., Solomon, F., Kayser, J., Groisman, E.A., 1999, The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology* 181, 998-1004.

- Blaser, M.J., Kirschner, D., 2007, The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature* 449, 843-849.
- Bolton, A.J., Osborne, M.P., Wallis, T.S., Stephen, J., 1999, Interaction of *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* with porcine and bovine terminal ileum in vivo. *Microbiology* 145 (Pt 9), 2431-2441.
- Boucrot, E., Henry, T., Borg, J.P., Gorvel, J.P., Meresse, S., 2005, The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science (New York, N.Y)* 308, 1174-1178.
- Bougdour, A., Wickner, S., Gottesman, S., 2006, Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 20, 884-897.
- Bowe, F., Lipps, C.J., Tsolis, R.M., Groisman, E., Heffron, F., Kusters, J.G., 1998, At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect Immun* 66, 3372-3377.
- Boyle, E.C., Bishop, J.L., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2007, *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutics. *J Bacteriol* 189, 1489-1495.
- Brawn, L.C., Hayward, R.D., Koronakis, V., 2007, *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell host & microbe* 1, 63-75.
- Brennan, M.A., Cookson, B.T., 2000, *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 38, 31-40.
- Brown, N.F., Vallance, B.A., Coombes, B.K., Valdez, Y., Coburn, B.A., Finlay, B.B., 2005, *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* 1, e32.
- Brown, S.P., Cornell, S.J., Sheppard, M., Grant, A.J., Maskell, D.J., Grenfell, B.T., Mastroeni, P., 2006, Intracellular demography and the dynamics of *Salmonella enterica* infections. *PLoS Biol* 4, e349.
- Brumell, J.H., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B., 1999, Bacterial invasion: Force feeding by *Salmonella*. *Curr Biol* 9, R277-280.
- Brumell, J.H., Tang, P., Mills, S.D., Finlay, B.B., 2001, Characterization of *Salmonella*-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between *Salmonella*-containing vacuoles and late endocytic compartments. *Traffic* 2, 643-653.
- Buckley, C.D., Pilling, D., Lord, J.M., Akbar, A.N., Scheel-Toellner, D., Salmon, M., 2001, Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 22, 199-204.
- Buchmeier, N.A., Heffron, F., 1989a, Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* 57, 1-7.
- Buchmeier, N.A., Heffron, F., 1989b, Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* 57, 1-7.
- Buchmeier, N.A., Lipps, C.J., So, M.Y., Heffron, F., 1993, Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol Microbiol* 7, 933-936.

- Buchwald, D.S., Blaser, M.J., 1984, A review of human salmonellosis: II. Duration of excretion following infection with nontyphi *Salmonella*. *Rev Infect Dis* 6, 345-356.
- Bueno, S.M., Gonzalez, P.A., Kalergis, A.M., 2009, Use of genetically modified bacteria to modulate adaptive immunity. *Curr Gene Ther* 9, 171-184.
- Bullifent, H.L., Griffin, K.F., Jones, S.M., Yates, A., Harrington, L., Titball, R.W., 2000, Antibody responses to *Yersinia pestis* F1-antigen expressed in *Salmonella typhimurium* *aroA* from in vivo-inducible promoters. *Vaccine* 18, 2668-2676.
- Bumann, D., 2001, Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect Immun* 69, 7493-7500.
- Cano, D.A., Martinez-Moya, M., Pucciarelli, M.G., Groisman, E.A., Casadesus, J., Garcia-Del Portillo, F., 2001a, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* 69, 6463-6474.
- Cano, D.A., Martinez-Moya, M., Pucciarelli, M.G., Groisman, E.A., Casadesus, J., Garcia-Del Portillo, F., 2001b, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* 69, 6463-6474.
- Cano, D.A., Pucciarelli, M.G., Martinez-Moya, M., Casadesus, J., Garcia-del Portillo, F., 2003, Selection of small-colony variants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells. *Infect Immun* 71, 3690-3698.
- Casadaban, M.J., Cohen, S.N., 1980, Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 138, 179-207.
- Castelli, M.E., Garcia Vescovi, E., Soncini, F.C., 2000, The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*. *J Biol Chem* 275, 22948-22954.
- Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M., Falkow, S., 1998, Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30, 175-188.
- Clements, J.D., 1987, Use of attenuated mutants of *Salmonella* as carriers for delivery of heterologous antigens to the secretory immune system. *Pathol Immunopathol Res* 6, 137-146.
- Cook, P., Totemeyer, S., Stevenson, C., Fitzgerald, K.A., Yamamoto, M., Akira, S., Maskell, D.J., Bryant, C.E., 2007, *Salmonella*-induced SipB-independent cell death requires Toll-like receptor-4 signalling via the adapter proteins Tram and Trif. *Immunology* 122, 222-229.
- Coombes, B.K., Wickham, M.E., Lowden, M.J., Brown, N.F., Finlay, B.B., 2005, Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 17460-17465.
- Coulson, N.M., Fulop, M., Titball, R.W., 1994, Effect of different plasmids on colonization of mouse tissues by the aromatic amino acid dependent *Salmonella typhimurium* SL 3261. *Microb Pathog* 16, 305-311.

- Covone, M.G., Brocchi, M., Palla, E., Dias da Silveira, W., Rappuoli, R., Galeotti, C.L., 1998, Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* 66, 224-231.
- Coyneault, C., Robbe-Saule, V., Norel, F., 1996, Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon. *Mol Microbiol* 22, 149-160.
- Curtiss, R., 3rd, 2002, Bacterial infectious disease control by vaccine development. *J Clin Invest* 110, 1061-1066.
- Curtiss, R., 3rd, Galan, J.E., Nakayama, K., Kelly, S.M., 1990, Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res Microbiol* 141, 797-805.
- Curtiss, R., 3rd, Goldschmidt, R.M., Fletchall, N.B., Kelly, S.M., 1988, Avirulent *Salmonella typhimurium* delta cya delta crp oral vaccine strains expressing a streptococcal colonization and virulence antigen. *Vaccine* 6, 155-160.
- Curtiss, R., 3rd, Kelly, S.M., 1987, *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect Immun* 55, 3035-3043.
- Curtiss, R., 3rd, Wanda, S.Y., Gunn, B.M., Zhang, X., Tinge, S.A., Ananthnarayan, V., Mo, H., Wang, S., Kong, W., 2009, *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect Immun* 77, 1071-1082.
- Chabalgoity, J.A., Dougan, G., Mastroeni, P., Aspinall, R.J., 2002, Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. *Expert Rev Vaccines* 1, 495-505.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I., Hensel, M., 2002, *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* 195, 1155-1166.
- Chatfield, S., Roberts, M., Li, J., Starns, A., Dougan, G., 1994, The use of live attenuated *Salmonella* for oral vaccination. *Dev Biol Stand* 82, 35-42.
- Cheminay, C., Hensel, M., 2008, Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int J Med Microbiol* 298, 87-98.
- Cheminay, C., Mohlenbrink, A., Hensel, M., 2005, Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 174, 2892-2899.
- Chen, H., Schifferli, D.M., 2001, Enhanced immune responses to viral epitopes by combining macrophage-inducible expression with multimeric display on a *Salmonella* vector. *Vaccine* 19, 3009-3018.
- Cherepanov, P.P., Wackernagel, W., 1995, Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.
- Chinchilla, M., Pasetti, M.F., Medina-Moreno, S., Wang, J.Y., Gomez-Duarte, O.G., Stout, R., Levine, M.M., Galen, J.E., 2007, Enhanced immunity to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (PfCSP) by using *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing PfCSP and a PfCSP-encoding DNA vaccine in a heterologous prime-boost strategy. *Infect Immun* 75, 3769-3779.

- Chiu, C.H., Su, L.H., Chu, C., 2004, *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev* 17, 311-322.
- Chiu, C.H., Su, L.H., Chu, C.H., Wang, M.H., Yeh, C.M., Weill, F.X., Chu, C., 2006, Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* 44, 2354-2358.
- Chiu, C.H., Tang, P., Chu, C., Hu, S., Bao, Q., Yu, J., Chou, Y.Y., Wang, H.S., Lee, Y.S., 2005, The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* 33, 1690-1698.
- Christensen, K.A., Myers, J.T., Swanson, J.A., 2002, pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *Journal of cell science* 115, 599-607.
- Darwin, K.H., Miller, V.L., 2001, Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO journal* 20, 1850-1862.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6640-6645.
- Daudel, D., Weidinger, G., Spreng, S., 2007, Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* 6, 97-110.
- Davis, H.L., 1997, Plasmid DNA expression systems for the purpose of immunization. *Curr Opin Biotechnol* 8, 635-646.
- De Groote, M.A., Granger, D., Xu, Y., Campbell, G., Prince, R., Fang, F.C., 1995, Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6399-6403.
- Deiwick, J., Hensel, M., 1999, Regulation of virulence genes by environmental signals in *Salmonella typhimurium*. *Electrophoresis* 20, 813-817.
- Deiwick, J., Salcedo, S.P., Boucrot, E., Gilliland, S.M., Henry, T., Petermann, N., Waterman, S.R., Gorvel, J.P., Holden, D.W., Meresse, S., 2006, The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infection and immunity* 74, 6965-6972.
- Denich, K., Borlin, P., O'Hanley, P.D., Howard, M., Heath, A.W., 1993, Expression of the murine interleukin-4 gene in an attenuated *aroA* strain of *Salmonella typhimurium*: persistence and immune response in BALB/c mice and susceptibility to macrophage killing. *Infect Immun* 61, 4818-4827.
- Denny, J., Boelaert, F., Borck, B., Heuer, O.E., Ammon, A., Makela, P., 2007, Zoonotic infections in Europe: trends and figures - a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill* 12, E071220 071226.
- Diaz, E., Munthali, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., 1994, Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. *Mol Microbiol* 13, 855-861.
- Dietrich, G., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I.C., Lang, A.B., Viret, J.F., 2003a, Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 21, 678-683.

- Dietrich, G., Spreng, S., Favre, D., Viret, J.F., Guzman, C.A., 2003b, Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 5, 10-19.
- Domenech, V.E., Panthel, K., Meinel, K.M., Russmann, H., 2005, Rapid clearance of a recombinant *Salmonella* vaccine carrier prevents enhanced antigen-specific CD8 T-cell responses after oral boost immunizations. *Microbes Infect* 7, 860-866.
- Dominguez-Bernal, G., Tierrez, A., Bartolome, A., Martinez-Pulgarin, S., Salguero, F.J., Antonio Orden, J., de la Fuente, R., 2008, *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* derivatives harbouring deletions in *rpoS* and *phoP* regulatory genes are attenuated in pigs, and survive and multiply in porcine intestinal macrophages and fibroblasts, respectively. *Vet Microbiol* 130, 298-311.
- Dorman, C.J., Chatfield, S., Higgins, C.F., Hayward, C., Dougan, G., 1989, Characterization of porin and *ompR* mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: *ompR* mutants are attenuated in vivo. *Infect Immun* 57, 2136-2140.
- Dorsey, C.W., Laarakker, M.C., Humphries, A.D., Weening, E.H., Baumler, A.J., 2005, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Molecular microbiology* 57, 196-211.
- Dougan, G., Chatfield, S., Pickard, D., Bester, J., O'Callaghan, D., Maskell, D., 1988, Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different *aro* genes. *J Infect Dis* 158, 1329-1335.
- Drecktrah, D., Knodler, L.A., Galbraith, K., Steele-Mortimer, O., 2005, The *Salmonella* SPI1 effector *SopB* stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cellular microbiology* 7, 105-113.
- Du, A., Wang, S., 2005, Efficacy of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Eimeria tenella* infection in chickens. *Int J Parasitol* 35, 777-785.
- Dueger, E.L., House, J.K., Heithoff, D.M., Mahan, M.J., 2003a, *Salmonella* DNA adenine methylase mutants elicit early and late onset protective immune responses in calves. *Vaccine* 21, 3249-3258.
- Dueger, E.L., House, J.K., Heithoff, D.M., Mahan, M.J., 2003b, *Salmonella* DNA adenine methylase mutants prevent colonization of newly hatched chickens by homologous and heterologous serovars. *Int J Food Microbiol* 80, 153-159.
- Dunstan, S.J., Simmons, C.P., Strugnell, R.A., 1999, Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *Infect Immun* 67, 5133-5141.
- Echchannaoui, H., Bianchi, M., Baud, D., Bobst, M., Stehle, J.C., Nardelli-Haeffliger, D., 2008, Intravaginal immunization of mice with recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing human papillomavirus type 16 antigens as a potential route of vaccination against cervical cancer. *Infect Immun* 76, 1940-1951.
- Edwards, R.A., Olsen, G.J., Maloy, S.R., 2002, Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends in microbiology* 10, 94-99.
- Ehrbar, K., Hardt, W.D., 2005, Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect Genet Evol* 5, 1-9.

- Eichelberg, K., Galan, J.E., 1999, Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and hilA. *Infection and immunity* 67, 4099-4105.
- Ellermeier, J.R., Slauch, J.M., 2007, Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Current opinion in microbiology* 10, 24-29.
- Eriksson, S., Bjorkman, J., Borg, S., Syk, A., Pettersson, S., Andersson, D.I., Rhen, M., 2000, *Salmonella typhimurium* mutants that downregulate phagocyte nitric oxide production. *Cell Microbiol* 2, 239-250.
- Evans, D.T., Chen, L.M., Gillis, J., Lin, K.C., Harty, B., Mazzara, G.P., Donis, R.O., Mansfield, K.G., Lifson, J.D., Desrosiers, R.C., Galan, J.E., Johnson, R.P., 2003, Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the *Salmonella* type III secretion antigen delivery system. *J Virol* 77, 2400-2409.
- Everest, P., Frankel, G., Li, J., Lund, P., Chatfield, S., Dougan, G., 1995, Expression of LacZ from the *htrA*, *nirB* and *groE* promoters in a *Salmonella* vaccine strain: influence of growth in mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* 126, 97-101.
- Fang, F.C., Libby, S.J., Buchmeier, N.A., Loewen, P.C., Switala, J., Harwood, J., Guiney, D.G., 1992, The alternative sigma factor *katF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11978-11982.
- Fantuzzi, G., Dinarello, C.A., 1999, Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *Journal of clinical immunology* 19, 1-11.
- Fass, E., Groisman, E.A., 2009, Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* 12, 199-204.
- Feng, X., Oropeza, R., Kenney, L.J., 2003, Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 48, 1131-1143.
- Fields, P.I., Groisman, E.A., Heffron, F., 1989, A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243, 1059-1062.
- Fields, P.I., Swanson, R.V., Haidaris, C.G., Heffron, F., 1986, Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5189-5193.
- Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D., Bossi, L., 2001, Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* 39, 260-271.
- Fink, S.L., Cookson, B.T., 2007, Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cellular microbiology* 9, 2562-2570.
- Finlay, B.B., Falkow, S., 1988, Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie* 70, 1089-1099.
- Folkesson, A., Lofdahl, S., Normark, S., 2002, The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel

- protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Research in microbiology* 153, 537-545.
- Fouts, T.R., Tuskan, R.G., Chada, S., Hone, D.M., Lewis, G.K., 1995, Construction and immunogenicity of *Salmonella typhimurium* vaccine vectors that express HIV-1 gp120. *Vaccine* 13, 1697-1705.
- Frey, J., 2007, Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine* 25, 5598-5605.
- Fu, Y., Galan, J.E., 1999, A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401, 293-297.
- Gahan, M.E., Webster, D.E., Wijburg, O.L., Wesselingh, S.L., Strugnelli, R.A., 2008, Impact of prior immunological exposure on vaccine delivery by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Vaccine* 26, 6212-6220.
- Gaines, S., Sprinz, H., Tully, J.G., Tigertt, W.D., 1968, Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral challenge, and the relationship between the numbers of bacilli and morphologic lesions. *J Infect Dis* 118, 293-306.
- Galan, J.E., Curtiss, R., 3rd, 1989, Virulence and vaccine potential of phoP mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* 6, 433-443.
- Galan, J.E., Wolf-Watz, H., 2006, Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444, 567-573.
- Galen, J.E., Nair, J., Wang, J.Y., Wasserman, S.S., Tanner, M.K., Sztejn, M.B., Levine, M.M., 1999, Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-htrA. *Infect Immun* 67, 6424-6433.
- Garcia-del Portillo, F., Finlay, B.B., 1995, Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *The Journal of cell biology* 129, 81-97.
- Garcia-Del Portillo, F., Jungnitz, H., Rohde, M., Guzman, C.A., 2000, Interaction of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium with dendritic cells is defined by targeting to compartments lacking lysosomal membrane glycoproteins. *Infection and immunity* 68, 2985-2991.
- Garcia-Del Portillo, F., Pucciarelli, M.G., Casadesus, J., 1999, DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11578-11583.
- Garcia Vescovi, E., Soncini, F.C., Groisman, E.A., 1996, Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84, 165-174.
- Garmendia, J., Beuzon, C.R., Ruiz-Albert, J., Holden, D.W., 2003, The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* 149, 2385-2396.
- Garmory, H.S., Brown, K.A., Titball, R.W., 2002, *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26, 339-353.
- Garmory, H.S., Brown, K.A., Titball, R.W., 2003a, DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet Vaccines Ther* 1, 2.

- Garmory, H.S., Perkins, S.D., Phillipotts, R.J., Titball, R.W., 2005, DNA vaccines for biodefence. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1343-1361.
- Garmory, H.S., Titball, R.W., Griffin, K.F., Hahn, U., Bohm, R., Beyer, W., 2003b, *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect Immun* 71, 3831-3836.
- Garvis, S.G., Beuzon, C.R., Holden, D.W., 2001, A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. *Cellular microbiology* 3, 731-744.
- Geddes, K., Worley, M., Niemann, G., Heffron, F., 2005, Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 73, 6260-6271.
- Gerlach, R.G., Hensel, M., 2007a, Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* 297, 401-415.
- Gerlach, R.G., Hensel, M., 2007b, *Salmonella* pathogenicity islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 120, 317-327.
- Gerlach, R.G., Jackel, D., Geymeier, N., Hensel, M., 2007a, *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infection and immunity* 75, 4697-4709.
- Gerlach, R.G., Jackel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W.D., Hensel, M., 2007b, *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cellular microbiology* 9, 1834-1850.
- Germanier, R., Furer, E., 1971, Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of gal E mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 4, 663-673.
- Gherardi, M.M., Garcia, V.E., Brizzio, V., Sordelli, D.O., Cerquetti, M.C., 1993a, Differential persistence, immunogenicity and protective capacity of temperature-sensitive mutants of *Salmonella enteritidis* after oral or intragastric administration to mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 7, 161-168.
- Gherardi, M.M., Garcia, V.E., Sordelli, D.O., Cerquetti, M.C., 1993b, Protective capacity of a temperature-sensitive mutant of *Salmonella enteritidis* after oral and intragastric inoculation in a murine model. *Vaccine* 11, 19-24.
- Giacomodonato, M.N., Uzzau, S., Bacciu, D., Caccuri, R., Sarnacki, S.H., Rubino, S., Cerquetti, M.C., 2007, SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology (Reading, England)* 153, 1221-1228.
- Goni, F., Prelli, F., Schreiber, F., Scholtzova, H., Chung, E., Kascsak, R., Brown, D.R., Sigurdsson, E.M., Chabalgoity, J.A., Wisniewski, T., 2008, High titers of mucosal and systemic anti-PrP antibodies abrogate oral prion infection in mucosal-vaccinated mice. *Neuroscience* 153, 679-686.

- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., 2001, Long-term survival and infectivity of *Salmonella choleraesuis*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 114, 370-374.
- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J., Ackermann, M.R., 1995, Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol* 47, 43-59.
- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J., Kramer, T.T., 1996, Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Appl Environ Microbiol* 62, 141-146.
- Griffiths, E., 1995, Assuring the safety and efficacy of DNA vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 772, 164-169.
- Groisman, E.A., 2001, The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183, 1835-1842.
- Groisman, E.A., Chiao, E., Lipps, C.J., Heffron, F., 1989, *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7077-7081.
- Groisman, E.A., Mouslim, C., 2006, Sensing by bacterial regulatory systems in host and non-host environments. *Nature reviews* 4, 705-709.
- Groisman, E.A., Ochman, H., 1997, How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5, 343-349.
- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M., Gros, P., 1997, Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 185, 717-730.
- Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G., Lax, A.J., Norel, F., Rhen, M., 1993, Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* 7, 825-830.
- Gulig, P.A., Doyle, T.J., 1993, The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun* 61, 504-511.
- Gundel, I., Weidinger, G., ter Meulen, V., Heesemann, J., Russmann, H., Niewiesk, S., 2003, Oral immunization with recombinant *Yersinia enterocolitica* expressing a measles virus CD4 T cell epitope protects against measles virus-induced encephalitis. *J Gen Virol* 84, 775-779.
- Gunn, B.M., Wanda, S.Y., Burshell, D., Wang, C., Curtiss, R., 3rd, Construction of recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine vector strains for safety in newborn and infant mice. *Clin Vaccine Immunol* 17, 354-362.
- Gunn, J.S., Ryan, S.S., Van Velkinburgh, J.C., Ernst, R.K., Miller, S.I., 2000, Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and immunity* 68, 6139-6146.
- Guo, L., Lim, K.B., Gunn, J.S., Bainbridge, B., Darveau, R.P., Hackett, M., Miller, S.I., 1997, Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science (New York, N.Y)* 276, 250-253.
- Haga, T., Kumabe, S., Ikejiri, A., Shimizu, Y., Li, H., Goto, Y., Matsui, H., Miyata, H., Miura, T., 2006, In vitro and in vivo stability of plasmids in attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium used as a

- carrier of DNA vaccine is associated with its replication origin. *Exp Anim* 55, 405-409.
- Hall, L.J., Clare, S., Pickard, D., Clark, S.O., Kelly, D.L., El Ghany, M.A., Hale, C., Dietrich, J., Andersen, P., Marsh, P.D., Dougan, G., 2009, Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-ESAT6 fusion protein. *Vaccine* 27, 6894-6904.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I., 2008, *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6, 53-66.
- Harrison, J.A., Villarreal-Ramos, B., Mastroeni, P., Demarco de Hormaeche, R., Hormaeche, C.E., 1997, Correlates of protection induced by live Aro- *Salmonella typhimurium* vaccines in the murine typhoid model. *Immunology* 90, 618-625.
- Harrison, R.E., Brumell, J.H., Khandani, A., Bucci, C., Scott, C.C., Jiang, X., Finlay, B.B., Grinstein, S., 2004, *Salmonella* impairs RILP recruitment to Rab7 during maturation of invasion vacuoles. *Molecular biology of the cell* 15, 3146-3154.
- Hayward, R.D., Koronakis, V., 1999, Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *The EMBO journal* 18, 4926-4934.
- Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L., Low, D.A., Mahan, M.J., 1999, An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* 284, 967-970.
- Hengge-Aronis, R., 2002, Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 373-395, table of contents.
- Henry, T., Gorvel, J.P., Meresse, S., 2006, Molecular motors hijacking by intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 8, 23-32.
- Hensel, M., 2004, Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294, 95-102.
- Hersh, D., Monack, D.M., Smith, M.R., Ghori, N., Falkow, S., Zychlinsky, A., 1999, The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2396-2401.
- Hohmann, E.L., Oletta, C.A., Killeen, K.P., Miller, S.I., 1996a, *phoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J Infect Dis* 173, 1408-1414.
- Hohmann, E.L., Oletta, C.A., Loomis, W.P., Miller, S.I., 1995, Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2904-2908.
- Hohmann, E.L., Oletta, C.A., Miller, S.I., 1996b, Evaluation of a *phoP/phoQ*-deleted, *aroA*-deleted live oral *Salmonella typhi* vaccine strain in human volunteers. *Vaccine* 14, 19-24.
- Hoise, S.K., Stocker, B.A., 1981, Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238-239.
- Holden, D.W., 2002, Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic* 3, 161-169.
- Holmgren, J., Svennerholm, A.M., 1992, Bacterial enteric infections and vaccine development. *Gastroenterol Clin North Am* 21, 283-302.

- Hopkins, S.A., Niedergang, F., Corthesy-Theulaz, I.E., Kraehenbuhl, J.P., 2000, A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol* 2, 59-68.
- Hormaeche, C.E., 1991, Live attenuated *Salmonella* vaccines and their potential as oral combined vaccines carrying heterologous antigens. *J Immunol Methods* 142, 113-120.
- Huang, D.B., DuPont, H.L., 2005, Problem pathogens: extra-intestinal complications of *Salmonella enterica* serotype Typhi infection. *Lancet Infect Dis* 5, 341-348.
- Huang, I.F., Wagener, M.M., Hsieh, K.S., Liu, Y.C., Wu, T.C., Lee, W.Y., Chiou, C.C., 2004, Nontyphoid salmonellosis in taiwan children: clinical manifestations, outcome and antibiotic resistance. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 38, 518-523.
- Huebener, N., Lange, B., Lemmel, C., Rammensee, H.G., Strandsby, A., Wenkel, J., Jikai, J., Zeng, Y., Gaedicke, G., Lode, H.N., 2003, Vaccination with minigenes encoding for novel 'self' antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma. *Cancer Lett* 197, 211-217.
- Humphrey, T., 2004, *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nat Rev Microbiol* 2, 504-509.
- Humphries, A.D., Townsend, S.M., Kingsley, R.A., Nicholson, T.L., Tsohis, R.M., Baumler, A.J., 2001, Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol Lett* 201, 121-125.
- Husseiny, M.I., Hensel, M., 2005, Evaluation of an intracellular-activated promoter for the generation of live *Salmonella* recombinant vaccines. *Vaccine* 23, 2580-2590.
- Husseiny, M.I., Hensel, M., 2009, Evaluation of *Salmonella* live vaccines with chromosomal expression cassettes for translocated fusion proteins. *Vaccine* 27, 3780-3787.
- Husseiny, M.I., Wartha, F., Hensel, M., 2007, Recombinant vaccines based on translocated effector proteins of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Vaccine* 25, 185-193.
- Ibanez-Ruiz, M., Robbe-Saule, V., Hermant, D., Labrude, S., Norel, F., 2000, Identification of RpoS (σ (S))-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* 182, 5749-5756.
- Ishibashi, Y., Arai, T., 1996, A possible mechanism for host-specific pathogenesis of *Salmonella* serovars. *Microb Pathog* 21, 435-446.
- Isoda, R., Simanski, S.P., Pathangey, L., Stone, A.E., Brown, T.A., 2007, Expression of a *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin on the surface of a *Salmonella* vaccine vector. *Vaccine* 25, 117-126.
- Jantsch, J., Cheminay, C., Chakravorty, D., Lindig, T., Hein, J., Hensel, M., 2003, Intracellular activities of *Salmonella enterica* in murine dendritic cells. *Cellular microbiology* 5, 933-945.
- Jean, S.S., Wang, J.Y., Hsueh, P.R., 2006, Bacteremia caused by *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis in Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 39, 358-365.
- Jepson, M.A., Clark, M.A., 2001, The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3, 1183-1190.

- Johnson, K., Charles, I., Dougan, G., Pickard, D., O'Gaora, P., Costa, G., Ali, T., Miller, I., Hormaeche, C., 1991, The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol Microbiol* 5, 401-407.
- Johnson, K.S., Charles, I.G., Dougan, G., Miller, I.A., Pickard, D., O'Gaora, P., Costa, G., Ali, T., Hormaeche, C.E., 1990, The role of a stress-response protein in bacterial virulence. *Res Microbiol* 141, 823-825.
- Jones, B.D., Falkow, S., 1996, Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 14, 533-561.
- Jones, B.D., Ghorri, N., Falkow, S., 1994, *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180, 15-23.
- Jun, S., Gilmore, W., Callis, G., Rynda, A., Haddad, A., Pascual, D.W., 2005, A live diarrheal vaccine imprints a Th2 cell bias and acts as an anti-inflammatory vaccine. *J Immunol* 175, 6733-6740.
- Kagi, D., Hengartner, H., 1996, Different roles for cytotoxic T cells in the control of infections with cytopathic versus noncytopathic viruses. *Curr Opin Immunol* 8, 472-477.
- Kelsall, B.L., Strober, W., 1996, Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med* 183, 237-247.
- Kelly, A., Goldberg, M.D., Carroll, R.K., Danino, V., Hinton, J.C., Dorman, C.J., 2004, A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading, England)* 150, 2037-2053.
- Kelly, S.M., Bosecker, B.A., Curtiss, R., 3rd, 1992, Characterization and protective properties of attenuated mutants of *Salmonella choleraesuis*. *Infect Immun* 60, 4881-4890.
- Khan, A.Q., Zhao, L., Hirose, K., Miyake, M., Li, T., Hashimoto, Y., Kawamura, Y., Ezaki, T., 1998a, *Salmonella typhi* rpoS mutant is less cytotoxic than the parent strain but survives inside resting THP-1 macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 161, 201-208.
- Khan, S.A., Everest, P., Servos, S., Foxwell, N., Zahringer, U., Brade, H., Rietschel, E.T., Dougan, G., Charles, I.G., Maskell, D.J., 1998b, A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol Microbiol* 29, 571-579.
- Killar, L.M., Eisenstein, T.K., 1985, Immunity to *Salmonella typhimurium* infection in C3H/HeJ and C3H/HeNCrIBR mice: studies with an aromatic-dependent live *S. typhimurium* strain as a vaccine. *Infect Immun* 47, 605-612.
- Kim, C.C., Falkow, S., 2004, Delineation of upstream signaling events in the salmonella pathogenicity island 2 transcriptional activation pathway. *Journal of bacteriology* 186, 4694-4704.
- Kjaergaard, K., Hasman, H., Schembri, M.A., Klemm, P., 2002, Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J Bacteriol* 184, 4197-4204.
- Klee, S.R., Tzschaschel, B.D., Singh, M., Falt, I., Lindberg, A.A., Timmis, K.N., Guzman, C.A., 1997, Construction and characterization of genetically-marked bivalent anti-*Shigella dysenteriae* 1 and anti-*Shigella flexneri* Y live vaccine candidates. *Microb Pathog* 22, 363-376.

- Knodler, L.A., Celli, J., Hardt, W.D., Vallance, B.A., Yip, C., Finlay, B.B., 2002, Salmonella effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Molecular microbiology* 43, 1089-1103.
- Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O., 2003, Taking possession: biogenesis of the Salmonella-containing vacuole. *Traffic* 4, 587-599.
- Kong, W., Wanda, S.Y., Zhang, X., Bollen, W., Tinge, S.A., Roland, K.L., Curtiss, R., 3rd, 2008, Regulated programmed lysis of recombinant Salmonella in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9361-9366.
- Kox, L.F., Wosten, M.M., Groisman, E.A., 2000, A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *The EMBO journal* 19, 1861-1872.
- Kraehenbuhl, J.P., Pringault, E., Neutra, M.R., 1997, Review article: Intestinal epithelia and barrier functions. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 11 Suppl 3, 3-8; discussion 8-9.
- Kramer, U., Rizos, K., Apfel, H., Autenrieth, I.B., Lattemann, C.T., 2003, Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in Salmonella vaccine strains. *Infect Immun* 71, 1944-1952.
- Ku, Y.W., McDonough, S.P., Palaniappan, R.U., Chang, C.F., Chang, Y.F., 2005, Novel attenuated Salmonella enterica serovar Choleraesuis strains as live vaccine candidates generated by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* 73, 8194-8203.
- Kubori, T., Galan, J.E., 2003, Temporal regulation of salmonella virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell* 115, 333-342.
- Kuhle, V., Hensel, M., 2004, Cellular microbiology of intracellular Salmonella enterica: functions of the type III secretion system encoded by Salmonella pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* 61, 2812-2826.
- Kulkarni, R.R., Parreira, V.R., Sharif, S., Prescott, J.F., 2008, Oral immunization of broiler chickens against necrotic enteritis with an attenuated Salmonella vaccine vector expressing Clostridium perfringens antigens. *Vaccine* 26, 4194-4203.
- Kurita, A., Gotoh, H., Eguchi, M., Okada, N., Matsuura, S., Matsui, H., Danbara, H., Kikuchi, Y., 2003, Intracellular expression of the Salmonella plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells. *Microbial pathogenesis* 35, 43-48.
- Lawley, T.D., Chan, K., Thompson, L.J., Kim, C.C., Govoni, G.R., Monack, D.M., 2006, Genome-wide screen for Salmonella genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS pathogens* 2, e11.
- Ledwith, B.J., Manam, S., Troilo, P.J., Barnum, A.B., Pauley, C.J., Griffiths, T.G., 2nd, Harper, L.B., Beare, C.M., Bagdon, W.J., Nichols, W.W., 2000, Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* 43, 258-272.
- Lee, A.K., Detweiler, C.S., Falkow, S., 2000, OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in Salmonella pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 182, 771-781.

- Lee, Y.K., Puong, K.Y., Ouwehand, A.C., Salminen, S., 2003, Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol* 52, 925-930.
- Lennox, E.S., 1955, Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1, 190-206.
- Lesnick, M.L., Reiner, N.E., Fierer, J., Guiney, D.G., 2001, The Salmonella spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Molecular microbiology* 39, 1464-1470.
- Levine, M.M., DuPont, H.L., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Woodward, W., Gilman, R.H., Libonati, J.P., 1976, Attenuated, streptomycin-dependent Salmonella typhi oral vaccine: potential deleterious effects of lyophilization. *J Infect Dis* 133, 424-429.
- Li, Y., Wang, S., Scarpellini, G., Gunn, B., Xin, W., Wanda, S.Y., Roland, K.L., Curtiss, R., 3rd, 2009, Evaluation of new generation Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 593-598.
- Libby, S.J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E., Guiney, D.G., 2000, The Salmonella virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cellular microbiology* 2, 49-58.
- Lilic, M., Galkin, V.E., Orlova, A., VanLoock, M.S., Egelman, E.H., Stebbins, C.E., 2003, Salmonella SipA polymerizes actin by stapling filaments with nonglobular protein arms. *Science (New York, N.Y)* 301, 1918-1921.
- Linehan, S.A., Rytönen, A., Yu, X.J., Liu, M., Holden, D.W., 2005, SlyA regulates function of Salmonella pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. *Infection and immunity* 73, 4354-4362.
- Lissner, C.R., Weinstein, D.L., O'Brien, A.D., 1985, Mouse chromosome 1 Ity locus regulates microbicidal activity of isolated peritoneal macrophages against a diverse group of intracellular and extracellular bacteria. *J Immunol* 135, 544-547.
- Liu, M.A., 2003, DNA vaccines: a review. *J Intern Med* 253, 402-410.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods (San Diego, Calif)* 25, 402-408.
- Lo-Man, R., Martineau, P., Deriaud, E., Newton, S.M., Jehanno, M., Clement, J.M., Fayolle, C., Hofnung, M., Leclerc, C.D., 1996, Control by H-2 genes of the Th1 response induced against a foreign antigen expressed by attenuated Salmonella typhimurium. *Infect Immun* 64, 4424-4432.
- Lober, S., Jackel, D., Kaiser, N., Hensel, M., 2006, Regulation of Salmonella pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol* 296, 435-447.
- Loessner, H., Endmann, A., Leschner, S., Bauer, H., Zelmer, A., zur Lage, S., Westphal, K., Weiss, S., 2008, Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int J Med Microbiol* 298, 21-26.

- Lowe, D.B., Shearer, M.H., Kennedy, R.C., 2006, DNA vaccines: successes and limitations in cancer and infectious disease. *J Cell Biochem* 98, 235-242.
- Loynachan, A.T., Nugent, J.M., Erdman, M.M., Harris, D.L., 2004, Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars. *Journal of food protection* 67, 1484-1488.
- Lu, X.L., Jiang, X.B., Liu, R.E., Zhang, S.M., 2008, The enhanced anti-angiogenic and antitumor effects of combining flk1-based DNA vaccine and IP-10. *Vaccine* 26, 5352-5357.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M.D., Hurd, D., Harrison, M., Hinton, J.C., 2006, H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS pathogens* 2, e81.
- Luo, F., Feng, Y., Liu, M., Li, P., Pan, Q., Jeza, V.T., Xia, B., Wu, J., Zhang, X.L., 2007, Type IVB pilus operon promoter controlling expression of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus nucleocapsid gene in *Salmonella enterica* Serovar Typhi elicits full immune response by intranasal vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 14, 990-997.
- Luo, Y., Zhou, H., Krueger, J., Kaplan, C., Lee, S.H., Dolman, C., Markowitz, D., Wu, W., Liu, C., Reisfeld, R.A., Xiang, R., 2006, Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest* 116, 2132-2141.
- Ly, K.T., Casanova, J.E., 2007, Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cellular microbiology* 9, 2103-2111.
- Main-Hester, K.L., Colpitts, K.M., Thomas, G.A., Fang, F.C., Libby, S.J., 2008, Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and immunity* 76, 1024-1035.
- Marshall, D.G., Haque, A., Fowler, R., Del Giudice, G., Dorman, C.J., Dougan, G., Bowe, F., 2000, Use of the stationary phase inducible promoters, *spv* and *dps*, to drive heterologous antigen expression in *Salmonella* vaccine strains. *Vaccine* 18, 1298-1306.
- Martin-Orozco, N., Touret, N., Zaharik, M.L., Park, E., Kopelman, R., Miller, S., Finlay, B.B., Gros, P., Grinstein, S., 2006, Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Molecular biology of the cell* 17, 498-510.
- Martinez-Moya, M., de Pedro, M.A., Schwarz, H., Garcia-del Portillo, F., 1998, Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. *Res Microbiol* 149, 309-318.
- Martinoli, C., Chiavelli, A., Rescigno, M., 2007, Entry route of *Salmonella typhimurium* directs the type of induced immune response. *Immunity* 27, 975-984.
- Mastroeni, P., Harrison, J.A., Robinson, J.H., Clare, S., Khan, S., Maskell, D.J., Dougan, G., Hormaeche, C.E., 1998, Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compound-dependent salmonellae in BALB/c mice: role of gamma interferon and macrophage activation. *Infect Immun* 66, 4767-4776.
- Mastroeni, P., Sheppard, M., 2004, *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes Infect* 6, 398-405.

- Mastroeni, P., Vazquez-Torres, A., Fang, F.C., Xu, Y., Khan, S., Hormaeche, C.E., Dougan, G., 2000, Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J Exp Med* 192, 237-248.
- Matsui, H., Bacot, C.M., Garlington, W.A., Doyle, T.J., Roberts, S., Gulig, P.A., 2001, Virulence plasmid-borne spvB and spvC genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *Journal of bacteriology* 183, 4652-4658.
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J.A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., Holden, D.W., 2008, SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Molecular microbiology* 67, 1371-1383.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R.K., 2001, Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413, 852-856.
- McGhee, J.R., Kiyono, H., 1992, Mucosal immunity to vaccines: current concepts for vaccine development and immune response analysis. *Adv Exp Med Biol* 327, 3-12.
- McKelvie, N.D., Stratford, R., Wu, T., Bellaby, T., Aldred, E., Hughes, N.J., Chatfield, S.N., Pickard, D., Hale, C., Dougan, G., Khan, S.A., 2004, Expression of heterologous antigens in *Salmonella* Typhimurium vaccine vectors using the in vivo-inducible, SPI-2 promoter, ssaG. *Vaccine* 22, 3243-3255.
- Medina, E., Guzman, C.A., 2000, Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27, 305-311.
- Merighi, M., Ellmermeier, C.D., Slauch, J.M., Gunn, J.S., 2005, Resolvase-in vivo expression technology analysis of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PhoP and PmrA regulons in BALB/c mice. *Journal of bacteriology* 187, 7407-7416.
- Miller, S.I., 1991, PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence? *Mol Microbiol* 5, 2073-2078.
- Miller, S.I., Kukral, A.M., Mekalanos, J.J., 1989, A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5054-5058.
- Miller, S.I., Mekalanos, J.J., 1989, Strategies for the development of vaccines for typhoid fever, shigellosis, and cholera. *Ann N Y Acad Sci* 569, 145-154.
- Mittrucker, H.W., Kaufmann, S.H., 2000, Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol* 67, 457-463.
- Mollenkopf, H., Dietrich, G., Kaufmann, S.H., 2001, Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination. *Biol Chem* 382, 521-532.
- Monack, D.M., Bouley, D.M., Falkow, S., 2004a, *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of

- chronically infected Nramp1^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med* 199, 231-241.
- Monack, D.M., Mueller, A., Falkow, S., 2004b, Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol* 2, 747-765.
- Monack, D.M., Navarre, W.W., Falkow, S., 2001, Salmonella-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect* 3, 1201-1212.
- Monsieurs, P., De Keersmaecker, S., Navarre, W.W., Bader, M.W., De Smet, F., McClelland, M., Fang, F.C., De Moor, B., Vanderleyden, J., Marchal, K., 2005, Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of molecular evolution* 60, 462-474.
- Montosi, G., Paglia, P., Garuti, C., Guzman, C.A., Bastin, J.M., Colombo, M.P., Pietrangelo, A., 2000, Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis. *Blood* 96, 1125-1129.
- Moreno, M., Kramer, M.G., Yim, L., Chabalgoity, J.A., Salmonella as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 10, 56-76.
- Morgan, E., Bowen, A.J., Carnell, S.C., Wallis, T.S., Stevens, M.P., 2007, SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infection and immunity* 75, 1524-1533.
- Munthali, M.T., Timmis, K.N., Diaz, E., 1996, Use of Colicin E3 for Biological Containment of Microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 62, 1805-1807.
- Murtaugh, M.P., Baarsch, M.J., Zhou, Y., Scamurra, R.W., Lin, G., 1996, Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 54, 45-55.
- Nairz, M., Fritsche, G., Crouch, M.L., Barton, H.C., Fang, F.C., Weiss, G., 2009, Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition. *Cellular microbiology* 11, 1365-1381.
- Navarre, W.W., Halsey, T.A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J.L., Kenney, L.J., Gunn, J.S., Fang, F.C., Libby, S.J., 2005, Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Molecular microbiology* 56, 492-508.
- Nickerson, C.A., Curtiss, R., 3rd, 1997, Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. *Infection and immunity* 65, 1814-1823.
- Niedergang, F., Sirard, J.C., Blanc, C.T., Kraehenbuhl, J.P., 2000, Entry and survival of *Salmonella typhimurium* in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14650-14655.
- Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B.A., Vyas, J.M., Boes, M., Ploegh, H.L., Fox, J.G., Littman, D.R.,

- Reinecker, H.C., 2005, CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258.
- Niethammer, A.G., Xiang, R., Ruehlmann, J.M., Lode, H.N., Dolman, C.S., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., 2001, Targeted interleukin 2 therapy enhances protective immunity induced by an autologous oral DNA vaccine against murine melanoma. *Cancer Res* 61, 6178-6184.
- Norte, V.A., Stapleton, M.R., Green, J., 2003, PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium slyA gene. *Journal of bacteriology* 185, 3508-3514.
- O'Callaghan, D., Maskell, D., Liew, F.Y., Easmon, C.S., Dougan, G., 1988, Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 56, 419-423.
- O'Callaghan, D., Maskell, D., Tite, J., Dougan, G., 1990, Immune responses in BALB/c mice following immunization with aromatic compound or purine-dependent *Salmonella typhimurium* strains. *Immunology* 69, 184-189.
- Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F., Groisman, E.A., 1996, Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7800-7804.
- Ochoa-Reparaz, J., Riccardi, C., Rynda, A., Jun, S., Callis, G., Pascual, D.W., 2007, Regulatory T cell vaccination without autoantigen protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178, 1791-1799.
- Ochoa-Reparaz, J., Rynda, A., Ascon, M.A., Yang, X., Kochetkova, I., Riccardi, C., Callis, G., Trunkle, T., Pascual, D.W., 2008, IL-13 production by regulatory T cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis independently of autoantigen. *J Immunol* 181, 954-968.
- Ohl, M.E., Miller, S.I., 2001, *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* 52, 259-274.
- Okamura, M., Lillehoj, H.S., Raybourne, R.B., Babu, U.S., Heckert, R.A., Tani, H., Sasai, K., Baba, E., Lillehoj, E.P., 2005a, Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol* 107, 327-335.
- Okamura, M., Lillehoj, H.S., Raybourne, R.B., Babu, U.S., Heckert, R.A., Tani, H., Sasai, K., Baba, E., Lillehoj, E.P., 2005b, Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol* 107, 327-335.
- Orr, N., Galen, J.E., Levine, M.M., 2001, Novel use of anaerobically induced promoter, dmsA, for controlled expression of fragment C of tetanus toxin in live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 908-htrA. *Vaccine* 19, 1694-1700.
- Otto, H., Tezcan-Merdol, D., Girsch, R., Haag, F., Rhen, M., Koch-Nolte, F., 2000, The spvB gene-product of the *Salmonella enterica* virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase. *Molecular microbiology* 37, 1106-1115.
- Ouellette, A.J., 2005, Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. *Springer Semin Immunopathol* 27, 133-146.

- Oxer, M.D., Bentley, C.M., Doyle, J.G., Peakman, T.C., Charles, I.G., Makoff, A.J., 1991, High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated *nirB* promoter. *Nucleic Acids Res* 19, 2889-2892.
- Parry, C.M., 2004, Typhoid Fever. *Curr Infect Dis Rep* 6, 27-33.
- Parsonage, G., Filer, A.D., Haworth, O., Nash, G.B., Rainger, G.E., Salmon, M., Buckley, C.D., 2005, A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol* 26, 150-156.
- Pasetti, M.F., Anderson, R.J., Noriega, F.R., Levine, M.M., Sztein, M.B., 1999, Attenuated *deltaguaBA* *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clin Immunol* 92, 76-89.
- Patel, J.C., Galan, J.E., 2005, Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*--all in the name of entry. *Current opinion in microbiology* 8, 10-15.
- Paulin, S.M., Jagannathan, A., Campbell, J., Wallis, T.S., Stevens, M.P., 2007, Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence. *Infect Immun* 75, 3950-3960.
- Pickard, D., Li, J., Roberts, M., Maskell, D., Hone, D., Levine, M., Dougan, G., Chatfield, S., 1994, Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect Immun* 62, 3984-3993.
- Pietila, T.E., Veckman, V., Kyllonen, P., Lahtenmaki, K., Korhonen, T.K., Julkunen, I., 2005, Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in *Salmonella*-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 78, 909-920.
- Porwollik, S., McClelland, M., 2003, Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5, 977-989.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., West, A.B., 1999a, Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277, C1-9.
- Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., West, A.B., 1999b, Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 277, C183-201.
- Prost, L.R., Daley, M.E., Le Sage, V., Bader, M.W., Le Moual, H., Klevit, R.E., Miller, S.I., 2007, Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Molecular cell* 26, 165-174.
- Prost, L.R., Miller, S.I., 2008, The *Salmonellae* PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. *Cellular microbiology* 10, 576-582.
- Qu, D., Wang, S., Cai, W., Du, A., 2008, Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine* 26, 4541-4548.
- Ramos-Morales, F., Prieto, A.I., Beuzon, C.R., Holden, D.W., Casadesus, J., 2003, Role for *Salmonella enterica* enterobacterial common antigen in bile resistance and virulence. *J Bacteriol* 185, 5328-5332.
- Ramsden, A.E., Holden, D.W., Mota, L.J., 2007, Membrane dynamics and spatial distribution of *Salmonella*-containing vacuoles. *Trends in microbiology* 15, 516-524.

- Register, K.B., Sacco, R.E., Brockmeier, S.L., 2007, Immune response in mice and swine to DNA vaccines derived from the *Pasteurella multocida* toxin gene. *Vaccine* 25, 6118-6128.
- Reisfeld, R.A., Niethammer, A.G., Luo, Y., Xiang, R., 2004, DNA vaccines designed to inhibit tumor growth by suppression of angiogenesis. *Int Arch Allergy Immunol* 133, 295-304.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P., 2001, Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361-367.
- Rizos, K., Lattemann, C.T., Bumann, D., Meyer, T.F., Aebischer, T., 2003, Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun* 71, 6320-6328.
- Roland, K.L., Tinge, S.A., Killeen, K.P., Kochi, S.K., 2005, Recent advances in the development of live, attenuated bacterial vectors. *Curr Opin Mol Ther* 7, 62-72.
- Roof, M.B., Doitchinoff, D.D., 1995, Safety, efficacy, and duration of immunity induced in swine by use of an avirulent live *Salmonella choleraesuis*-containing vaccine. *Am J Vet Res* 56, 39-44.
- Roof, M.B., Kramer, T.T., Roth, J.A., Minion, F.C., 1992, Characterization of a *Salmonella choleraesuis* isolate after repeated neutrophil exposure. *Am J Vet Res* 53, 1328-1332.
- Rosenberger, C.M., Gallo, R.L., Finlay, B.B., 2004, Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2422-2427.
- Ruan, Z., Yang, Z., Wang, Y., Wang, H., Chen, Y., Shang, X., Yang, C., Guo, S., Han, J., Liang, H., Wu, Y., 2009, DNA vaccine against tumor endothelial marker 8 inhibits tumor angiogenesis and growth. *J Immunother* 32, 486-491.
- Russmann, H., Shams, H., Poblete, F., Fu, Y., Galan, J.E., Donis, R.O., 1998, Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science* 281, 565-568.
- Ryan, E.T., Crean, T.I., Kochi, S.K., John, M., Luciano, A.A., Killeen, K.P., Klose, K.E., Calderwood, S.B., 2000, Development of a DeltaglnA balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 68, 221-226.
- Rychlik, I., Gregorova, D., Hradecka, H., 2006, Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary microbiology* 112, 1-10.
- Rydstrom, A., Wick, M.J., 2007, Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection. *J Immunol* 178, 5789-5801.
- Saarinen, M., Pelliniemi, L.J., Granfors, K., 1996, Survival and degradation of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in intestinal epithelial cells in vitro. *J Med Microbiol* 45, 463-471.
- Salcedo, S.P., Holden, D.W., 2003, SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *Embo J* 22, 5003-5014.
- Sanderson, K.E., Hessel, A., Rudd, K.E., 1995, Genetic map of *Salmonella typhimurium*, edition VIII. *Microbiol Rev* 59, 241-303.

- Sansonetti, P.J., Phalipon, A., 1999, M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Seminars in immunology* 11, 193-203.
- Santos, R.L., Zhang, S., Tsolis, R.M., Baumler, A.J., Adams, L.G., 2002, Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Vet Pathol* 39, 200-215.
- Sato, T., Kanai, T., Watanabe, M., Sakuraba, A., Okamoto, S., Nakai, T., Okazawa, A., Inoue, N., Totsuka, T., Yamazaki, M., Kroczeck, R.A., Fukushima, T., Ishii, H., Hibi, T., 2004, Hyperexpression of inducible costimulator and its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 126, 829-839.
- Schagger, H., von Jagow, G., 1987, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schenk, M., Mueller, C., 2008, The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best practice & research* 22, 391-409.
- Schlumberger, M.C., Hardt, W.D., 2006, *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Current opinion in microbiology* 9, 46-54.
- Schmidt, H., Hensel, M., 2004, Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical microbiology reviews* 17, 14-56.
- Schoen, C., Stritzker, J., Goebel, W., Pilgrim, S., 2004, Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol* 294, 319-335.
- Schwan, W.R., Huang, X.Z., Hu, L., Kopecko, D.J., 2000a, Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun* 68, 1005-1013.
- Schwan, W.R., Huang, X.Z., Hu, L., Kopecko, D.J., 2000b, Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun* 68, 1005-1013.
- Schwan, W.R., Kopecko, D.J., 1997, Serovar specific differences in *Salmonella* survival within macrophage cells. *Adv Exp Med Biol* 412, 277-278.
- Shakespeare, W.A., Davie, D., Tonnerre, C., Rubin, M.A., Strong, M., Petti, C.A., 2005, Nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi presenting as a primary psoas abscess: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol* 43, 996-998.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D.W., 1996, Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2593-2597.
- Shelobolina, E.S., Sullivan, S.A., O'Neill, K.R., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2004, Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 70, 2959-2965.
- Sheppard, M., Webb, C., Heath, F., Mallows, V., Emilianus, R., Maskell, D., Mastroeni, P., 2003, Dynamics of bacterial growth and distribution

- within the liver during Salmonella infection. *Cell Microbiol* 5, 593-600.
- Smith, A.C., Cirulis, J.T., Casanova, J.E., Scidmore, M.A., Brumell, J.H., 2005, Interaction of the Salmonella-containing vacuole with the endocytic recycling system. *The Journal of biological chemistry* 280, 24634-24641.
- Smith, J.L., 2003, The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J Food Prot* 66, 1292-1303.
- Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M., Phipps, R.P., 1997, Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 151, 317-322.
- Soncini, F.C., Groisman, E.A., 1996, Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol* 178, 6796-6801.
- Soncini, F.C., Vescovi, E.G., Groisman, E.A., 1995, Transcriptional autoregulation of the Salmonella typhimurium *phoPQ* operon. *J Bacteriol* 177, 4364-4371.
- Soo, S.S., Villarreal-Ramos, B., Anjam Khan, C.M., Hormaeche, C.E., Blackwell, J.M., 1998, Genetic control of immune response to recombinant antigens carried by an attenuated Salmonella typhimurium vaccine strain: *Nramp1* influences T-helper subset responses and protection against leishmanial challenge. *Infect Immun* 66, 1910-1917.
- Spreng, S., Dietrich, G., Goebel, W., Gentschev, I., 2003, Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing protective listerial epitopes within a surface-exposed loop of the *TolC*-protein. *Vaccine* 21, 746-752.
- Spreng, S., Dietrich, G., Weidinger, G., 2006, Rational design of Salmonella-based vaccination strategies. *Methods* 38, 133-143.
- Steele-Mortimer, O., 2008, The Salmonella-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol* 11, 38-45.
- Strong, S.A., Pizarro, T.T., Klein, J.S., Cominelli, F., Fiocchi, C., 1998, Proinflammatory cytokines differentially modulate their own expression in human intestinal mucosal mesenchymal cells. *Gastroenterology* 114, 1244-1256.
- Sundquist, M., Rydstrom, A., Wick, M.J., 2004, Immunity to Salmonella from a dendritic point of view. *Cell Microbiol* 6, 1-11.
- Svensson, M., Johansson, C., Wick, M.J., 2000, Salmonella enterica serovar typhimurium-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *Infection and immunity* 68, 6311-6320.
- Sydenham, M., Douce, G., Bowe, F., Ahmed, S., Chatfield, S., Dougan, G., 2000, Salmonella enterica serovar typhimurium *surA* mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect Immun* 68, 1109-1115.
- Tam, M.A., Rydstrom, A., Sundquist, M., Wick, M.J., 2008, Early cellular responses to Salmonella infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol Rev* 225, 140-162.
- Testerman, T.L., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Libby, S.J., Fang, F.C., 2002, The alternative sigma factor *sigmaE* controls

- antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Molecular microbiology* 43, 771-782.
- Tezcan-Merdol, D., Nyman, T., Lindberg, U., Haag, F., Koch-Nolte, F., Rhen, M., 2001, Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. *Molecular microbiology* 39, 606-619.
- Thankavel, K., Shah, A.H., Cohen, M.S., Ikeda, T., Lorenz, R.G., Curtiss, R., 3rd, Abraham, S.N., 1999, Molecular basis for the enterocyte tropism exhibited by *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae. *J Biol Chem* 274, 5797-5809.
- Tierrez, A., Garcia-del Portillo, F., 2005, New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol* 7, 901-909.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., 2005, Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 521-524.
- Tischler, A.D., McKinney, J.D., Contrasting persistence strategies in *Salmonella* and *Mycobacterium*. *Current opinion in microbiology* 13, 93-99.
- Tobar, J.A., Carreno, L.J., Bueno, S.M., Gonzalez, P.A., Mora, J.E., Quezada, S.A., Kalergis, A.M., 2006, Virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. *Infection and immunity* 74, 6438-6448.
- Tobar, J.A., Gonzalez, P.A., Kalergis, A.M., 2004, *Salmonella* escape from antigen presentation can be overcome by targeting bacteria to Fc gamma receptors on dendritic cells. *J Immunol* 173, 4058-4065.
- Tu, X., Latifi, T., Bougdour, A., Gottesman, S., Groisman, E.A., 2006, The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative sigma factor RpoS in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13503-13508.
- Tzschaschel, B.D., Guzman, C.A., Timmis, K.N., de Lorenzo, V., 1996, An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin IIeB subunit by *Salmonella typhimurium* aroA. *Nat Biotechnol* 14, 765-769.
- Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D., Groisman, E.A., 1999, A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *The EMBO journal* 18, 3924-3933.
- Uthe, J.J., Royaeae, A., Lunney, J.K., Stabel, T.J., Zhao, S.H., Tuggle, C.K., Bearson, S.M., 2007, Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium. *Mol Immunol* 44, 2900-2914.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., Bossi, L., 2001, Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15264-15269.
- Valdivia, R.H., Falkow, S., 1997, Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277, 2007-2011.
- van Asten, A.J., Koninkx, J.F., van Dijk, J.E., 2005, *Salmonella* entry: M cells versus absorptive enterocytes. *Vet Microbiol* 108, 149-152.
- van der Velden, A.W., Velasquez, M., Starnbach, M.N., 2003, *Salmonella* rapidly kill dendritic cells via a caspase-1-dependent mechanism. *J Immunol* 171, 6742-6749.

- van Drunen Littel-van den Hurk, S., Babiuk, S.L., Babiuk, L.A., 2004, Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. *Immunol Rev* 199, 113-125.
- Varona, R., Cadenas, V., Gomez, L., Martinez, A.C., Marquez, G., 2005, CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease responses. *Blood* 106, 18-26.
- Vassaux, G., Nitcheu, J., Jezard, S., Lemoine, N.R., 2006, Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol* 208, 290-298.
- Vazquez-Torres, A., Fang, F.C., 2000, Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Curr Opin Microbiol* 3, 54-59.
- Vazquez-Torres, A., Fang, F.C., 2001, Salmonella evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect* 3, 1313-1320.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A.J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W.T., Fang, F.C., 1999, Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 401, 804-808.
- Vidal, S., Tremblay, M.L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., Gros, P., 1995, The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med* 182, 655-666.
- Vladoianu, I.R., Chang, H.R., Pechere, J.C., 1990, Expression of host resistance to Salmonella typhi and Salmonella typhimurium: bacterial survival within macrophages of murine and human origin. *Microb Pathog* 8, 83-90.
- Walters, D., Carroll, R.K., Navarre, W.W., Libby, S.J., Fang, F.C., Kenney, L.J., 2007, The response regulator SsrB activates expression of diverse Salmonella pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Molecular microbiology* 65, 477-493.
- Wang, Y.J., Hou, Y., Huang, H., Liu, G.R., White, A.P., Liu, S.L., 2008, Two oral HBx vaccines delivered by live attenuated Salmonella: both eliciting effective anti-tumor immunity. *Cancer Lett* 263, 67-76.
- Warwick, C., Lambiris, A.J., Westwood, D., Steedman, C., 2001, Reptile-related salmonellosis. *J R Soc Med* 94, 124-126.
- Waterman, S.R., Holden, D.W., 2003, Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* 5, 501-511.
- Watson, P.R., Paulin, S.M., Jones, P.W., Wallis, T.S., 2000, Interaction of Salmonella serotypes with porcine macrophages in vitro does not correlate with virulence. *Microbiology* 146 (Pt 7), 1639-1649.
- Weiss, S., 2003, Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian hosts by attenuated Salmonella spp. *Int J Med Microbiol* 293, 95-106.
- West, A.H., Stock, A.M., 2001, Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in biochemical sciences* 26, 369-376.
- Wick, M.J., 2004, Living in the danger zone: innate immunity to Salmonella. *Curr Opin Microbiol* 7, 51-57.
- Wilson, J.A., Doyle, T.J., Gulig, P.A., 1997, Exponential-phase expression of spvA of the Salmonella typhimurium virulence plasmid: induction in

- intracellular salts medium and intracellularly in mice and cultured mammalian cells. *Microbiology (Reading, England)* 143 (Pt 12), 3827-3839.
- Winfield, M.D., Groisman, E.A., 2003, Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69, 3687-3694.
- Woc-Colburn, L., Bobak, D.A., 2009, The expanding spectrum of disease due to salmonella: an international perspective. *Curr Infect Dis Rep* 11, 120-124.
- Wong, K.K., McClelland, M., Stillwell, L.C., Sisk, E.C., Thurston, S.J., Saffer, J.D., 1998, Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Infection and immunity* 66, 3365-3371.
- Wood, M.W., Jones, M.A., Watson, P.R., Hedges, S., Wallis, T.S., Galyov, E.E., 1998, Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*. *Molecular microbiology* 29, 883-891.
- Worley, M.J., Ching, K.H., Heffron, F., 2000, *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* 36, 749-761.
- Xiang, R., Lode, H.N., Chao, T.H., Ruehlmann, J.M., Dolman, C.S., Rodriguez, F., Whitton, J.L., Overwijk, W.W., Restifo, N.P., Reisfeld, R.A., 2000, An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5492-5497.
- Xiang, R., Luo, Y., Niethammer, A.G., Reisfeld, R.A., 2008, Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. *Immunol Rev* 222, 117-128.
- Xin, W., Wanda, S.Y., Li, Y., Wang, S., Mo, H., Curtiss, R., 3rd, 2008, Analysis of type II secretion of recombinant pneumococcal PspA and PspC in a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine with regulated delayed antigen synthesis. *Infect Immun* 76, 3241-3254.
- Xu, C., Li, Z.S., Du, Y.Q., Gong, Y.F., Yang, H., Sun, B., Jin, J., 2007, Construction of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* DNA vaccine expressing *H pylori ureB* and IL-2. *World J Gastroenterol* 13, 939-944.
- Xu, X., Hensel, M., Systematic analysis of the SsrAB virulon of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 78, 49-58.
- Xu, X., Husseiny, M.I., Goldwisch, A., Hensel, M., 2010, Efficacy of intracellular activated promoters for generation of *Salmonella*-based vaccines. *Infect Immun*.
- Ygberg, S.E., Clements, M.O., Rytkonen, A., Thompson, A., Holden, D.W., Hinton, J.C., Rhen, M., 2006, Polynucleotide phosphorylase negatively controls spv virulence gene expression in *Salmonella enterica*. *Infection and immunity* 74, 1243-1254.
- Zhang-Barber, L., Turner, A.K., Dougan, G., Barrow, P.A., 1998, Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a *nuoG* mutant of *Salmonella* serotype Gallinarum. *Vaccine* 16, 899-903.
- Zhang, X.L., Jeza, V.T., Pan, Q., 2008, *Salmonella typhi*: from a human pathogen to a vaccine vector. *Cell Mol Immunol* 5, 91-97.

TABLAS DE CEPAS Y PLÁSMIDOS

Tabla A1. Estirpes bacterianas

La mayoría de las estirpes son derivados isogénicos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Choleraesuis CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) 915 (ATCC 13312).

La designación con las letras SCL se refiere a aquellas cepas que forman parte del cepario de nuestro grupo, INBAVET.

Estirpe	Descripción y características relevantes	Referencia
<i>Salmonella enterica</i> serovar Choleraesuis		
CECT 915	Wild-type (WT), utilizada como cepa parental	CETC. Universidad de Valencia, España.
SCL 00022	<i>rpoS</i> : :Km ^R	Este trabajo
SCL 00023	<i>phoP</i> : :Km ^R	Este trabajo
SCL 00031	$\Delta rpoS$	Este trabajo
SCL 00032	$\Delta phoP$	Este trabajo
SCL 00021	WT/pKD46, Amp ^R	Este trabajo
SC-54	Vacuna viva atenuada comercial	(Boehringer Ingelheim) (Roof and Doitchinoff, 1995)
SCL 00071	WT/pCMV β m2A, Amp ^R	Este trabajo
SCL 00072	WT/pCMV3xFLAGm2A, Amp ^R	Este trabajo
SCL 00068	$\Delta rpoS$ /pCMV β m2A, Amp ^R	Este trabajo

SCL 00067	<i>ΔrpoS/pCMV3xFLAGm2A, Amp^R</i>	Este trabajo
SCL 00066	<i>ΔphoP/pCMVβm2A, Amp^R</i>	Este trabajo
SCL 00064	<i>ΔphoP/pCMV3xFLAGm2A, Amp^R</i>	Este trabajo
SCL 00073	<i>SC-54/pCMVβm2A, Amp^R</i>	Este trabajo
SCL 00072	<i>SC-54/pCMV3xFLAGm2A, Amp^R</i>	Este trabajo
SCL 00022	<i>ΔrpoS::Km^R</i>	Este trabajo
SCL 00023	<i>ΔphoP::Km^R</i>	Este trabajo
SCL 00038	<i>ssaG::3xFLAG- Km^R</i>	Este trabajo
SCL 00046	<i>pagC::3xFLAG- Km^R</i>	Este trabajo
SCL 00050	<i>pagC::3xFLAG</i>	Este trabajo
SCL 00051	<i>ssaG::3xFLAG</i>	Este trabajo
SCL 00042	<i>ΔrpoS/ pKD46, Amp^R</i>	Este trabajo
SCL 00043	<i>ΔphoP/ pKD46, Amp^R</i>	Este trabajo
SCL 00044	<i>ΔrpoS ssaG::3xFLAG- Km^R</i>	Este trabajo
SCL 00045	<i>ΔrpoS pagC::3xFLAG- Km^R</i>	Este trabajo
SCL 00047	<i>ΔphoP ssaG::3xFLAG- Km^R</i>	Este trabajo
SCL 00049	<i>ΔphoP pagC::3xFLAG- Km^R</i>	Este trabajo
SCL 00053	<i>ΔrpoS ssaG::3xFLAG</i>	Este trabajo
SCL 00052	<i>ΔrpoS pagC::3xFLAG</i>	Este trabajo

SCL 00055	$\Delta phoP ssaG::3xFLAG$	Este trabajo
SCL 00054	$\Delta phoP pagC::3xFLAG$	Este trabajo
SCL 00084	SC-54/ pKD46, Amp ^R	Este trabajo

Salmonella enterica
serovar Typhimurium

SL 1344	Estirpe WT virulenta	(Hoiseh and Stocker, 1981)
---------	----------------------	----------------------------

Escherichia coli

<i>E. coli</i> Top10	Células electrocompetentes comerciales	(Invitrogen) (Casadaban and Cohen, 1980)
SCL 00040	XL1-Blue/pCR2.1::Bs-Bt, Amp ^R	Este trabajo
SCL 00041	XL1-Blue/pCR2.1::N-X	Este trabajo

Tabla A2. Plásmidos utilizados

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pKD46	Expresa el sistema recombinasa, Amp ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	Expresa fragmentos FLP, Amp ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCMV β m2A	Amp ^R	(Bauer <i>et al.</i> , 2005; Datsenko and Wanner, 2000)
pCMV3xFLAGm2A	Expresa 3xFLAG, Amp ^R	Este trabajo
pSUB11	Contiene 3xFLAG unido al cassette de Km ^R , Amp ^R	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)

Tabla A3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligo	Secuencia (5´-3´)	Orientación en la hebra de ADN	Plásmido utilizado como ADN molde/Gen diana
rpoS-1D	TAGTTCGTC AAGGGATCACGGGTAGGAG CCACCTT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Forward	pKD4
rpoS-1R	GTCGACAGACTGGCCTTTTTTGGACAAGG GTACTT CATATGAATATCCTCCTTAG	Reverse	pKD4
phoP-1D	CTAGACTGTTCTTATTGTTAACACAAGGGA GAAGAG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Forward	pKD4
phoP-1R	GCGACAGCGGCAGAAAATGGCGAGCAAAT TTATTCATT CATATGAATATCCTCCTTA G	Reverse	pKD4
rpoSN-1D	GCACCGGCACCAGCTCTACAC	Forward	<i>nlpD</i>
rpoSC-1R	CCAGCCGCGAACACTATCCAC	Reverse	Región intergénica adyacente a <i>rpoS</i> , en dirección 3´ de la hebra de ADN
phoPN-1D	AGAGGGTGACTATTTGTCTGG	Forward	Región intergénica adyacente a <i>phoP</i> , en dirección 5´ de la hebra de ADN
phoPC-1R	CAGGTTGCTTTCGCCGCGGCAG	Reverse	<i>phoQ</i>
pagCF-1D	AAAAATAAACGGCTTCAACGTCGGGGTTG GATACCGTTTCGACTACAAAGACCATGAC GG	Forward	pSUB11
pagCF-1R	GGCGGTGCGGAAGGCGAACCTTCCGCATA GCTTATGCTTTCATATGAATATCCTCCTTA G	Reverse	pSUB11
ssaGFLAG-1D	ATCAAGGATATGCTTAGTGGAATCATTGCT AAAATC GACTACAAAGACCATGACGG	Forward	pSUB11
ssaGFLAG-1R	TCCAGCAGCAACCGTCGAACATCGTCGCT AATAACT CATATGAATATCCTCCTTAG	Reverse	pSUB11
pagC-2D	CAGCCTATCGATTGTCTGAC	Forward	
pagC-2R	TATGCTAGTGAGATGTTATG	Reverse	
ssaG-2D	TATGTTGCCAGTATCCTTACG	Forward	

ssaG-2R	CAGACGCAGCGCCATAGCCTC	Reverse	
CFLA1D-X	CCGGT CTCGAG ATGGACTACAAAGACCA TGACGGTGATTATAAAGATCATGATATCGA TTACAAGGATGACGATGACAAG	Forward	
CFLA1D-N	GGATCCC GCGCCG CCTTGTGCATCGTCATC CTTGTAATCGATATCATGATCTTTATAATCA CCGTCATGGTCTTTGTAGTCCAT	Reverse	
pcmv-1D	CCGCCTTGTGCATCGTCATC	Forward	pCMVβm2A
pcmv-1R	GTAACTTGTTTATTGCAGC	Reverse	pCMVβm2A

Tabla A4. Oligonucleótidos utilizados para la realización de RT-qPCR.

Oligo	Secuencia (5´-3´)	Orientación en la hebra de ADN	Gen diana
qFLAG-2D	GACTACAAAGACCATGACGG	Forward	3xFLAG
qFLAG-2R	GTCATCGTCATCCTTGTAATC	Reverse	3xFLAG
qmBactin-1D	GGCACCACACCTTCTACAATG	Forward	β-actina de ratón (Register <i>et al.</i> , 2007; Varona <i>et al.</i> , 2005)
qmBactin-1R	TGGATGGCTACGTACATGGCT	Reverse	β-actina de ratón (Varona <i>et al.</i> , 2005)

**FINANCIACIÓN EMPLEADA PARA REALIZAR ESTA TESIS
DOCTORAL**

Proyectos actualmente en vigor relacionados indirectamente con el proyecto propuesto:

1. *TÍTULO*: Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación.
ENTIDAD FINANCIADORA: BSCH-UCM
Nº DE REFERENCIA: GR58/08
INVESTIGADOR RESPONSABLE: Ricardo de la Fuente López
DESDE: 2009; *HASTA*: 2011.
2. *TÍTULO*: Adecuación del código genético de la quimera GP5*-proteína M al cerdo y al ratón para optimizar su expresión y mejorar su utilización mediante bactofoeción a partir de *Salmonella choleraesuis* como vacunas frente al síndrome reproductor y respiratorio porcino.
ENTIDAD FINANCIADORA: UCM-Comunidad de Madrid
Nº DE REFERENCIA: CCG08-UCM/AGR-3842
INVESTIGADOR RESPONSABLE: **Gustavo Domínguez Bernal**
DESDE: 2009; *HASTA*: 2010.
3. *TÍTULO*: Optimización de dos cepas vivas atenuadas de *Salmonella choleraesuis* como vehículos vacunales frente al virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino.
ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Educación y Ciencia
Nº DE REFERENCIA: AGL2007-62207
INVESTIGADOR RESPONSABLE: **Gustavo Domínguez Bernal**
DESDE: 2007; *HASTA*: 2010.

**RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS CON PARTE DE LOS
TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL**



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

 ScienceDirect

Veterinary Microbiology 130 (2008) 298–311

**veterinary
microbiology**

www.elsevier.com/locate/vetmic

Salmonella enterica serovar Choleraesuis derivatives harbouring deletions in *rpoS* and *phoP* regulatory genes are attenuated in pigs, and survive and multiply in porcine intestinal macrophages and fibroblasts, respectively

Gustavo Domínguez-Bernal^{a,*}, Alberto Tierrez^{a,1}, Almira Bartolomé^a,
Susana Martínez-Pulgarín^a, Francisco J. Salguero^{b,2},
José Antonio Orden^a, Ricardo de la Fuente^a

^aDepartamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid, Spain³

^bCentro de Investigación en Sanidad Animal, INIA, 28130 Valdeolmos, Madrid, Spain

Received 13 November 2007; received in revised form 16 January 2008; accepted 18 January 2008

Abstract

Live attenuated *Salmonella enterica* strains have been extensively studied as potential vectors for the oral delivery of heterologous antigens. Due to its ability to target immune cells, its specific mechanism for crossing the intestinal barrier, and its swine-restricted tropism, *S. enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis (*S. Choleraesuis*) has attracted a great deal of interest for the production of bacterial-based oral carriers specifically adapted to swine. In this study, two mutants of *S. Choleraesuis* were constructed and their attenuation and intracellular fate analysed with the purpose of engineering new attenuated live strains with improved properties as oral vaccine carriers. Those strains harboured a specific deletion either within the *phoP* or *rpoS* genes, which encode virulence-related regulators in *S. Typhimurium*. In comparison to the wild-type parental *S. Choleraesuis*, the mutant strains, especially $\Delta phoP$, were extremely low in virulence in the murine model and in the natural host, the pig. Moreover, when compared with a commercial live vaccine strain, SC-54, the two mutants showed a higher level of attenuation in mice and $\Delta phoP$ also in pigs. In addition, $\Delta rpoS$ and $\Delta phoP$ presented a proliferation and survival phenotype within swine intestinal primary fibroblast and macrophage cell cultures, respectively. Collectively, the present results indicate

* Corresponding author at: Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913943712; fax: +34 913943908.

E-mail address: gdbernal@vet.ucm.es (G. Domínguez-Bernal).

¹ Present address: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Instituto Carlos III), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain.

² Present address: Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, United Kingdom.

³ The University Complutense of Madrid (Spain) has filed a patent on the $\Delta rpoS$ strain as a carrier delivery vector.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Salmonella enterica serovar Choleraesuis derivatives harbouring deletions in *rpoS* and *phoP* regulatory genes as vehicles for DNA vaccines

Almira Bartolomé¹, Aldara Herrero-Gil¹, Pilar Horcajo, José A. Orden, Ricardo de la Fuente, Gustavo Domínguez-Bernal*

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2009

Received in revised form 9 July 2009

Accepted 3 August 2009

Keywords:

Salmonella Choleraesuis

Survival

Proliferation

Attenuated strain

Pigs

Vaccine vector

ABSTRACT

We investigated the use of two previously described attenuated strains of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis (*S. Choleraesuis*), $\Delta phoP$ and $\Delta rpoS$, compared with the commercial attenuated SC-54 strain, as bactofection vehicles, to deliver an epitope model (3xFLAG) to the intestinal immune system. The gene encoding the epitope 3xFLAG was subcloned into the pCMV β m2A mammalian expression vector (creating pCMV3xFLAGm2A) and introduced into *S. Choleraesuis* strains. The 3xFLAG epitope was expressed efficiently in murine macrophage J774A.1 cell cultures infected with *Salmonella* $\Delta phoP$ and $\Delta rpoS$ vehicles but not with SC-54, as shown by gene-specific quantitative real-time reverse-transcriptase PCR. The stability of pCMV3xFLAGm2A in each strain was determined *in vitro* in the absence of antibiotic selection, and *in vivo* following oral immunisation of BALB/c mice. Administration of the DNA vaccine to mice led to the production of 3xFLAG-specific serum IgG and intestinal IgA antibody responses in $\Delta rpoS$ and SC-54, and spleen cell secretion of IFN- γ following specific 3xFLAG stimulation in $\Delta phoP$. All together, these results indicate that $\Delta phoP$, $\Delta rpoS$ and SC-54 that expressed 3xFLAG from pCMV3xFLAGm2A elicited a different biased immune response, in which the T-helper-1-like cellular immune response was predominant in $\Delta phoP$, whilst IgA-related mucosal immunity predominated in $\Delta rpoS$ and SC-54. We conclude that $\Delta phoP$ and $\Delta rpoS$ of *S. Choleraesuis* are new promising candidates as vaccine bactofection vectors.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

DNA vaccines offer several advantages over conventional methods of immunisation, in that they are easy to develop, are safe and well tolerated by laboratory and livestock animals, and are capable of stimulating cellular and humoral immune responses (Daudel et al., 2007). However, their relatively low efficacy, specifically in target species, is an important disadvantage, and several strate-

gies have been employed to overcome this major stumbling block of DNA vaccines. The major challenge to improving DNA-based vaccines is to increase its transfection efficiency (Dietrich et al., 2003; van Drunen Littel-van den Hurk et al., 2004). An attractive alternative is the mucosal delivery of plasmid DNA by orally administered intracellular bacteria (Dietrich et al., 2003).

Attenuated bacteria can transfer plasmids that encode foreign antigens under the control of eukaryotic promoters to the host cells, and are considered as ideal candidates for the delivery of DNA vaccines (bactofection) (Daudel et al., 2007). Careful selection of an appropriate carrier strain and its attenuated mutations is an important means to fine-tune the quality of the immune response. Among other

* Corresponding author. Tel.: +34 913943712; fax: +34 913943908.

E-mail address: gdbernal@vet.ucm.es (G. Domínguez-Bernal).

¹ These authors contributed equally to the study.