

- Edds GT. Acute Aflatoxicosis: A Review. Journal Of American VeterInary Medical Association. 162 (4): 304 - 309, 1973.
- Faraj MK, Smith J. E. & Harran G.. Interaction Of Water Activity And Temperature On Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in Irradiated Maiz Seeds. Food Additives and Contaminants. 8 (6): 731 - 736. 1991.
- Aflatoxin Biodegradation: Effects Of Temperature and Microbes. Mycological Research. 97 (11): 1388 - 1392, 1993.
- Frisvad JC. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Profiles of Mycotoxins and Other Secondary Metabolites. Journal of Chromatography, 392: 333 - 347, 1987.
- Thrane U. Standardized High-Performance Liquid Chromatography of 182 Mycotoxins and other Fungal Metabolites Based on Alkylphenone Retention Indices and UV-VIS Spectra (Diode Array Detection). Journal of Chromatography, 404: 195 -214, 1987.
- Hamid AB, Smith J. E; Involvement of cytochrome P-450 monooxygenase in aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus*. Journal of Industrial Microbiology, 17: 683 - 689, 1987.
- Hill RA, Wilson DM, McMillan WW, Wildstrom NW, Cole RJ, Sanders TH, and Blankenship P. D. Ecology of the *Aspergillus flavus* & aflatoxin formation in maize & groundnut. In *Trichothecenes and Other Mycotoxins* (ed J. Lacey), Pag 79 - 86. John Wiley & Sons Inc. Chichester 1985.
- Lapa MAG. Influência Da Aflatoxina B1 Sobre A Resposta À Desnutrição Protéica. Tese Para Obtenção Do Grau De Doutor. Universidade De São Paulo. Faculdade De Ciências Farmacêuticas, Curso De Pósgraduação Em Ciência Dos Alimentos, Área De Nutrição Experimental. 75 Pag, São Paulo, 1983.
- Lázaro F, Luque de Castro MD, and Valcárcel M. Fluorimetric Determination of Aflatoxins in Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography with Flow Injection Analysis. Journal of Chromatography, 448: 173 -181, 1988.
- Lillehoj EB. Aflatoxin: Genetic Mobilization Agent. In *Handbook Of Applied Mycology Vol 5: Mycotoxins In Ecological Systems*, Edited By Bhatnagar D., Lillehoj E. B.& Arora D. K., New York, P6 1992.
- Martins M J R. Determinação De Aflatoxinas Em Amendoim E Derivados Por Cromatografia Em Camada Delgada. Tese Para Obtenção Do Grau De Mestre. Universidade Federal De Pernambuco, Centro De Ciências Exatas E Da Natureza, 86 Pag, Recife, 1979.
- Moule Y. Mécanisme D'action Des Mycotoxins. Annales De La Nutrition Et De L'alimentation. 31: 803 - 810, 1977.
- Soares LMV, and Rodriguez-Amaya DB. Programa Nacional De Micotoxinas; Determinação De Aflatoxinas Em Amendoim. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72: 22-26, 1989.
- Steyn PS, Vlegaar R. and Vessels PL. The Biosynthesis Of Aflatoxin and Its Congeners. In *The Biosynthesis Of Micotoxins. A Study In Secondary Metabolisms* Edited By Steyn P. S. Academic Press, New York, Pag 104 - 155, 1980.
- Stoloff L. Aflatoxins An Overview. In *Mycotoxins In Human and Animal Health*. Rodricks J. V.; Hesseltine C. W & Mehlman (Eds). Pathotox Publishers, Park Forest South Il, Pag 7-28, 1977.
- Urbanek R. Syntheses and Mechanistic Studies Of The Potent Mycotoxin Aflatoxin B1. Organic Seminar Organic Abstract (Postscript Version). [Http://Www.Chem.Umn.Edu/Studsem/UrbaneK3497/Urbabs.html](http://Www.Chem.Umn.Edu/Studsem/UrbaneK3497/Urbabs.html) - Size 10k - 28-May- 1997.

ANALISIS DEL PERFIL ELECTROFORETICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA DE *Salmonella enteritidis* DE AISLADOS COLOMBIANOS

C. Milton¹, J. Figueroa²

RESUMEN

Se aislaron proteínas de membrana externa (OMP) de once cepas de *Salmonella enteritidis* de las cuales nueve cepas provenían de casos clínicos de campo y dos de ellas fueron adquiridas a la casa comercial ATCC. El análisis de proteínas se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE); el perfil electroforético mostró gran variabilidad entre las proteínas obtenidas de cada aislamiento. Las principales diferencias se observan en proteínas con Mr de 14.4 a 21.5 kDaltons y 38.3 a 48.9 kDaltons. Esta variabilidad podría sugerir diferencias en grado de virulencia entre los distintos aislamientos. Los cultivos de *Salmonella enteritidis* que poseen la proteína de 18.3 kDaltons y componentes de Mr inferior a 14.4 presentan mayor resistencia al proceso de lisis por lisozima que aquellas que no lo poseen. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que el perfil de OMP para *Salmonella enteritidis* puede ser de ayuda en la biotificación de este microorganismo. Finalmente, la heterogeneidad presentada en el perfil de OMP podría estar indicando que en nuestro país la infección de las aves puede ser debida a más de un clon de *Salmonella enteritidis*. **Rev. Med. Vet. Zot. 47:16-22**

1 QF. MSc. Profesor Asistente Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.

2 Micr. MSc. Profesor Asociado Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional de Colombia.

SUMMARY

The outer membrane proteins (OMP) composition of 9 clinical isolates and two ATCC reference strains of *Salmonella enteritidis* from chickens, were examined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The OMP profile showed differences between strains; the main differences were presented in the weight range of 14.4 to 21.5 kDaltons and 38.3 to 48.9 kDaltons; these differences would be suggesting different virulence grade among strains. The strains containing one peptide with a molecular weight of 18.3 kDaltons and components below 14.4 kDaltons seems to resist lysozyme lysis better than others that do not contain these proteins. These results indicate that *Salmonella enteritidis* OMP profile would be useful in biotyping of this microorganism. Finally, the OMP profile heterogeneity indicates that in Colombia avian salmonellosis is caused by more than one bacterial clon of *Salmonella enteritidis*.

1. INTRODUCCIÓN

La membrana de las bacterias Gram negativas está conformada por 10 a 20 proteínas estructurales aproximadamente y contiene moléculas de lipopolisacárido (LPS) (Schnaitman, 1971; Raetz, 1990); posee funciones que están bajo el control de genes específicos y que le confieren propiedades especiales, permitiendo a la célula dar respuesta a diferentes condiciones ambientales (Salton, 1967). La envoltura de bacterias como *Salmonella* y *Escherichia coli* posee dos membranas, la membrana interna o citoplasmática y la membrana externa que está localizada sobre el peptidoglicano; las dos membranas proporcionan una estructura altamente especializada que presenta gran actividad metabólica (Salton, 1967; Kamio and Nikaido, 1977; Osborn and Wu, 1980; Raetz, 1990).

De otra parte, la superficie de bacterias Gram negativas y positivas tiene importancia en la interacción de la bacteria con las células del hospedero durante el desarrollo de un proceso infeccioso (Hitchcock and Brown, 1983) esto permite a la bacteria expresar genes relacionados con el proceso invasivo (Finlay et al, 1989). En medios de cultivo la regulación de la expresión de genes asociados con la función de membrana y grado de virulencia está determinada por el tipo de experimento y las condiciones empleadas durante el ensayo, siendo diferentes a las condiciones proporcionadas por un modelo in vivo (Brown and Williams, 1985).

El análisis del perfil electroforético de proteínas de membrana (OMP) bacterianas ha sido utilizado en estudios epidemiológicos para *Escherichia coli* (Achtman et al., 1983); *Haemophilus influenzae* (Barenkamp et al., 1981); *Mycoplasma* (Rottem and Razin, 1967); algunas especies de *Neisseria* (Buchanan and Hildebrandt, 1981) y *Salmonella spp.* (Helmuth et al, 1985), ya que las proteínas de membrana, al igual que los plásmidos pueden afectar las propiedades inmunológicas y de virulencia de bacterias potencialmente patógenas (Buchanan and Hildebrandt, 1981).

La relación de concentración entre los componentes de membrana y la forma como están asociados, juega un papel importante en la relación hospedero-patógeno (Hitchcock and Brown 1983; Brown and Williams, 1985; Brubaker, 1985; Bliska et al., 1993), siendo esta asociación importante dentro del proceso de respuesta inmunitaria en la producción de anticuerpos neutralizantes con el fin de impedir la adherencia del microorganismo al tejido (Sciortino, 1993; Stewart-Tull, 1980).

El objetivo del presente trabajo fue establecer las diferencias existentes en el perfil electroforético de OMP de aislados clínicos de *Salmonella enteritidis* empleando el sistema de electroforesis SDS-PAGE, con el fin de poder determinar algunos patrones de expresión proteica de aislados de *S. enteritidis* actuantes en aves en Colombia y que puedan tener futura aplicación en estudios epidemiológicos que involucren casos humanos o animales de otras especies.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon 9 aislados de *Salmonella enteritidis* grupo D procedentes de aves de campo que presentaron cuadros clínicos y dos cepas de referencia American Type Culture Collection (ATCC). Los microorganismos de casos clínicos fueron aislados y tipificados por un laboratorio especializado. Estos gérmenes se encontraban almacenados a -20°C en medio líquido Luria Broth (LB) con glicerol al 30%.

2.2. Crecimiento de bacterias

Las bacterias inicialmente fueron activadas en agar infusión cerebro corazón (BHI) y se identificaron nuevamente mediante la aplicación de un kit de pruebas bioquímicas y serotipificación con un antisuero poli A-I / Vi específico para *Salmonella* (Difco).

Para efectuar el aislamiento de OMP, las bacterias fueron cultivadas durante 16 horas a 37°C en cajas de Petri de 10 cm de diámetro en medio de cultivo selectivo para *Salmonella*. Se cosecharon utilizando solución de NaCl al

1% mas azida de sodio al 0.1% estéril (SSAS); la suspensión bacteriana se colectó con pipeta pasteur en tubos falcon de 50 mL y fue sometida a centrifugación a 9,000 x g por 5 min. El pellet de células bacterianas fue lavado con solución SSAS de acuerdo a la técnica descrita por Jones et al, 1982.

La inactivación de las bacterias se controló realizando siembra de cada uno de los aislados en agar sangre. Las células bacterianas resuspendidas e inactivadas fueron empleadas para realizar estudio morfológico utilizando tinción de Gram con el fin de verificar la pureza del cultivo y las características de la morfológica celular. Finalmente se preparó una suspensión bacteriana con una densidad óptica D.O de 0.4 a 460nm y a una gota de este antígeno se adicionó una gota de una dilución apropiada de antisuero específico para el grupo *Salmonella*, que identifica los grupos antigénicos A-I / Vi distintivo del género *Salmonella*.

2.3. Lisis bacteriana y obtención de proteínas de membrana

Las bacterias lavadas fueron lisadas siguiendo el método descrito por Wensink et al, 1978 y Witholt et al, 1976. Resumiendo: el pellet de células bacterianas fue resuspendido en 5 mL de solución tris 0.1 M / EDTA 0.1 M (TE), pH 7.8; 5 mL de tris 0.1 M / sacarosa 1 M (TS) pH 7.8, a esta suspensión se adicionó lisozima a una concentración de 50 mg/mL y se incubó 1 hora a temperatura ambiente; se centrifugó cada muestra a 9.000 x g por 5 min, retirando el pellet, el sobrenadante (esferoplastos) fue sometido a sonicación (cinco pulsos de 80 Hz con duración de 1 min a 4°C), la mezcla resultante se centrifugó a 90,000 X g por 1 hora en una centrifuga con rotor de ángulo fijo TI875 Beckman; el sobrenadante fue almacenado y el pellet lavado cinco veces con solución salina. Las proteínas de membrana se resuspendieron en SSAS/azida de sodio al 0.1% y se almacenaron en alícuotas a -70°C. Todos los materiales de desecho fueron colocados en solución de hipoclorito de sodio al 0.5%

2.4. Análisis de proteínas

El perfil electroforético de las proteínas de membrana se determinó empleando un sistema SDS-PAGE con gel de resolución T12.5, C3 de 6.5 X 9.5 cm; siguiendo el procedimiento descrito por Helmuth et al. , 1985, brevemente: las proteínas de membrana fueron diluidas en buffer fosfato salino (PBS) hasta alcanzar una concentración de 2 mg/mL ; se tomaron 15 mL de cada una de las muestras para la electroforésis. Se aplicó un voltaje inicial de 70 V durante 15 min. y posteriormente se incremento a 150 V; el tiempo de corrido del gel fue aquel que permitió que el frente de corrido (azul de bromofenol) alcanzara el borde inferior del gel. La visualización de las proteínas separadas se realizó con la coloración de azul de coomassie (Hitchcock and Bronw, 1985).

El peso molecular de cada una de las proteínas separadas fue determinado utilizando una curva de calibración construida a partir de la movilidad relativa (Rf) de patrones de peso molecular marca Promega de rango intermedio, en la que se interpoló el Rf de la proteína problema.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento e identificación de *salmonella enteritidis*

Los 9 aislamientos seleccionados de *Salmonella enteritidis* (SE) corresponden al grupo D, según el análisis realizado en el laboratorio especializado localizado en la ciudad de Bucaramanga.

La tinción de Gram y la observación al microscopio de luz (aumento 100X), permitió verificar la presencia de células con morfología coco-bacilar uniforme y patrón de coloración correspondiente a bacterias Gram negativas.

Al emplear el antisuero Difco específico para antígeno poli A-I / Vi del género *Salmonella*, se confirmó que los 9 aislamientos seleccionados conservaron las características antigénicas del grupo *Salmonella*.

3.2. Aislamiento de proteínas de membrana de *salmonella enteritidis*

A cada una de los cultivos efectuados en idénticas condiciones se les determinó la biomasa (peso húmedo) encontrando una fluctuación entre 0.4111 y 0.6124 g. Este material bajo las mismas condiciones de lisis permitió recuperar entre 0.1 y 0.2 g de membrana en masa húmeda. El pellet obtenido presentó una apariencia gelatinosa, translúcida y color ocre. El número de pulsos de sonicación para lisar por completo las células y obtener OMP de *Salmonella enteritidis* presentó pequeñas variaciones entre los diferentes aislados, por lo que fue necesario incrementar el número de pulsos a ocho para lisar completamente algunos de los cultivos (Tabla 1).

Perfil electroforético de proteínas de membrana de *Salmonella enteritidis*.

Las OMP obtenidas de los 9 aislados de *Salmonella enteritidis* y de las dos cepas ATCC (SE-13 y SE-14), fueron separadas en un sistema SDS-PAGE.

TABLA 1. Masa celular obtenida del cultivo de *Salmonella enteritidis* y mg de proteína de membrana aislada.

AISLADO	MASA (mg) CELULAR HUMEDA	(mg) DE OMP RECUPERADA	PULSOS DE SONICACION
SE-03	551.7	78.3	8
SE-04	494.2	127.5	5
SE-07	450.9	82.4	8
SE-09	612.4	155.0	5
SE-11	411.1	96.0	8
SE-12	433.9	130.3	5
SE-13	541.8	96.6	8
SE-14	482.4	71.5	8
SE-19	421.5	128.5	7
SE-22	580.5	131.7	5
SE-24	514.2	137.5	5

SE-13 y SE-14 cepas de referencia ATCC.

Las OMP de cada uno de los aislados en estudio fueron separadas en gel de resolución con pH 8.8, y presentaron un patrón electroforético uniforme, la abundancia relativa de las proteínas fue diferente para algunas de las cepas; se observaron aproximadamente entre 8 y 9 proteínas por cepa, con masa molecular relativa (Mr) entre 14.6 y 46.2 kDaltons; la resolución para los componentes de membrana con Mr cercano ó inferior a 17 kDaltons no fue la adecuada en este sistema electroforético (Figura. 1A).

Con el fin de mejorar la resolución de polipeptidos de Mr cercano o inferior a 14.4 kDaltons, se procedió a incrementar el pH del gel de resolución a un valor de 9.2; esta modificación permitió mejorar la resolución para moléculas con Mr cercano o inferior a 14.4 kDaltons, lo que permite visualizar en algunos de los aislados por lo menos dos componentes con masas moleculares relativas (Mr) inferiores a 14.4 kDaltons (Figura. 1B). Los resultados del perfil electroforético obtenido para cada una de las cepas de *S. enteritidis* se resumen en la Tabla 2.

Con el fin de poder realizar un mejor análisis de las OMP, se realizó una detección de proteínas de membrana en SDS-PAGE utilizando tinción de plata. El perfil electroforético de las OMP para *S. enteritidis* se encuentra distribuido en el rango de 55.0 y 14.4 kDaltons; este muestra claramente la presencia de componentes con Mr inferior a 14.4 kDaltons en todas las muestras. Además, se evidencia la presencia de proteínas de membrana con Mr 40.0, 40.8 y 46.1 kDaltons refractarias a la tinción con plata. El alto grado de señal de interferencia obtenido no permite realizar una observación muy detallada de todas las proteínas de membrana separadas (Figura. 2).

Los sistemas electroforéticos empleados y las variaciones realizadas no permitieron visualizar la presencia del triplete de proteínas característico para el serotipo *S. enteritidis* reportado por Helmuth et al. en 1985. Para poder verificar la presencia de este triplete, se procedió a realizar un corrido electroforético a pH 9.2 de cada una de las muestras de *S. enteritidis*, a 200 V, 25 mA por gel durante 1.3 horas con el fin de permitir que el patrón de peso

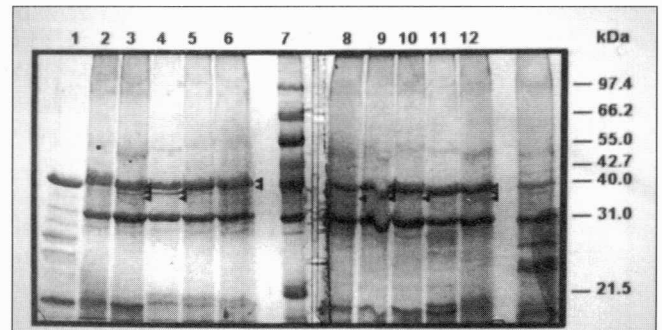


Figura 1A.

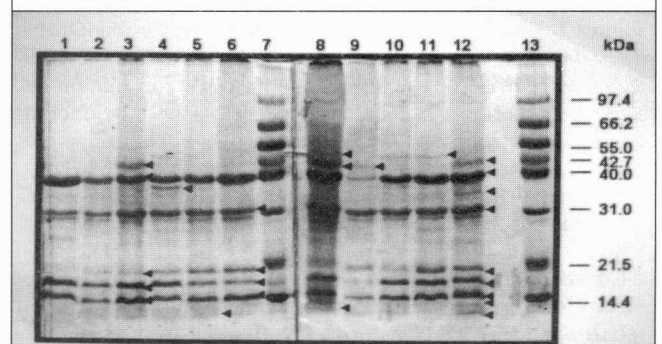


Figura 1B.

Figura 1 A y B. Perfil electroforético de proteínas mayoritarias de membrana (OMP) de las diferentes cepas de *Salmonella enteritidis* (SE) en gel de polyacrilamida de 12.5%. **Figura A.** Gel de resolución de pH 8.8. **Figura B.** Gel de resolución de pH 9.2. Cada carril contiene 300 mg de proteína total de membrana. El patrón de peso molecular MPM, (Promega rango intermedio, posición 7 y 13) se coló en un volumen de 10 mL por gel. El corrido se realizó a 200 V/50 mA en mini-cámara de electroforesis de doble gel durante 1 hora. La tinción se realizó con azul de coomasie. Se detectan entre 8 y 9 proteínas por aislamiento.

molecular de 14.4 kDaltons saliera del gel y aumentar la resolución en la zona de peso molecular entre 37 y 42 kDaltons. Esta modificación al corrido electroforético permitió visualizar en las muestras SE-7, SE-22, SE-24 el triplete de proteínas descrito en trabajos previos por otros grupos de investigación. La presencia de este triplete de proteínas distintivas para *S. enteritidis*, puede ser visualizado en la Figura 3.

4. DISCUSION

Aislamiento de proteínas de membrana

Los aislados de *S. enteritidis* presentaron una clara aglutinación en placa frente al antisuero Difco poli A-I / Vi; indicando que todos los cultivos empleados en el presente trabajo pertenecen al género *Salmonella*. (Roantree, 1967).

Tabla 2. Perfil electroforético de proteínas de membrana en las diferentes cepas de *Salmonella enteritidis*

Mr kD	SE-3	SE-4	SE-7	SE-9	SE-11	SE-12	SE-13	SE-14	SE-19	SE-22	SE-24
48.9				+	+		+		+	+	
46.1			+			+	+	+			+
40.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
39.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38.3		+							+	+	+
37.2				+	+				+		+
30.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

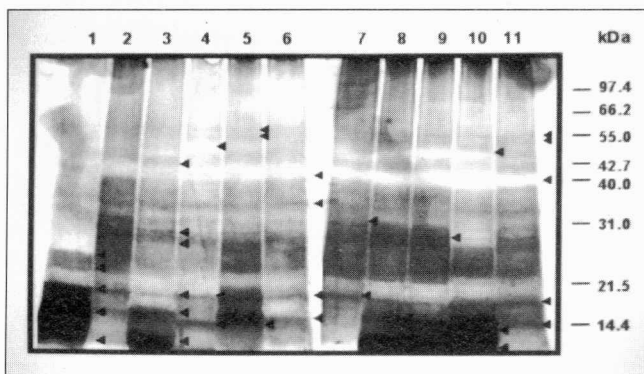


Figura 2. Tinción de plata de proteínas de membrana (OMP) de *Salmonella enteritidis* (SE) en gel de acrilamida de 12.5 %. muestra el perfil electroforético de OMP con tinción de plata de acuerdo a la técnica de Merrill (1990), oxidación con ácido periódico al 0.5% durante una hora, utilizando plata amoniacal y revelando con formalina / citrato; la concentración de proteína aplicada por carril fue 300 mg. En el carril (1) SE-3, (2) SE-4, (3) SE-7, (4) SE-9, (5) SE-11, (6) SE-12, (7) SE-13, (8) SE-14, (9) SE-19, (10) SE-22, (11) SE-24. El corrido se realizó a 200v/ 50 mA en minicámara de electroforesis de doble gel. Se evidencia la presencia de proteínas con Mr 40.0 refractarias a la tinción con plata.

Durante el proceso de aislamiento de envolturas celulares por sonicación, se vio la necesidad de incrementar el número de pulsos para las cepas SE-3, 7, 11, 13 y 14. Esta resistencia al proceso de lisis celular podría estar relacionada con variación en la composición de la envoltura celular por parte de *S. enteritidis*, aunque no se puede descartar la posibilidad de un efecto asociado al LPS bacteriano en cada cepa y/o componentes capsulares de estos aislados, que interfieren con la acción de la lisozima dificultando el proceso de hidrólisis de la pared bacteriana (Roitt and Delves, 1994). La presencia de abundante cápsula por parte de alguna de las bacterias se evidenció por el aspecto pegajoso ó mucoso, que presentaron algunos de los aislados.

Al analizar los patrones electroforéticos de OMP (Figuras 1 y 2) se aprecian variaciones en la composición de la envoltura de *S. enteritidis* que podrían explicar en parte la resistencia al tratamiento con lisozima presentado por estos aislamientos (SE-3, 7, 11, 13 y 14).

El perfil electroforético de OMP para cada una de las cepas de *S. enteritidis* aisladas de casos clínicos de campo y las dos cepas de referencia ATCC muestra que el patrón de OMP es uniforme para *Salmonella* utilizando SDS-PAGE y similar al obtenido por otros grupos de investigación (Hofstra and Dankert 1980; Helmuth et al., 1985; Ortiz et al., 1989.).

El sistema de electroforesis con gel de resolución a pH 8.8, permitió la separación de proteínas con Mr entre 21.5 y 48.9 kDaltons, pero no puede resolver polipéptidos con Mr inferior a 21.5 kDaltons; esto impide hacer un análisis completo del perfil electroforético en las muestras selec-

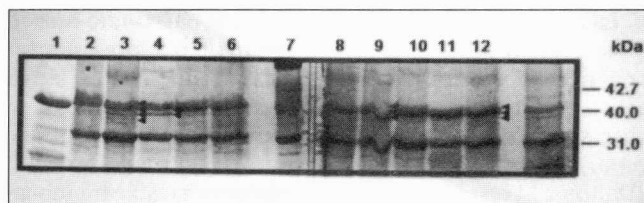


Figura 3. Perfil electroforético de proteínas de membrana (OMP) de las diferentes cepas de *Salmonella enteritidis* (SE) en gel de polyacrilamida de 12.5%. de pH 9.2. Cada carril contiene 300 mg de proteína total de membrana. El patrón de peso molecular MPM, (Promega rango intermedio, posición 7 y 13) se colocó en un volumen de 10 mL por gel. El corrido se realizó a 200 V/ 50 mA en minicámara de electroforesis de doble gel durante 1.3 horas permitiendo la separación de proteínas en la zona de 41 a 38 kDaltons. La tinción se realizó con azul de coomassie. Se observa el triplete de proteínas entre 37 y 42 kDaltons.

cionadas. En este sistema no se puede apreciar el triplete de proteínas entre 38 y 41.7 kDaltons reportado para *S. enteritidis* por Helmuth et al., en 1985. Este sistema de electroforesis permite verificar solo un doblete de proteínas en este rango de peso molecular para las cepas SE-4, SE-11, SE-12, SE-19, SE-22, SE-24 (Figura. 1A).

Al modificar las condiciones de electroforesis y utilizar gel de resolución con pH 9.2, se mejoró la resolución para componentes de membrana de Mr entre 14.4 y 21.5 kDaltons, lo que permitió observar la presencia de proteínas con Mr inferior a 14.4 kDaltons en las cepas SE-7, SE-9, SE-11, SE-13, SE-19 y SE-24 (Figura 1B). Por otro lado, el sistema de electroforesis con gel de resolución de pH 9.2 mejora el coeficiente de correlación (g), lo que permite hacer un mejor calculo del Mr para cada una de las muestras (g gel pH 8.8 = 0.9853; g gel pH 9.2 = 0.9956), haciendo que se disminuya el error de calculo de Mr para los componentes de membrana. Estos resultados concuerdan con los reportados por Makowski and Ramsby en 1995.

Adicionalmente, se observaron tres proteínas: una de Mr 37.2 kDaltons para las cepas SE-9, SE-11, SE-19 y SE-24, otra de 46.1 kDaltons para SE-7, SE-12, SE-13, SE-14 y SE-24 y otra de 48.9 kDaltons para las cepas SE-9, SE-11, SE-13 y SE-19 y que se encuentran en mayor proporción al ser comparadas con otras cepas (Figura 1A) Estos resultados muestran claramente la existencia de variación en la composición de la envoltura entre los diferentes aislados de *S. enteritidis*.

Por otro lado, estas proteínas pueden estar asociadas a diferencias en el grado de virulencia de cada una de estas cepas, aunque no puede descartarse la posibilidad de que la presencia y/o ausencia de proteínas de membrana en estas bacterias pueda estar relacionada con las condiciones de cultivo en el laboratorio. (Osborn and Wu, 1980).

Al lograr una mayor separación de las proteínas, permitiendo que el patrón de peso molecular de 14.4 kDaltons saliera del gel, se pudo mejorar la resolución en la franja

de Mr entre 37 y 41 kDaltons. Este hecho permitió observar la presencia del triplete de proteínas reportado por Helmuth et al. (1985). El triplete característico para *S. enteritidis* puede ser observado en las cepas SE-7, 14, 22 y 24, estas proteínas están asociadas a la membrana externa y se sabe que pertenecen a proteínas de la familia de las porinas (Kamio and Nikaido, 1977; Ortiz et al., 1989) (Figura 3).

Además, las cepas SE-3, SE-4, SE-7, SE-13 y SE-19 presentan una marcada disminución en la proporción de la proteína de membrana con Mr de 18.6 kDaltons, al ser comparadas con las cepas SE-9, SE-11, SE-12, SE-14, SE-22 y SE-24 (Figura 1B). Esta proteína podría ser la misma codificada por el gen pagC, que codifica para una proteína de Mr 18 kDaltons que se encuentra asociada con la supervivencia de *S. enteritidis* dentro de macrófagos y por consiguiente conferir un mayor grado de virulencia. La presencia de esta proteína estaría indicando que las cepas de *Salmonella enteritidis* SE-9, SE-11, SE-12, SE-14, SE-22 y SE-24, poseen un mayor grado de virulencia pudiendo diseminarse mas fácilmente en el hospedero (Pulkkinen and Miller, 1991).

Finalmente, el perfil electroforético de proteínas de membrana de *S. enteritidis* obtenido utilizando tinción de plata, mostró algunos componentes de membrana refractarios a esta técnica (Mr entre 40, 40.8 y 46.1 kDaltons), debido posiblemente a que no presentan en su estructura primaria aminoácidos responsables de la fijación del ion plata (Merril, 1990). Aunque el patrón electroforético de las proteínas de membrana empleando tinción de plata presenta una alta homogeneidad, se puede apreciar una leve variación en los componentes de Mr inferior a 14.4 kDaltons dentro de los que se puede encontrar el LPS y polipéptidos de bajo peso molecular. Estas pequeñas variaciones en la composición de la membrana de *S. enteritidis* puede estar relacionada con diferencias en su comportamiento dentro del hospedero (Figura. 2). Se pudo observar una diferencia en el patrón de oxidación de proteínas entre las diferentes cepas de *S. enteritidis* lo que podría estar relacionado con la mayor o menor proporción de componentes fácilmente oxidables (como aminoácidos) y que puede traducirse en la existencia de variación antigénica entre estos aislamientos. (Loeb and Smith, 1985).

Los resultados presentados aquí muestran la existencia de variaciones en el perfil electroforético de OMP de los aislamientos de *S. enteritidis* efectuados en Colombia. Este hecho puede estar asociado con el grado de virulencia de cada una de las cepas en el huésped natural y/o con variaciones en el patrón de fagotipificación, ya que las proteínas de membrana de cada cepa proveen los receptores específicos para fagos (Osborn and Wu, 1980; Brown and Williams, 1985. Calera et al., 1994).

El análisis del perfil electroforético de OMP de los 9 aislamientos y las dos cepas de referencia de *S. enteritidis* estudiados en el presente trabajo, muestra heterogeneidad entre ellos en los rangos de peso de 14.4 a 21.5 kDaltons y 38.3 a 48.9 kDaltons, lo que estaría indicando que en nuestro país la infección de aves por *Salmonella enteritidis* estaría siendo llevada a cabo por mas de una cepa bacteriana posiblemente con características de virulencia diferente.

Además, los resultados obtenidos muestran claramente que el perfil electroforético de OMP para *S. enteritidis* podría ser de mucha ayuda en estudios de la superficie de esta bacteria.

Para poder corroborar algunas de las apreciaciones presentadas en el presente trabajo, es indispensable realizar estudios de invasión sobre líneas celulares utilizando estos aislados y producir anticuerpos en diferentes especies animales con el fin de realizar un finger-printing de antígenos para poder llegar a determinar el verdadero papel de estas proteínas en la virulencia de estos aislamientos.

BIBLIOGRAFIA

- Achtman MA, Merce A, and Kusecek B. Six widespread bacterial clones among Escherichia coli K1 isolates. Infect and Immun. 39: 315-335. 1983.
- Barenkamp SJ, Munson RS, and Granoff DM. Subtyping isolates of Haemophilus influenzae b by outer-membrane protein profiles. J Infect Dis. 148: 768-776.1981
- Bliska JB, Galán JE, and Falkow S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. Cell. 73: 903-920. 1993.
- Brown MR, and Williams P. The influence of enviroment on envelope properties affecting survival of bacteria infections. Ann Rev Microbiol. 37: 227-256. 1985.
- Buchanan T, and Hildebrandt JF. Antigen-specific serotyping of Neisseria gonorrhoeae: Characterization based upon principal outer membrane protein. Infect Immun. 30: 985-994. 1981.
- Brubaker RR. Mechanisms of bacterial virulence. Annl Rev Microbiol. 32: 1-50. 1985.
- Calera JA, López-Medrano R, and Ovejero M. Variability of Aspergillus nidulans antigens with media and time and temperature of growth. Infect and Immun. 62(6): 2322-2333. 1994.
- Finlay BB, Heffron F, and Falkow S. Epitelial cell surface Salmonella proteins required for bacterial adherence and invasion. Science. 243: 940-943.1989.
- Helmuth R, Stephan R, and Bunge C,. Epidemiology of virulence - associated plasmids and outer membrane proteins patterns within seven common Salmonella serotypes. Infect and Immun. 50: 75-82. 1985.
- Hitchcock P, and Brown T. Morphological heterogeneity among Salmonella 3 Lipopolysaccharide chemotypes in silver stained polyacrylamide gels. J Bacteriol. 156: 369-377. 1985.
- Hofstra H, and Dankert J. Mayor outer membrane proteins: Commom antigenic in Enterobacteriaceae species. J Gen Microbiol. 119: 123-131. 1980.
- Jones GW, Rebert DK, and Svinarich DM, Association of adhesive, invasive, and virulent phenotype of Salmonella typhimurium with autonomus 60 - megaDaltons plasmids. Infect Immun. 38: 476-486. 1982.
- Kamio Y, and Ninaido H. Outer membrane of Salmonella typhimurium identification of proteins exposed on cell surface. Biochim Bioph. Acta. 464: 589-601.1977.

- Loeb MR, and Smith DH. Outer membrane protein composition in disease isolates of *Haemophilus influenzae*: pathologic and epidemiological Implications. *Infect Immun.* 335: 409-417. 1985.
- Makowski GS, and Ramsby M. pH Modification to enhance the molecular sieving properties of sodium dodecyl Sulfate 10% pol-yacrylamide gels. *Anal Bioch.* 207: 283-295. 1995.
- Merrill CR. Gel staining techniques. In *Methods in Enzymology "Guide to protein purification.* Academic press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publisher. New York. Vol 182. Pag 477. 1990.
- Ortiz V, Isibasi A, Garcia-Ortigoza E, and Kumate J. Immunoblot detection of class-specific humoral response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever. *J Clin Microbiol.* 7: 1640-1645. 1989.
- Osborn MJ, and Wu HCP. Proteins of outer membrane of Gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 369-422. 1980.
- Pulkkinen WS, and Miller SI. A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar to a *Yersinia enterocolitica* invasins protein and a bacteriophage λ outer membrane protein. *J Bacteriol.* 173: 86-93. 1991.
- Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Ann Rev Bioch.* 59:129-170. 1990.
- Roantree RJ. *Salmonella* O antigens and virulence. *Ann Rev Microbiol.* 21: 443-466. 1967.
- Roitt I, and Gelve PJ. Avian immune system. In: *Encyclopedia of immunology.* Academic Press. Second printing. Vol 1: 203-206. 1993.
- Rottem S, and Razin S. Electroforetic patterns of membrane proteins of *Mycoplasma*. *J Bacteriol.* 92: 359-364. 1967.
- Salton MJR. Structure and function of bacterial cell membranes. *Ann Rev Microbiol.* 21: 417-440. 1967.
- Schnaitman CA. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. *J Bacteriol.* 108: 545-552. 1971.
- Sciortino CV. Human immune response to the 18kDa outer membrane antigens of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 37: 335-340. 1993.
- Stewart-Tull DE. The immunological activities of bacterial Peptidoglycans. *Ann Rev Microbiol.* 34: 311-340. 1980.
- Wensink J, Gankema H, and Jannsen WH. Membranes of enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* and distribution of enterotoxin activity in different Subcellular fractions. *Bioch Bioph Acta.* 524: 28-36. 1978.
- Witholt B, Boekhout M, and Brock M. An efficient reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Analytic Biochim.* 74: 460 - 470. 1976.

DESARROLLO DEL PLAN HACCP EN UNA PLANTA DE BENEFICIO DE AVES UBICADA EN SANTAFÉ DE BOGOTÁ.

A. Cubillos G.; I. Escobar C. 1; G. Téllez I.; J. Figueroa R.

RESUMEN

Se analizaron los requerimientos y ventajas del desarrollo del Plan HACCP en una planta de beneficio de aves, buscando obtener productos seguros que respondan la demanda de los consumidores por alimentos económicos de buena calidad.

Realizando un diagnóstico (evaluación del proceso, distribución de planta, análisis microbiológicos, encuestas) se caracterizó el producto y su proceso, con el fin de implementar los prerrequisitos del Plan HACCP (Buenas Prácticas de Manufactura y Plan de Saneamiento), necesarios para minimizar los riesgos durante su puesta en marcha. Posteriormente se preparó el Plan HACCP, que junto con la capacitación del personal constituyen la base del funcionamiento del sistema.

Del diagnóstico se dedujo que el producto y su proceso de obtención presentaron deficiencias técnicas e higiénicas. Mediante la implementación de los programas prerrequisitos, las condiciones de producción y la inocuidad del producto mejoraron, lo cual permitió reducir riesgos y determinar la materia prima (aves vivas), evisceración, enfriamiento y despiece como Puntos Críticos de Control.

1 Zootecnistas. Universidad Nacional de Colombia.

2 Médico Veterinario, M.Sc. Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia.

3 Microbióloga, M.Sc. Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia.