

Selección de un medio de cultivo para la obtención de vesículas de membrana externa de *Salmonella* spp.

Laura Remedios-Jiménez^{1*} ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0451-9961>

Arbel Lemus-Cortés¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2330-2381>

Elizabeth López-León¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1052-7100>

Jennifer Fernández-Lorenzo¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5424-9141>

Nadiezda Baños-Paiffer¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5866-3307>

Bárbara Baró-Vicet¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5017-6571>

Olivia Martínez-Armenteros¹ ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-0705-5027>

Danays Vidal-Rosell² ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7745-6802>

¹ Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

² Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba.

Autor por correspondencia: lremediosj@gmail.com

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias Gram negativas del género *Salmonella*. En la actualidad existen vacunas licenciadas para uso en humanos contra *Salmonella* Typhi. Reportes en la literatura sobre proteínas de membrana externa de *Salmonella* spp. con actividad inmunogénica y la existencia de vacunas licenciadas basadas en el uso de vesículas de membrana externa de otras bacterias Gram negativas como *Neisseria meningitidis* serogrupo B, apoyan la factibilidad del desarrollo de vacunas basadas en vesículas contra *Salmonella*. Con la finalidad de seleccionar un medio de cultivo para la obtención de vesículas de membrana externa de *Salmonella* spp., se evaluó el comportamiento de la cepa ATCC-14028 de *Salmonella* Typhimurium en cinco medios de cultivo, de los que se seleccionaron dos atendiendo al rendimiento en biomasa obtenido y velocidad específica de crecimiento. A partir del cultivo de la bacteria en los medios seleccionados, se obtuvieron y purificaron vesículas de membrana externa empleando el método de extracción con detergentes. Fueron caracterizadas mediante una batería analítica: método de Lowry, electroforesis en gel de poliacrilamida (12,5 %) con estudio densitométrico, método de dispersión dinámica de la luz y el potencial Z. Los resultados obtenidos permitieron seleccionar el medio IVI empleado por el Instituto de Veterinaria de Irán para el cultivo de enterobacterias para la obtención de vesículas de membrana externa de *Salmonella* spp., por ser el medio donde se obtuvo mayor rendimiento en biomasa (11,4 g/L) y expresión proteica (21 bandas proteicas en electroforesis en gel de poliacrilamida).

Palabras clave: salmonella; *Salmonella* Typhimurium; vacunas; medios de cultivo; detergentes.

Introducción

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias Gram negativas del género *Salmonella*, mayormente pertenecientes a la subespecie *entérica* de la especie *Salmonella entérica* y afecta tanto al hombre como a algunos animales.⁽¹⁾ Alrededor de 93 millones de personas son infectadas por bacterias del género *Salmonella* y 155.000 mueren por este patógeno cada

año.⁽²⁾ Actualmente sólo existen vacunas licenciadas para uso en humanos contra *Salmonella* Typhi, entre ellas, las vacunas formuladas a partir de la cepa Ty21a confieren una marcada protección cruzada contra *Salmonella* Paratyphi B,⁽³⁾ quedando sin cobertura las demás serovariedades patógenas para el hombre. Este aspecto, unido a la creciente emergencia de cepas con fenotipo de multirresistencia a antibióticos,⁽⁴⁾ ha hecho

* Licenciada en microbiología. Especialista de alta calificación E. Instituto Finlay de Vacunas. La Habana, Cuba.

necesario el desarrollo de estrategias vacunales para uso en humanos.

Se ha demostrado en estudios en ratones, que la inmunización con vesículas de membrana externa (VME) de *Salmonella* induce respuesta de células T y B específicas, confiriendo protección contra la exposición al patógeno.⁽⁵⁾ Estas propiedades inmunogénicas conllevan al desarrollo de respuestas protectoras de anticuerpos en las mucosas y otros sistemas. Lo anterior, sumado a la existencia de vacunas licenciadas para uso en humanos basadas en VME, como Bexsero® (licenciada en el 2013 por Novartis, actualmente perteneciente a GlaxoSmithKline)⁽⁶⁾ y VA-MENGOC-BC® (desarrollada por el Instituto Finlay de Vacunas)⁽⁷⁾ específicas para *Neisseria meningitidis* serogrupo B, sugieren el desarrollo de vacunas basadas en VME como una plataforma atractiva para la obtención y desarrollo de vacunas contra *Salmonella* spp.

Las proteínas de membrana externa usualmente son inmunogénicas por lo que representan dianas atractivas para el desarrollo de vacunas,⁽⁸⁾ pero su expresión muchas veces está condicionada por varios factores en el entorno donde crece la bacteria como la temperatura, el pH y los nutrientes.⁽⁹⁾ Con este trabajo se pretende seleccionar un medio de cultivo que favorezca la expresión de proteínas en la superficie celular de la bacteria y de esta forma obtener VME de *Salmonella* spp. que presenten un gran número de estructuras antigénicas.

Materiales y Métodos

Evaluación del crecimiento de la cepa ATCC-14028 de *Salmonella* Typhimurium en cinco medios de cultivo

Se cultivó la cepa ATCC - 14028 de *Salmonella* Typhimurium en los medios: Caldo nutriente (CN), Luria Bertani (LB), Caldo peptona de caseína-peptona de harina de soja (CASO), Caldo cerebro-corazón (CCC) y un medio líquido preparado por componentes, empleado por el Instituto de Veterinaria de Irán (IVI).⁽¹⁰⁾ Se realizaron tres ensayos con réplicas en cada proceso. Los cultivos se realizaron a escala de 2 L, en zaranda (INFORS HT, Suiza) termostatada a 37 °C/180 rpm. Al inicio del cultivo y cada 1 h hasta el final del mismo, se

monitorearon la velocidad específica de crecimiento (μ) mediante espectrofotometría (SPECTROstar^{Nano}, Alemania), la concentración celular haciendo uso de la Ley de Lambert a 530 nm y la viabilidad por el método de minicuento; se estableció como criterio de parada valores de $\mu = 0$. Finalizados los cultivos, se determinó el peso húmedo de la biomasa obtenida y se calculó el rendimiento obtenido en cada medio. Finalmente se seleccionaron los dos medios donde se obtuvo mayor rendimiento en biomasa expresado en g/L, para la obtención y purificación de las VME y su posterior caracterización en cuanto a composición proteica.

Obtención y purificación de las VME a partir del cultivo de la cepa ATCC-14028 de *Salmonella* Typhimurium en los medios IVI y CASO

Se cultivó la cepa ATCC-14028 de *Salmonella* Typhimurium en los medios IVI y CASO, empleando los mismos parámetros (temperatura, agitación, volumen, etc) del ensayo anterior. Posteriormente se determinó el peso húmedo de la biomasa sedimentada por centrifugación obtenida en cada medio y se resuspendió empleando un tampón compuesto por tris (hidroximetil) aminometano (Tris), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y cloruro de sodio (NaCl); pH 8,5. Una vez resuspendidos y mantenidos en baño frío (4 - 6 °C), se les añadió desoxicolato de sodio (DOC) al 10 % con ayuda de una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech P-1, Suecia) y se mantuvieron en incubación fría durante 2 h con agitación moderada. Transcurridas las 2 h de incubación, se ultracentrifugó (Beckman, USA) la muestra durante 20 min/40.000 rpm (75,000 x g)/4 °C y se colectó el sobrenadante. Al mismo, se le realizó ultrafiltración tangencial mediante un sistema de Sartocoon Slide empleando membranas de 0,1 m² de área de filtración y de 0,2 μ m de porosidad (Sartorius-Stedim, Alemania), realizando lavados con tampón 30 mM Tris - 2 mM EDTA - 100 mM NaCl - 0,5 % DOC; pH 8,5. Se midió el volumen final del microfiltrado y se duplicó el volumen con tampón 30 mM Tris - 2 mM EDTA - 100 mM NaCl; pH 8,5. La muestra se mantuvo en incubación por 24 h/6 °C. Posterior a la incubación, se concentró la muestra en sistema Sartocoon Slide 200 a un volumen aproximado de 390 mL, realizando lavados

con el mismo tampón en que se encontraba la muestra. Seguidamente se ultracentrifugó durante 4 h/40.000 rpm (75.000 x g)/4 °C, se desechó el sobrenadante, se añadió tampón 30 mM Tris - 2 mM EDTA - 100 mM NaCl, pH 8,5 y se mantuvo en agitación moderada a 4 °C hasta la total resuspensión del sedimento. La muestra se conservó a 6 °C hasta su utilización.

Caracterización físico-química de las VME obtenidas a partir del cultivo de la cepa ATCC-14028 de *Salmonella* Typhimurium en los medios IVI y CASO

Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de las partículas en suspensión se midió a una temperatura de 25 °C mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz utilizando un Malvern ZetaSizer Nano S (Malvern Instruments Ltda., EE.UU), equipado con un láser He-Ne de 4 mW (633 nm) y un correlacionador logarítmico digital. Las funciones de correlación de intensidad normalizada se detectaron en un ángulo de 173°. El tiempo de medición fue de 10 s. Se realizaron tres mediciones, las cuales fueron repetidas 15 veces. Los valores promedios del tamaño de las partículas se analizaron por los gráficos de Intensidad, Volumen y Número. Las muestras se diluyeron en agua purificada a una concentración de proteínas entre 0,1-1 mg/mL.

Determinación del potencial Z

El análisis para determinar el potencial Z se realizó en un analizador de partículas (Litesizer 500, Brazil). Las mediciones se realizaron en un ángulo de medición de 175°, con un tiempo de equilibrio de 1 min utilizando una cubeta de policarbonato (Omega Z, Mat.No.225288) con un volumen de muestra de 1 mL a una concentración de 0,5 mg/mL. Se empleó la aproximación de Smoluchowski. El voltaje fue ajustado automáticamente por el instrumento, con un voltaje máximo de 200 V. La calidad se configuró en el modo automático, con 1.000 corridas por medición. La serie de repeticiones consistió en tres mediciones consecutivas.

Cuantificación de proteínas totales contenidas en las VME

Se determinó la concentración de proteínas totales presentes en las VME, según la metodología descrita por Lowry,⁽¹¹⁾ para lo que se emplearon concentraciones entre 0,01 – 0,1 mg/mL de albúmina sérica bovina (Cephan Life Sciences, USA) como curva patrón y se leyó en espectrofotómetro (VWR®, EUA) a 750 nm.

Determinación del perfil proteico de las VME

El perfil proteico de las VME obtenidas se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12,5 %, ⁽¹²⁾ seguida de una tinción con azul Coomassie y determinación del peso molecular de las bandas mediante densitometría empleando el programa SynGene Gene Tools vs 3.08.03 y un patrón de peso molecular de bajo rango (Bio-Rad, EE.UU) compuesto por: fosforilasa B (97,4 kDa), albúmina sérica (66,2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina (21,5 KDa) y lisozima (14,4 KDa).

Resultados y Discusión

Evaluación del crecimiento de la cepa ATCC-14028 de *Salmonella* Typhimurium en cinco medios de cultivo

Los cinco medios ensayados mostraron un comportamiento muy similar. Todos presentaron una marcada fase de adaptación durante la primera hora, periodo de tiempo en que la bacteria modifica su maquinaria enzimática para adaptarse al medio.⁽¹³⁾ Transcurrida la primera hora, se comenzó a observar un incremento en los valores de Densidad óptica (DO) reflejando un aumento en el número de células. Los valores máximos de DO se alcanzaron hacia la tercera hora del cultivo donde se observó la fase exponencial bien marcada para los medios IVI, CASO y CCC, valores máximos de DO que se relacionan con los mayores valores de rendimiento en biomasa obtenidos, los que se muestran en la Figura 1. Estos resultados pudieron deberse a que estos medios contenían las mayores concentraciones de glucosa en su composición (3; 2,5 y 2 g/L respectivamente), sustrato que el

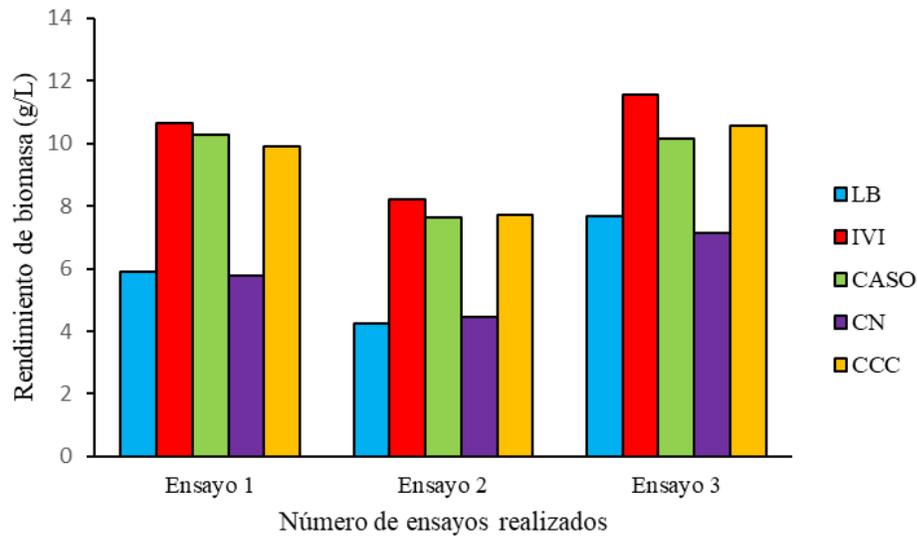


Fig. 1. Rendimiento de biomasa obtenido en cada medio de cultivo durante los tres ensayos realizados, expresado en g/L de peso húmedo. LB: Caldo Luria Berthani. IVI: Medio de cultivo empleado por el Instituto de Veterinaria de Irán para el cultivo de enterobacterias. CASO: Caldo de soja tripsínica de origen no animal. CN: Caldo Nutriente. CCC: Caldo cerebro-corazón.

microorganismo utiliza como principal fuente de carbono, que constituye un macronutriente indispensable para su crecimiento y multiplicación.⁽¹⁴⁾

Todos los cultivos alcanzaron valores de $\mu = 0$ transcurridas 4 h desde el inicio del cultivo. Los medios IVI, CASO y CCC mostraron los mayores valores de μ . Se consideró que el comportamiento de la bacteria en cada medio estuvo determinado directamente por la composición de los medios, pues fue la única variable dentro de cada ensayo. El medio IVI, seguido del caldo CASO destacaron por los altos rendimientos en biomasa y valores máximos de μ , por lo que se seleccionaron ambos medios para la obtención de vesículas y evaluar el contenido proteico de las mismas.

Obtención y purificación de las VME a partir del cultivo de la cepa ATCC-14028 de *Salmonella Typhimurium* en los medios IVI y CASO

Durante este ensayo, los cultivos en medio CASO e IVI confirmaron la posibilidad de obtener altos rendimientos de biomasa en ellos, siendo mayor en el medio IVI donde se alcanzaron rendimientos en biomasa > 6 g/L y un rendimiento en la purificación de VME ligeramente mayor con respecto a los valores obtenidos en el medio CASO, tal y como se muestra en la Tabla 1. Los resultados obtenidos durante la obtención y purificación de las vesículas se corresponden con los de otros autores, quienes describen al DOC como uno de los detergentes más efectivos para la extracción de proteínas de membrana

Tabla 1. Rendimiento en biomasa y purificación de vesículas, obtenidos en cada medio ensayado.

Ensayo	Medio de cultivo	Volumen de cultivo (L)	Biomasa total (g)	Rendimiento del cultivo (g/L)	Rendimiento de purificación de VME (mg/mL)
1	CASO	2	10,45	5,23	2,04
	IVI	2	13,31	6,66	2,45
2	CASO	2	11,86	5,93	2,40
	IVI	2	14,26	7,13	2,95

VME: vesículas de membrana externa. CASO: Medio Caldo peptona de caseína-peptona de harina de soja. IVI: medio de cultivo preparado por componentes y empleado por el Instituto de Veterinaria de Irán para el cultivo de enterobacterias.

externa de bacterias Gram negativas como *Neisseria meningitidis*,⁽¹⁵⁾ y su purificación mediante la ultrafiltración (UF) tangencial, ya que los dispositivos UF de flujo tangencial exhiben características altamente predecibles de rendimiento y velocidad, que son beneficiosos especialmente para el desarrollo de vacunas.⁽¹⁶⁾

Caracterización físico-química de las VME obtenidas en los medios IVI y CASO

Determinación del tamaño de partícula

Las vesículas obtenidas tuvieron una media de tamaño en el rango de 19,5 - 180 nm para el medio IVI y 14,3 - 159,5 nm para el medio CASO, como se muestra en la Tabla 2. Estos valores sugieren que se encuentran agrupadas en poblaciones de partículas heterogéneas que varían en el rango de 10 a 200 nm, tamaños de partículas que indican la presencia de estructuras nanoparticuladas concordando con las dimensiones de VME reportadas por algunos autores; tal es el caso de las obtenidas a partir de *Neisseria meningitidis* serogrupo B con

tamaños entre 50 - 200 nm.⁽¹⁷⁾ Las VME extraídas de *Vibrio cholerae* O1 poseen variedad en sus tamaños, estos pueden oscilar entre 150 - 200 nm.⁽¹⁸⁾ También las VME derivadas de *Bordetella pertussis* pueden estar entre los 70 - 230 nm y, de igual forma, sucede con los tamaños de las vesículas obtenidas de *Shigella sonnei*, las cuales están entre 100 - 200 nm.⁽¹⁹⁾ En 2009, se aislaron y analizaron las VME de *Staphylococcus aureus* mediante espectrometría de masas, observando vesículas con un rango de tamaños de 20 a 100 nm.⁽²⁰⁾

Determinación del potencial Z

El potencial Zeta es un indicador crítico de las interacciones electrostáticas entre partículas en dispersión.⁽²¹⁾ Valores altos de potencial Zeta $> \pm 30$ mV se asocian con la estabilidad, ya que reducen la formación de agregados en las nanoformulaciones mediante repulsión electrostática.⁽²²⁾ Se ha demostrado que en formulaciones con VME, - 20 mV constituye el valor límite identificado por encima del cual se compromete la estabilidad de las vesículas en soluciones.⁽²³⁾

Tabla 2. Tamaño de partícula determinado por el método de dispersión dinámica de la luz para las vesículas de membrana externa obtenidas a partir del cultivo de la cepa ATCC-14028 en los medios IVI y CASO .

Ensayo	Muestras	Rango del tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersión (%)
1	VME obtenida en medio CASO	14,6 - 166	18,3
	VME obtenida en medio IVI	14 - 153	15,2
2	VME obtenida en medio CASO	25 - 180	16,7
	VME obtenida en medio IVI	14 - 180	15,8

VME: vesículas de membrana externa. CASO: medio Caldo peptona de caseína-peptona de harina de soja. IVI: medio de cultivo preparado por componentes y empleado por el Instituto de Veterinaria de Irán para el cultivo de enterobacterias.

En nuestro estudio, las VME obtenidas en medio CASO mostraron valores promedios entre -16,12 mV y -17,02 mV, mientras que las VME obtenidas en medio IVI arrojaron valores entre -25,29 mV y -23,69 mV. Estos resultados sugieren un comportamiento favorable para las VME obtenidas a partir del cultivo en medio IVI. Otros autores, sugieren el empleo del tampón 30 mM Tris - 2 mM EDTA, pH 8,5 para la resuspensión de

VME de otras enterobacterias, pero no reportan el valor de potencial Z obtenido en este tampón.⁽¹⁹⁾

Evaluación del contenido proteico en las VME

Se obtuvieron concentraciones proteicas entre 4,1 - 4,8 mg para las VME obtenidas a partir del cultivo en medio CASO, mientras que las vesículas obtenidas a partir del cultivo en el medio IVI mostraron una concentración

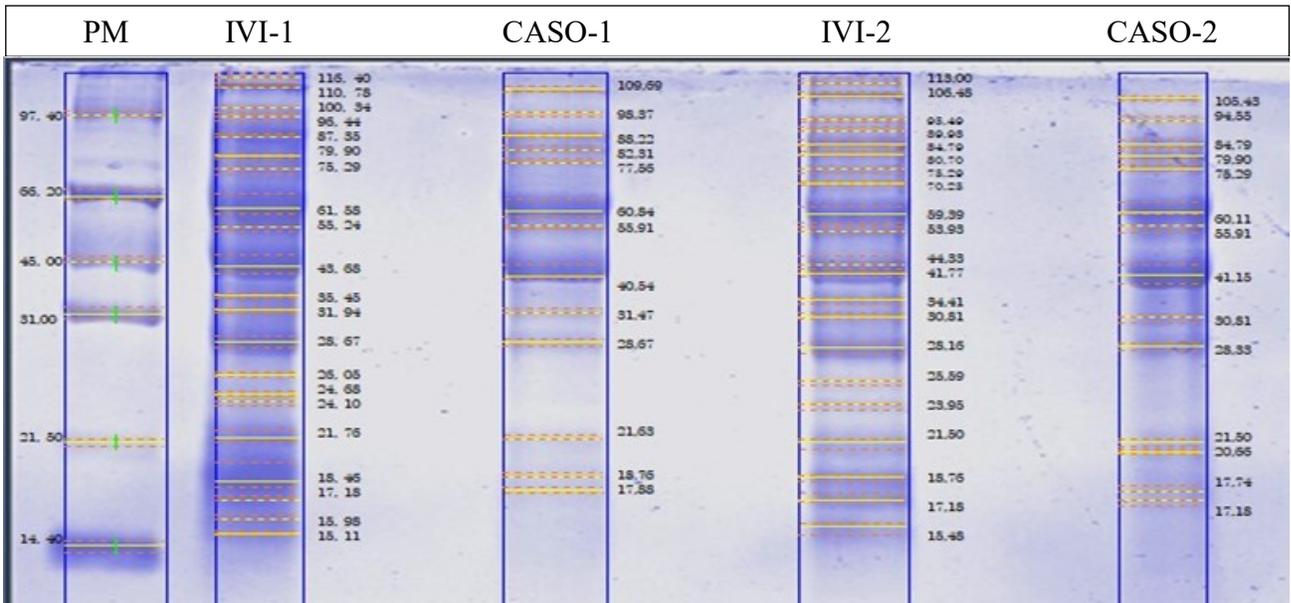


Fig. 2. Perfil proteico en condiciones no reductoras (SDS-PAGE; 12,5 %) y densitometría de las bandas proteicas de las VME de la cepa ATCC-14028 de *Salmonella* Typhimurium cultivada en medio IVI y CASO. PM: Patrón de peso molecular de bajo rango. IVI-1: OMV de *Salmonella* Typhimurium en medio del IVI (Ensayo 1). CASO-1: OMV de *Salmonella* Typhimurium en medio CASO (Ensayo 1). IVI-2: OMV de *Salmonella* Typhimurium en medio del IVI (Ensayo 2). CASO-2: OMV de *Salmonella* Typhimurium en medio CASO (Ensayo 2).

mayor de proteínas totales, exhibiendo valores entre 4,95 - 5,9 mg.

Estos resultados se corresponden con la determinación del perfil proteico de las vesículas mediante SDS-PAGE, donde se observó un mayor número e intensidad de bandas proteicas para las vesículas obtenidas en el medio IVI (21 bandas proteicas) con relación a las vesículas obtenidas a partir del cultivo en medio CASO (13 bandas proteicas), como se muestra en la Figura 2.

Dado que entre ensayos la única variable fue la composición de los medios, estos resultados sugieren que el medio IVI brinda condiciones que favorecen la expresión de proteínas por parte de *Salmonella*, con respecto al medio CASO.

Atendiendo al peso molecular de las bandas identificadas por densitometría, se pudiera pensar en la inclusión en las VME obtenidas a partir del cultivo en el medio IVI, de algunas porinas de *Salmonella* Typhimurium con actividad inmunogénica reportadas en la literatura como: OmpD (34-40 kDa), OmpF (35 kDa) y OmpC (36 kDa).⁽⁹⁾

Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron la selección del medio IVI para el cultivo de enterobacterias para la obtención de vesículas de membrana externa de *Salmonella spp.*, por ser el medio donde se obtuvo mayor rendimiento en biomasa (11,4 g/L) y expresión proteica (21 bandas proteicas en SDS-PAGE).

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Laura Remedios-Jiménez: elaboración y redacción del diseño experimental, obtención y purificación de las VME, caracterización de las VME, procesamiento y análisis de datos, análisis de resultados, redacción y revisión.

Arbell Lemus-Cortés: purificación de las VME, caracterización de las VME, procesamiento de datos.

Elizabeth López-León: participó en la realización de los

experimentos.

Jennifer Fernández-Lorenzo: caracterización de las VME.

Nadiezda Baños-Paiffer: elaboración del Lote de Trabajo de la cepa ATCC-14028.

Bárbara Baró-Vicet: caracterización de las VME.

Olivia Martínez-Armenteros: caracterización de las VME.

Danays Vidal-Rosell: caracterización de las VME, análisis de resultados.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Parra M, Durango J, Máttar S. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por salmonella. *Revista MVZ Córdoba*. 2002;7(2):187-200. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69370201>. (Consultado en línea: 15 abril 2024).
2. Guillín Y, Cáceres M, Torres R, Stashenko E, Ortiz C. Effect of Essential Oils on the Inhibition of Biofilm and Quorum Sensing in *Salmonella enteritidis* 13076 and *Salmonella typhimurium* 14028. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(10):1191. doi: <https://10.3390/antibiotics10101191>.
3. Wahid R, Simon R, Zafar SJ, Levine MM, Sztein MB. Live oral typhoid vaccine Ty21a induces cross-reactive humoral immune responses against *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A and S. Paratyphi B in humans. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(6):825-34. doi: <https://10.1128/CVI.00058-12>.
4. de Toro M, Seral C, Rojo-Bezares B, Torres C, Castillo FJ, Sáenz Y. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella entérica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(1):4-10. doi: <https://0.1016/j.eimc.2013.03.006>.
5. Alaniz RC, Deatherage BL, Lara JC, Cookson BT. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J Immunol*. 2007;179(11):7692-701. doi: <https://10.4049/jimmunol.179.11.7692>.
6. Watson PS, Turner DP. Clinical experience with the meningococcal B vaccine, Bexsero[®]: Prospects for reducing the burden of meningococcal serogroup B disease. *Vaccine*. 2016;34(7):875-80. doi: <https://10.1016/j.vaccine.2015.11.057>.
7. Ochoa-Azze RF. VA-MENGOC-BC[®]: XXV años de su aplicación masiva. *Vaccinmonitor*. 2013;22(1):1-3. Disponible en: <https://vaccinmonitor.finlay.edu.cu/index.php/vaccinmonitor/article/view/53>. (Consultado en línea: 15 abril 2024).
8. Yang TC, Ma XC, Liu F, Lin LR, Liu LL, Liu GL, et al. Screening of the *Salmonella paratyphi* A CMCC 50973 strain outer membrane proteins for the identification of potential vaccine targets. *Mol Med Rep*. 2012;5(1):78-83. doi: <https://10.3892/mmr.2011.587>.
9. Pérez-Toledo M, Martínez-Amador PA, Pastelin-Palacios R, Isibasi A, Cunningham AF, López-Macías C. La porina OmpD de *Salmonella Typhimurium* induce altos títulos de anticuerpos de larga duración: implicaciones en el desarrollo de vacunas contra la salmonelosis no tifoídica. *Gac Med Mex*. 2016; 152:5-13. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2016/gms162a.pdf>. (Consultado en línea:15 abril 2024).
10. Jang H, Yoon YK, Kim JA, Kim HS, An SJ, Seo JH, et al. Optimization of Vi capsular polysaccharide production during growth of *Salmonella enterica* serotype Typhi Ty2 in a bioreactor. *J Biotechnol*. 2008;135(1):71-7. doi: <https://10.1016/j.jbiotec.2008.02.017>.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
13. Izquierdo-Fiallo K, Guerra-Peña Y, Remedios-Jiménez L, Lemus-Cortés A, Burguet-Batista A, Perez-Quinoy JL. Estudio de consistencia de un cultivo en zaranda de *Streptococcus pneumoniae* 19A a escala de 40L. *VaccinMonitor*. 2020; 29(2):47-50. Disponible en: <https://vaccinmonitor.finlay.edu.cu/index.php/vaccinmonitor/article/view/234>. (Consultado en línea: 15 abril 2024).
14. Madigan TM, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. *Brock Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Educación SA; 2015.
15. Helting TB, Guthöhrlein G, Blackkolb F, Ronneberger H. Serotype determinant protein of *Neisseria Meningitidis*. Large scale preparation by direct detergent treatment of the bacterial cells. *Acta Pathol Microbiol Scand C*. 1981;89(2):69-78.
16. Christy C, Rubin D. Selecting the Right Ultrafiltration Membrane for Biopharmaceutical Applications Ultrafiltration. *PharmTechnol Eur*. 2002; 14 (12): 41-5. Disponible en: <https://www.pharmtech.com/view/selecting-right-ultrafiltration-membrane-biopharmaceutical->

applications. (Consultado en línea: 15 abril 2024).

17. Holst J, Martin D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, Rosenqvist E. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 2:B3-12. doi: <https://10.1016/j.vaccine.2009.04.071>.

18. Pérez JL, Acevedo R, Callicó A, Fernández Y, Cedré B, Año G, et al. A proteoliposome based formulation administered by the nasal route produces vibriocidal antibodies against El Tor Ogawa *Vibrio cholerae* O1 in BALB/c mice. *Vaccine*. 2009;27(2):205-12. doi: <https://10.1016/j.vaccine.2008.10.052>.

19. Padrón-Collazo MA, Martínez-Cabrera I, Wheeler J, Nisar S, Riverón-Martínez LA, Martínez-Pozo ME, et al. Caracterización proteómica de vesículas de membrana externa extraídas de *Shigella sonnei*. *Vaccinmonitor*. 2017; 26(3):70-80. Disponible en: <https://vaccinmonitor.finlay.edu.cu/index.php/vaccinmonitor/article/view/185>. (Consultado en línea: 15 abril 2024).

20. Bitto NJ, Cheng L, Johnston EL, Pathirana R, Phan TK,

Poon IKH, et al. Staphylococcus aureus membrane vesicles contain immunostimulatory DNA, RNA and peptidoglycan that activate innate immune receptors and induce autophagy. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(6):e12080. doi: <https://10.1002/jev2.12080>.

21. Kaszuba M, Corbett J, Watson FM, Jones A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2010;368(1927):4439-51. doi: <https://10.1098/rsta.2010.0175>.

22. Onugwu AL, Nwagwu CS, Onugwu OS, Echezona AC, Agbo CP, Ihim SA. Nanotechnology based drug delivery systems for the treatment of anterior segment eye diseases. *J Control Release*. 2023;354:465-88. doi: <https://10.1016/j.jconrel.2023.01.018>.

23. Batalla J, Cuadros A, San Martín-Martínez E. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Lat Am J Phys Educ*. 2014;8(4):43191-6. Disponible en: http://www.lajpe.org/dec14/4319_San_Martin.pdf. (Consultado en línea: 15 abril 2024).

Selection of a culture medium to obtain outer membrane vesicles of *Salmonella* spp.

Abstract

Salmonellosis is an infectious disease caused by Gram negative bacteria of the *Salmonella* genus. Currently there are only vaccines licensed for use in humans against *Salmonella* Typhi. Reports in the literature about outer membrane proteins of *Salmonella* spp. with immunogenic activity and the existence of licensed vaccines based on outer membrane vesicles against other Gram-negative bacteria such as *Neisseria meningitidis* B, support the feasibility of the development of vesicle-based vaccines against *Salmonella*. In order to select a culture medium to obtain outer membrane vesicles of *Salmonella* spp., in the present work the behavior of the *Salmonella* Typhimurium strain ATCC-14028 was evaluated in five culture media. Two media were selected according to the biomass yield and specific growth speed. From the culture of the bacteria in the selected media, outer membrane vesicles were obtained and purified using detergent extraction. They were characterized using an analytical battery: Lowry method, polyacrylamide gel electrophoresis (12.5 %) with densitometric study, dynamic light scattering method and Z potential. The results obtained allowed the selection of the medium IVI used by the Iranian Veterinary Institute for the culture of enterobacteria, to obtain outer membrane vesicles of *Salmonella* spp., as it is the medium where the highest yield was obtained in biomass (11.4 g/L) and protein expression (21 protein bands in polyacrylamide gel electrophoresis).

Keywords: salmonella; *Salmonella* Typhimurium; vaccines; culture media; detergents.

Recibido: 6 de enero de 2025

Aceptado: 10 de junio de 2025