

ARTÍCULOS ORIGINALES

Genes y plásmidos de la *Salmonella* spp. asociados con virulencia

Omar A Saldarriaga¹, MV, Est. de Maestría; Maria T Rugeles, Bact¹, MS, PhD.

¹Grupo de Inmunovirología¹- BIOGENESIS- Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, A 1226, Medellín, Colombia

(Recibido: 8 marzo, 2000; aceptado: 25 octubre, 2000)

Resumen

Las serovariedades de Salmonella, patógenos intracelulares gram negativos, afectan varias especies animales como las aves, los cerdos, los bovinos y el hombre. Después de la ingestión de alimentos o aguas contaminadas, la bacteria se localiza en la porción distal del intestino delgado donde hace contacto con la mucosa intestinal. Estos microorganismos requieren la expresión coordinada de muchos de sus genes para causar una infección productiva en su hospedero. La expresión se inicia cuando la Salmonella entra en contacto con el medio ambiente hostil que representa el tracto gastrointestinal del hospedero, donde encuentra una gran variedad de condiciones como: la osmolaridad, la tensión de oxígeno y el pH; que actúan como señales para que inicie la transcripción de genes que codifican factores de virulencia, los cuales favorecen la interacción con la célula blanco durante la patogénesis. La Salmonella utiliza, además, un sistema de secreción tipo III como un mecanismo básico de virulencia, este sistema es el encargado de translocar proteínas hacia el citosol, las cuales interfieren con las señales de transducción y otros procesos celulares, facilitando la patogénesis de la bacteria, algunos de estos genes han sido descritos y caracterizados mediante la obtención de mutantes in vitro, las cuales han mostrado defectos en ciertas características que parecen ser importantes para cumplir algunas funciones básicas y para la virulencia in vivo, por ejemplo: la capacidad para invadir células epiteliales en cultivo, la sobrevivencia dentro de células fagocíticas, la citotoxicidad de macrófagos, la regulación de la inflamación y la secreción de fluidos. Muchos de los genes que codifican estos factores de virulencia son regulados por sistemas presentes en especies patógenas y no patógenas. Algunas cepas de Salmonella contienen plásmidos que codifican genes de virulencia que están altamente asociados con bacteremia y con la diseminación de la infección. El conocimiento de los genes que conforman el genoma bacteriano, de las proteínas que codifican y de sus funciones, permitirá comprender mejor los mecanismos de patogenicidad de estos microorganismos para generar conocimiento que permita prevenir exitosamente estas infecciones.

Palabras Clave: Genes, Plásmidos, *Salmonella* spp, Virulencia.

Introducción

Las *Salmonella* spp son patógenos intracelulares facultativos, gram negativos, de 2 a 4 micras de longitud, tienen flagelos y fimbrias a excepción de la *S. pullorum-gallinarum*, la cual es inmóvil. Los tipos de enfermedades causadas por estos microorganismos

dependen tanto de la especie o serotipo infeccioso, como del hospedero infectado. Así, mientras algunas especies están específicamente adaptadas a un hospedero particular, como la *S. typhi* en humanos, la *S. pullorum* en aves, la *S. dublin* en bovinos y la *S. arizonae* en reptiles; otras especies, como la *S. enteritidis*, la *S. typhimurium* y la *S. choleraesuis*,

exhiben un amplio rango de hospederos y causan diferentes patrones de enfermedad. Por ejemplo: la *S. typhimurium*, en muy bajas dosis infectantes, causa una enfermedad sistémica y letal en ratones susceptibles, mientras en humanos, altas dosis causan una gastroenteritis autolimitada (17).

Inicialmente la infección se origina por la ingestión de alimentos o agua contaminados. Después de pasar por el estómago, la bacteria se localiza en la porción distal del intestino delgado haciendo contacto con la mucosa intestinal. Luego, la bacteria atraviesa el epitelio intestinal ayudada por las células M o transmigra a través de las células epiteliales columnares del intestino, causando cambios transitorios profundos en la arquitectura de los enterocitos (14), para llegar hasta la lámina propia en donde hace su primer contacto con células del sistema monocito/macrófago y polimorfonucleares que pueden fagocitar, pero no necesariamente destruir la bacteria, favoreciendo la diseminación a otros órganos como los nódulos linfoides, el bazo y el hígado (11, 36).

Los patógenos bacterianos, requieren de la expresión coordinada de muchos de sus genes para causar una infección productiva en el hospedero. Esta expresión se inicia cuando la *Salmonella* entra en contacto con el medio ambiente hostil que representa el tracto gastrointestinal del hospedero, donde encuentra una gran variedad de condiciones medioambientales que le sirven como señales para que inicie la transcripción de genes que codifican factores de virulencia que le ayudarán en la interacción con la célula blanco durante su patogénesis (36). En el presente artículo se revisarán algunos de los aspectos relacionados con la expresión de genes y plásmidos de virulencia, de la *Salmonella*, que han sido ampliamente estudiados en los modelos murino, bovino y en cultivos celulares in vitro, con el fin de entender los mecanismos de patogénesis que se dan cuando la *Salmonella* interactúa con un hospedero susceptible. Para este efecto se hizo una recopilación del tema utilizando artículos originales y revisiones previas.

Genes de virulencia de las especies de *Salmonella*

La baja tensión de oxígeno y la hiperosmolaridad, parecen ser las mayores señales medio ambientales que controlan la expresión de estos genes. Dos de ellos, el *pgrH* y el *invG*, necesarios para la invasión,

son expresados óptimamente a un pH de 6.5 y su expresión disminuye cuando el pH baja a 5.0; rango de pH que puede ser encontrado cuando la bacteria pasa por el estómago o dentro de los endosomas o fagolisosomas del macrófago (29,12).

La mayoría de los genes relacionados con la virulencia han sido descritos y caracterizados por medio del aislamiento de mutantes in vitro. Estas mutantes, han demostrado defectos de ciertas características que parecen ser importantes para la virulencia *in vivo*, como por ejemplo:

- Los genes *hil* (30,15), *inv* (13,14,46,43), *spa* (15) y *lpf* (1) determinan la capacidad para invadir células epiteliales cultivadas.
- Los genes *mgtC* (2) y *pagC* (24) juegan un papel importante en la sobrevivencia dentro de células fagocíticas.
- Los genes *sip*, *spa* e *inv* (7) controlan la citotoxicidad sobre los macrófagos.
- Las proteínas *sop* (27,37) regulan la inflamación y secreción de fluidos.
- Los genes *ivi* (21), solo se expresan durante la infección in vivo.

La interacción de la *Salmonella* con las células del hospedero es determinada por factores que están localizados sobre la superficie de la bacteria o que son «secretados» hacia el espacio extracelular. La secreción describe el transporte activo de proteínas desde el citoplasma bacteriano a través de las membranas internas y externas hacia la superficie bacteriana o hacia el sobrenadante. Las proteínas bacterianas secretadas son diversas y exhiben una amplia variedad de funciones tales como: proteólisis, hemólisis y pueden inducir citotoxicidad, fosforilación y desfosforilación de proteínas. En bacterias gram negativas se han descrito cinco sistemas para la secreción de proteínas (tipo I, II, III, IV, V). Estos sistemas están altamente involucrados con la patogénesis de la bacteria, la cual requiere del sistema de secreción para la virulencia. La *Salmonella* es la única especie descrita que contiene dos sistemas de secreción tipo III, codificados por dos grupos de genes de patogénesis: el *SPI-1* y el *SPI-2*. Estos grupos de genes codifican unidades funcionales completas y su incorporación dentro de una cepa benigna puede convertirla en patogénica. El producto de los genes codificados por *SPI-1*, como por ejemplo los genes *invJ*, los *spa*, los *sip* y los *AvrA*, son requeridos para la

penetración inicial de la mucosa intestinal. Los productos de los genes codificados por *SPI-2*, aunque no han sido claramente estudiados, se plantea que son necesarios para el desarrollo sistémico de la infección (25).

El papel de los genes *SPI-1* en ratones esta restringido a las etapas tempranas de la infección y su expresión es requerida para la invasión de las células M (26). Además, el tropismo de la *S. typhimurium* por las células M parece ser mediado por los genes *lpf*, los cuales, codifican las fimbrias específicas de cada especie, sugiriendo, que *SPI-1* y *lpf* funcionan sinérgicamente durante la invasión de la barrera intestinal (1). Este grupo de genes *SPI-1*, también regula un efecto citotóxico sobre macrófagos murinos derivados de médula ósea y sobre la línea de macrófagos J774.A. De hecho, se ha demostrado que la mutación de varios genes como, *invJ*, *SpaO*, *sipB*, *sipC* y *sipD*, incapacitaron las bacterias para inducir citotoxicidad del macrófago (7). Adicional al papel en la invasión de las células epiteliales, las proteínas de secreción *sipB* son requeridas para la apoptosis de macrófagos cultivados. (23).

El contacto de la *S. typhimurium* con cultivos de células epiteliales, resulta en el ensamblaje de apéndices de superficie bacterianos denominados invasomas, los cuales probablemente son requeridos para la internalización de la bacteria por la célula hospedera. El ensamblaje de esta estructura, requiere la función del locus *inv*, del cual hacen parte los genes *invA*, *invB*, *invC* e *invD* que fueron los primeros en ser clonados y caracterizados (13). Luego, el gen *invE* fue caracterizado y se demostró que cepas de *S. typhi*, *S. gallinarum*, *S. enteritidis* y *S. dublin* que tenían mutaciones en este gen, aunque se adherían eficientemente, mostraban una marcada disminución de la invasión de células intestinales y de células MDCK, (células de riñón canino). Así mismo, estas mutantes fueron deficientes en inducir los eventos intracelulares que permiten la internalización; los cuales incluyen: un incremento del calcio intracelular, la redistribución de los microfilamentos de actina y cambios en la estructura normal de las microvellosidades (14). Recientemente, se identificó la proteína de invasión *InvJ*, después de poner en contacto la bacteria con células epiteliales intestinales humanas (línea Henle 407), la que es necesaria para la entrada de la bacteria a la célula eucariótica. Las mutantes defectuosas en los genes *invC*, *invG*, pero no en los *invE*, previ-

nieron el ensamblaje del invasoma y por lo tanto se redujo drásticamente la entrada de la Salmonella a la célula hospedera (46).

Una cepa de *Salmonella typhimurium* con mutación en el gen *invH* mostró una disminución significativa en la invasión de células MDCK y de cultivos primarios derivados de intestino bovino, de donde se recuperaron bacterias en baja cantidad asociadas con la capa de enterocitos. Por el contrario, las cepas silvestres de *S. typhimurium* y *S. dublin*, fueron recuperadas de la lámina propia, invasión que se relacionó con el daño del íleon bovino (43).

El locus de hiperinvasión *hil*, es también esencial para la invasión de las células epiteliales. Con la delección de este locus, se observó una disminución en la habilidad para invadir células HEP-2, comparada con la cepa parental (30). En varios aislamientos de cepas medioambientales de Salmonella, las cuales tenían una delección de los loci, *inv*, *spa* y *hil* (15), se demostró una marcada deficiencia en la habilidad para entrar a las células epiteliales, confirmando la importancia de estos genes en el genotipo invasivo.

El sistema de secreción tipo III codificado por el grupo de genes *SPI-1*, también juega un papel importante en la inducción de la inflamación del epitelio intestinal por la Salmonella, ya que cepas mutantes, defectuosas en algunos genes que regulan la invasión epitelial, fallaron para inducir la migración transepitelial del PMN al subepitelio (35,27), migración necesaria para que se desarrolle una respuesta inflamatoria.

Recientemente se encontró un nuevo grupo de genes de patogenicidad en la *S. typhimurium*, en el locus *selC*, donde se encuentra el gen *mgtC* requerido para la sobrevivencia dentro del macrófago y el crecimiento en condiciones deficientes de magnesio (Mg). La proteína *mgtC*, probablemente transportadora de magnesio, es controlada por el sistema regulador de las funciones de virulencia *PhoP/PhoQ*, el cual esta presente en especies patogénicas y no patogénicas (2,21,24).

La mutación del gen de la metilasa de adenina (*Dam*), que en una cepa de *S. typhimurium* regula la expresión de al menos 20 genes que solo se inducen in vivo (genes *ivi*), produjo severos defectos en la colonización de tejidos profundos. Las cepas mutadas para *Dam* presentan una reducción de la expresión

de genes: los *spvB*, que están codificados por un plásmido y facilitan el desarrollo sistémico de la infección, los genes *pmrB* que están involucrados en la resistencia a péptidos antibacteriales como las defensinas y los genes *mgtA*, los cuales están implicados en el transporte de magnesio. Lo anterior determina que esta metilasa de adenina, que es altamente conservada entre muchas bacterias patógenas, sea esencial para la patogénesis bacterial. De esta manera *Dam* y *PhoP* constituyen una red reguladora que controla la virulencia de la *Salmonella* (22).

Entre los cambios patológicos inducidos por la *Salmonella*, se encuentra la alteración del movimiento normal de líquidos y electrolitos en el intestino, acompañado por una secreción de fluidos al lumen intestinal, lo cual conlleva a una enteritis. Se ha determinado que la *S. typhimurium* induce una mayor respuesta secretoria e inflamatoria en el íleon bovino que la *S. dublin*. Cuando se indujeron mutaciones del gen de virulencia *invH* en la *S. typhimurium*, se redujeron significativamente estas respuestas, resultando en una disminución de la severidad de la enteritis. Esta mutación previno la secreción de varias proteínas *Sip*; entre ellas, *SipC* que es secretada por el sistema de secreción proteico tipo III, lo cual sugiere la participación de este sistema en la enteritis del bovino inducida por esta bacteria (44).

La proteína *AvrA*, secretada por bacterias de esta misma especie, quizá pueda ayudar a asegurar que la infección de ciertos serotipos de *Salmonella* permanezcan localizados en algún compartimento como el tracto intestinal (20).

Varias de las proteínas secretadas por la *Salmonella* son homólogas a otras proteínas invasoras de otros géneros bacterianos como la *Shigella* y la *Yersinia*, (7). Una de las proteínas secretadas por la *Yersinia*, la *YopE*, homóloga a *sipB* de la *S. typhimurium*, fue introducida en un plásmido, el cual se utilizó para transfectar la *Salmonella typhimurium* silvestre. Esta cepa secretó la proteína y mostró una citotoxicidad sobre las células HeLa, dependiente de la cantidad de proteína translocada al citosol de la célula infectada. Muchas de las proteínas secretadas por el sistema tipo III, en diferentes bacterias gram negativas, requieren proteínas accesorias citoplásmicas (Chaperonas), las cuales se unen a proteínas secretadas individualmente, probablemente previniendo su degradación. Se propone entonces que la

Salmonella libera moléculas efectoras virulentas hacia la célula blanco, utilizando una maquinaria de translocación y secreción conservada en varias serovariedades (38).

Se ha demostrado que la expresión de proteínas secretadas por *Salmonella*, como las invasinas *sipB* y *sipC*, sobre la superficie de la célula hospedera, resulta en la inhibición de la invasión bacterial (4).

En otras serovariedades como la *Salmonella dublin*, se ha determinado la secreción de al menos otras cinco proteínas las cuales han sido denominadas desde *sopA* hasta *sopE*. Una de estas proteínas, la *sopB*, tiene una secuencia homóloga a una fosfatasa de inositol polifosfato. Se propone que esta proteína hidroliza el fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato que es un mensajero que inhibe la secreción de cloro. La sustitución de una cisteína conservada en esta proteína suprime la actividad fosfatasa y esta mutante, presenta una disminución en la habilidad para inducir la secreción de fluidos en el intestino de terneros infectados, sugiriendo que en las cepas silvestres, *sopB* regula su virulencia interviniendo sobre las vías de señalización del inositol fosfato (37).

SopD, es transportada hacia la célula eucariótica, lo cual probablemente regula la inflamación y la secreción de fluidos en la mucosa del íleon infectado, aunque no parece estar involucrada en la invasividad de la bacteria. *SopD* actúa en conjunto con *sopB* para promover esta respuesta. Se ha visto que las bacterias internalizadas pueden expresar estas proteínas de una manera más eficiente (27).

El segundo sistema de secreción tipo III, codificado por un segundo grupo de genes *SPI-2*, tiene un gran impacto en la virulencia de la *S. typhimurium* en el ratón. *SPI-2*, a diferencia de *SPI-1*, es requerido para la virulencia, después de que la bacteria ha penetrado eficientemente las células epiteliales, aunque el impacto celular y molecular de este sistema de secreción es desconocido, ya que los genes que son blanco de este sistema no han sido identificados (39).

Plásmidos de virulencia

Algunas cepas de *Salmonella*, que no producen fiebre tifoidea, contienen plásmidos de virulencia que están altamente asociados con bacteremia y con la diseminación de la infección. Estos plásmidos han

sido encontrados en serotipos de Salmonella adaptados a especies domésticas, tales como la *S. dublin*, la *S. choleraesuis* y la *S. pullorum*, en quienes producen una enfermedad diseminada. Los plásmidos de virulencia también han sido encontrados en *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, las cuales como ya se dijo, tienen un amplio rango de hospederos, en donde causan un síndrome gastroentérico y séptico. El tamaño de los plásmidos varía entre 50 y 100 kb, sugiriendo que estos difieren entre los serotipos, aunque todos contienen una región de 8-kb altamente conservada que contiene el locus *spv* (plásmido de virulencia de Salmonella), responsable del fenotipo de virulencia. Este locus codifica para el gen regulatorio *spvR*, que codifica un activador positivo de los siguientes 4 genes estructurales: *spvA, B, C, D* (19,18,16). Se ha demostrado que los genes *spvR* y *spvB* son esenciales para la virulencia en ratones, los genes *spvC* y *spvD* tienen funciones accesorias y son probablemente necesarios para una mayor virulencia, mientras que los genes *spvA* no son esenciales para la virulencia (18).

Los plásmidos de virulencia no son requeridos para que la bacteria invada las células epiteliales intestinales y las placas de peyer, como se ha determinado con los genes que conforman las regiones de patogenicidad, ya que se ha demostrado que cepas de *S. typhimurium* y *S. dublin* que no portan el plásmido de virulencia, son incapaces de causar una infección sistémica en terneros, aunque causan una severa enteritis (18). También se ha demostrado que las cepas que portan el plásmido inducen un infiltrado celular rico en neutrófilos, producen esplenomegalia, inmunosupresión y producen un incremento en la tasa de crecimiento bacteriana en ratones (19).

Los genes *spv* son transcritos desde dos regiones promotoras, una localizada corriente arriba de *spvR* y otra localizada entre *spvR* y *spvA* (18). Se ha propuesto que el grado de actividad del factor sigma (σ) *RpoS* de la RNA polimerasa, un regulador central de un gran número de genes en la fase de crecimiento estacionaria de la bacteria y otras condiciones inductoras, permiten el incremento de la expresión del regulador transcripcional *spvR*. *SpvR* y *RpoS* actúan en concierto en el promotor de *spvA* y rápidamente inducen la expresión de los genes *spvA, B, C*, y *D* (5). El sistema regulatorio mediado por el *RpoS* en la *S. typhimurium* es activado por el medio intracelular de la célula eucariótica (6).

La Salmonella debe ser internalizada para que los genes *spvA* sean inducidos eficientemente dentro de células epiteliales intestinales y en células peritoneales de ratones de manera dependiente de *SpvR* y *RpoS*. La baja expresión de los genes *spv* durante la fase de crecimiento estacionaria, en algunos casos, no es debida a una disminución global de la expresión génica, sino a una regulación específica de estos genes, en relación con la composición bioquímica del medio en que la bacteria se encuentre (45). Esta regulación parece entonces esencial para la sobrevivencia y replicación del microorganismo en el hospedero infectado.

El factor sigma *RpoS* puede también regular la expresión de otros genes de las *Salmonella spp* involucrados en la invasión como *invG* y *prgH*, en respuesta al pH, la osmolaridad y la fase de crecimiento en que se encuentre la bacteria (29). Además puede regular la expresión del gen *sodCI*, que codifica una superóxido dismutasa involucrada en la virulencia de la bacteria (10).

Los genes *spv*, son requeridos para la patogénesis de la infección en terneros jóvenes, donde se presenta una enteritis fibrinohemorrágica severa con destrucción de la arquitectura vellosa y una infección sistémica fatal con pequeños focos necróticos distribuidos al azar en el hígado. Estos genes promueven la proliferación intracelular en los tejidos intestinales y en sitios extraintestinales en el huésped natural (32).

Las cepas de *S. dublin*, que tienen el plásmido de virulencia, al igual que cepas que no lo poseen, tienen igual capacidad invasiva del epitelio absortivo y de las placas de peyer. Las respuestas secretoria e inflamatoria también son comparables; sugiriendo que los genes codificados por los plásmidos de virulencia no están asociados con la entero-patogénesis. Sin embargo, las cepas que portan el plásmido a diferencia de las cepas que no lo portan, persisten en otros órganos, como el hígado, bazo y nódulos linfoides (42).

Múltiples loci dentro de los plásmidos de virulencia de la Salmonella favorecen también la sobrevivencia de la bacteria en el hospedero. Por ejemplo, el locus *rck* del plásmido de virulencia de las cepas *S. typhimurium*, codifica una proteína de membrana externa que aumenta la habilidad de la bacteria para crecer en el suero, previniendo la formación e inserción del complejo de ataque a membrana del sistema del complemento (19).

Ya que los serotipos de *Salmonella* que contienen plásmidos son los mayores patógenos de los animales domésticos, cepas libres de plásmidos, podrían ser combinadas en una vacuna multivalente para el uso en ganadería (19,18).

Otros mecanismos genéticos de virulencia que aseguran la sobrevivencia bacterial

Existen otros genes que parecen ser requeridos durante los estadios tempranos de la infección natural y parecen tener funciones de "housekeeping", o más bien genes que cumplen funciones básicas en el patógeno, por ejemplo: el gen *zwf* que codifica la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)(34); el gen *sodC*, que codifica la SOD- Cu-Zn(10) y el gen *glnA*, que codifica la enzima glutamina sintetasa (28). El gen *glnA* puede aumentar la sobrevivencia de la bacteria dentro de las células fagocíticas, codificando por una toxina hemolítica, la salmolisina (31). Sin embargo este gen no es requerido para la adherencia ni para la invasión de las células M de las Placas de Peyer murinas, pero si es necesario para la citotoxicidad de estas células (8). Más recientemente, se determinó que el gen *slyA*, controla la expresión de genes necesarios para que la *Salmonella*, durante la fase estacionaria (independiente del regulador *rpoS*), resista los productos oxidativos de la explosión respiratoria, como el peróxido de hidrógeno (3).

Las *Salmonella spp* son citotóxicas para cultivos de células J774.A y para macrófagos murinos derivados de médula ósea. Esta citotoxicidad es manifestada por un deterioro inicial de la función del macrófago seguido por la muerte de macrófagos infectados. Estos macrófagos destruidos por la *Salmonella* exhiben varias características de células apoptóticas, como la presencia de cuerpos apoptóticos, fragmentación y condensación de la cromatina. Es posible que la *Salmonella* produzca y trasloque un factor que dispare las vías de transducción de señales desde la superficie de la célula y active el programa de muerte intrínseco o interfiera con los factores que inhiben el programa apoptótico, ya que la bacteria induce este efecto sin tener que ser fagocitada (7). Por ejemplo, la invasina *SipB*, se trasloca al citoplasma de la célula hospedera pocas horas después de la infección en donde se puede asociar con la proteasa preapoptótica caspasa 1, activándola para que se dé apoptosis de macrófagos cultivados (23). Una vez que la *Salmonella* produce un efecto citotóxico para macrófagos infec-

tados, se desfavorece su propia sobrevivencia dentro del hospedero, ya que su permanencia dentro del macrófago, le permite evadir el sistema inmune y diseminarse a otros tejidos más profundos.

El operón *ompR/envZ*, esta presente en muchas bacterias entéricas; en la *S. typhimurium*, este operón controla la expresión de porinas de membrana externa como las *ompF* y las *ompC*. Se ha demostrado que mutantes para este operón son altamente atenuadas *in vivo* y no son citotóxicas. Se ha propuesto entonces que este operón no solamente es necesario para la virulencia, sino que puede ser requerido para la regulación de algunos otros genes involucrados en la citotoxicidad de macrófagos (33).

Ya que la *Salmonella typhimurium* es capaz de persistir dentro de macrófagos, debe ser capaz de resistir los mecanismos de muerte oxidativa generados en estas células. La Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), codificada por el gen *zwf*, cataliza el primer paso enzimático en el ciclo de las pentosas fosfato, por lo tanto, ayuda a proveer ribosas para la síntesis de nucleótidos. La generación de mutantes *zwf* en la *Salmonella typhimurium*, mostraron un incremento en la susceptibilidad a intermediarios del nitrógeno y al oxígeno reactivo. Además, mostraron una atenuación de la virulencia, sugiriendo que la G6PD bacterial, constituye un importante mecanismo de defensa antioxidante durante la patogénesis temprana, ya que puede ayudar a antagonizar los mecanismos antimicrobianos desarrollados en el curso de la infección (34).

Algunos organismos procarióticos contienen uno o más superóxido dismutasas (SOD), cuyos cofactores pueden ser: manganeso (Mn), hierro (Fe) o cobre y zinc (Cu-Zn). La SOD Cu-Zn, codificada por el gen *sodC*, ha sido encontrada en un gran número de bacterias gram negativas. Se ha determinado que cepas virulentas de *S. typhimurium*, contienen dos enzimas periplásmicas SOD- Cu-Zn, denominadas *SodCI* y *SodCII*. *SodCI* está asociada con los serotipos altamente patogénicos, mientras que *SodCII*, está altamente relacionada con la SOD Cu-Zn de *E. Coli*. El locus que codifica para esta enzima parece ser conservado entre todos los serotipos de *Salmonella*, ya que las cepas mutadas para ambos genes *SodC* son menos letales para ratones y considerando el papel de estas enzimas en la defensa contra las especies reactivas del oxígeno derivadas de los fagocitos, se

sugiere que estas enzimas pueden contribuir en el aumento de la virulencia de la *Salmonella* (10).

Otro gen denominado *sodA*, que codifica para la superóxido dismutasa cuyo cofactor es el manganeso (SOD-Mn), fue clonado en la *S. typhimurium*. La creación de una mutante *sodA*, mostró una gran sensibilidad a la destrucción temprana por los macrófagos J774. *A in vitro*, sugiriendo una resistencia temprana de la cepa silvestre a los mecanismos microbicidas dependientes del oxígeno (40). De igual manera cepas de *Salmonella* deficientes en SOD-Cu-Zn, mostraron una disminución de la sobrevivencia en macrófagos y una virulencia atenuada en ratones, que puede ser restaurada por la supresión de la Oxido Nítrico Sintasa (iNOS) y la explosión respiratoria de los fagocitos. (9). Es muy probable entonces que estas enzimas SOD protejan la membrana interna y el periplasma, limitando la formación de peroxinitritos y detoxificando el anión superóxido, que se producen como importantes mecanismos efectores de las células fagocíticas.

El glutamato y la glutamina sirven como los principales donantes de nitrógeno para todos los metabolitos celulares en la *S. typhimurium* y otras bacterias entéricas. La enzima glutamina sintetasa, necesaria para la síntesis de glutamina, es codificada por el gen *glnA*. La transcripción de este gen está bajo el control de un sistema regulatorio del nitrógeno (*ntr*). Los dos genes forman el operón *glnA-ntrC*; la delección de este operón permite una gran atenuación de la *S. typhimurium*. El acceso de la *S. typhimurium* a la glutamina del huésped, requiere que se transcriba completamente este sistema regulador del nitrógeno (*ntr*), el cual aparentemente es requerido para la transcripción de los genes que transportan la glutamina, para de esta manera lograr una virulencia completa. Las

cepas mutadas para este operón, también mostraron una disminución en la habilidad para sobrevivir dentro del macrófago J774. (28).

Conclusiones

La *Salmonella* puede percibir y responder a las señales medioambientales que le proporciona el hospedero; lo cual activa la expresión de genes, la secreción de proteínas y el ensamblaje de estructuras que le permiten a la bacteria interactuar, sobrevivir y producir una infección productiva en el hospedero. La regulación positiva de muchos de estos genes esta directamente relacionada con la patogenicidad, probablemente por que los productos de esta activación disparan algunos eventos intracelulares que favorecen la internalización, la adaptación y la replicación; además, favorecen el desarrollo sistémico de la infección. Algunas de las proteínas codificadas por estos genes, tienen acción enzimática que le permite a la *Salmonella* limitar y neutralizar los mecanismos efectores de las células fagocíticas; de esta manera, resisten el ataque montado por la célula huésped.

Aún en la interacción hospedero-parásito, existen muchos mecanismos por esclacerer. El entendimiento de estos mecanismos nos permitirá prevenir las grandes pérdidas económicas generadas por estos patógenos ampliamente distribuidos; por ejemplo, muchas de las cepas mutadas para estos genes promueven una respuesta inmune diferente en el huésped, demostrando que, al modificar los genes de virulencia, se puede regular la respuesta inmune del huésped (41). Así mismo, algunas de las cepas mutadas han sido exitosamente ensayadas como vacunas, ya que protegen el hospedero a un reto posterior con la cepa silvestre (22).

Summary

Genes and Plasmids of Salmonella spp associated with virulence

The Salmonella species are intracellular facultative pathogens that affect several animals, including birds, pigs, cattle and humans. After ingestion of contaminated water or food, the bacteria reach the last portion of the small gut. These microorganisms need to express coordinately many of their genes in order to establish a productive infection. The expression begins when the bacteria get in contact with the hostile environment that represent the host gut tract, where they found a great variety of conditions such as: osmolality, oxygen tension and pH. These conditions induce the transcription of genes that codify virulence factors required during the pathogenesis. Additionally, the Salmonella uses a type III secretion system as a basic mechanism of virulence. Through this system a variety of unrelated proteins are secreted and translocated into the citosol of eukaryotic cells, interfer-

ing with the transduction signals and other cellular processes, favoring the bacteria pathogenesis. Some of these genes have been described and characterized by in vitro isolation of mutants, which have shown defects in several characteristics that might be important to carry out some basic functions and also for virulence; for instance: the capability to colonize epithelial cells in culture, the survival inside fagocytic cells, the regulation of inflammation processes and the secretion of fluids. Most of these genes that encode virulence factors are regulated by systems that can be found in both, pathogens and non-pathogens species. Several strains of Salmonella have plasmids that encode virulence genes, which are highly associated with bacteremia and systemic infections. A better understanding of these genes, of their proteins products and their functions will improve our knowledge of the pathogenicity pathways used by these microorganisms when they infect a susceptible host. Additionally the development of strategies to successfully prevent such infections will be more easily accomplished.

Key words: genes, plasmids, salmonella spp, virulence

Referencias

- Baumler A.J., Tsolis R.M. y Heffron F. The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *S. typhimurium* to murine peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1996); 93: 279-283.
- Blanc-Potard A.B. y Groisman E.A. The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *The EMBO journal.* (1997); 16(17):5376-5385.
- Buchmeier N., Bossie S., Chen C.Y., et al. SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infection and Immunity.* (1997); 65(9): 3725-3730.
- Carlson S.A. y Jones B.D. Inhibition of *Salmonella typhimurium* invasion by host cell expression of secreted bacterial invasion proteins. *Infection and Immunity.* (1998); 66(11): 5295-5300.
- Chen C.Y., Buchmeier N.A., Libby S., et al. Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of *Salmonella dublin* plasmid virulence genes. *Journal of Bacteriology.* (1995); 177(18): 5303-5309.
- Chen C., Eckmann L., Libby S.J., Fang F.C., et al. Expresión of *Salmonella typhimurium* rpoS and rpoS- dependent genes in the intracellular environment of eukaryotic cells. *Infection and Immunity.* (1996). 64(11): 4739-4743.
- Chen L.M., Kaniga K., Galan J.E. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol. Microbiol.* (1996); 21: 1101-1115.
- Daniels J.J., Autenrieth I.B., Ludwig A., et al. The gene slyA of *Salmonella typhimurium* is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. *Infection and Immunity.* (1996); 64(12): 5075-5084.
- DeGroot M.A., Ochsner U.A., Shiloh M.U., et al. Periplasmic Superoxide Dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997); 94: 13997-14001.
- Fang F.C., DeGroot M. A., Foster J.W., et al. Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu,Zn-superoxide dismutases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999); 96: 7502-7507.
- Finlay B.B. y Falkow S. *Salmonella*: A model to study intracellular parasitism. en *Advances in brucellosis research.* Texas A&M. (1990).
- Foster J.W., Park Y.K., Bang L.S., et al. Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology.* (1994); 140: 341-352.
- Galán J.E. y Curtiss R.I. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989); 86: 6383-6387.
- Ginocchio C., Pace J. y Galán J. E. Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992); 89: 5976-5980.
- Ginocchio C.C., Rahn K., Clarke R.C., y Galán J.E. Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. *Infection and Immunity.* (1997); 65(4): 1267-1272.
- Grob P. y Guiney D.G. In vitro binding of the *Salmonella dublin* virulence plasmid Regulatory protein SpvR to the promoter regions of spvA and spvR. *Journal of Bacteriology.* (1996); 178: 1813-1820.
- Guillespe J.H. y Timoney J.F. Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. Séptima edición. (1981).
- Guiney D.G., Fang F.C., Krause M., et al. Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. *Clinical Infectious Diseases.* (1995); 2: 146-51.
- Gulig P.A., Danbara H., Guiney D.G., et al. Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Molecular Microbiology.* (1993); 7(6), 825-830.
- Hardt W.D. y Galan J.E. A secreted *Salmonella* protein with homologia to an avirulence determinant of plant

- pathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997); 94 : 9887-9892.
21. Heithoff D.M., Conner C.P., Hanna P.C., et al. Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* (1997); 94: 934-939.
 22. Heithoff D.M., Sinsheimer R.L., Low D.A., et al. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science.* (1999); 284: 967-970.
 23. Hersh D., Monack D.M., Smith M. R., et al. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999); 96: 2396-2401.
 24. Hohmann E.L., Oletta C.A., Loomis W.P., et al. Macrophage inducible expression of a model antigen in Salmonella typhimurium enhances immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1995); 92, 2904-2908.
 25. Hueck C.J. Type III protein secretion systems. in bacterial pathogens of animals and plants. en *Microbiology and molecular biology reviews.* (1998); 62(2): 379-433.
 26. Jones B.D., Ghori N. y Falkow S. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the peye's patches. *J. Exp. Med.* (1994); 180:15-23
 27. Jones M.A., Wood M.W., Mullan P.B., et al. Secreted effector proteins of Salmonella dublin act in concert to induce enteritis. *Infection and Immunity.* (1998); 66(12): 5799-5804.
 28. Klose K.E. y Mekalanos J.J. Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates Salmonella typhimurium virulence. *Infection and Immunity.* (1997); 65(2): 587-596.
 29. Leclerc G.J., Tartera C. y Metcalf E.S. Environmental Regulation of Salmonella typhi invasion –defective mutants. *Infection and Immunity.* (1998); 66(2):682-691.
 30. Lee C.A., Jones B.D. y Falkow S. Identification of a Salmonella typhimurium invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992); 89:1847-1851.
 31. Libby S.J., Goebel W., Ludwig A., et al. A cytolysin encoded by salmonella is required for survival within macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994); 91: 489-493.
 32. Libby S.J., Adams L.G., Fitch T.A., et al. The *spv* genes on the Salmonella dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infection and Immunity.* (1997); 65(5): 1786-1792.
 33. Lindgren S.W., Stojiljkovic I. y Heffron F. Macrophage killing es an essential virulence mechanism of salmonella typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1996); 93: 4197-4201.
 34. Lundberg B.E., Wolf R.E., Dinauer M.C., et al. Glucose 6-phosphate dehydrogenasa is required for Salmonella typhimurium virulence and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Infection and Immunity.* (1999); 67(1): 436-438.
 35. McCormick B.A., Miller S.I., Carnes D., et al. Transepithelial signaling to neutrophils by Salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infection and Immunity.* (1995); 63 (6): 2302-2309.
 36. McCormick. B.A., Miller S.I. y Madara J.L. New insights on molecular pathways utilized by Salmonella species in cell binding. *Frontiers in Bioscience* (1996); 1: 131-145.
 37. Norris F.A., Wilson M.P, Wallis T.S., et al. SopB, a protein required for virulence of Salmonella dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998); 95: 14057-14059.
 38. Rosqvist R., Hakansson S., Forsberg A., et al. Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of Yersiniae, Salmonellae y Shigellae. *The EMBO Journal.* (1995); 14(17): 4187-4195.
 39. Shea J.E., Hansel M., Gleeson C., et al. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1996); 93:2593-2597.
 40. Tsois R.M., Baumler A.J. y Heffron F. Role of Salmonella typhimurium Mn-Superoxide Dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages. *Infection and Immunity.* (1995); 63(5): 1739-1744.
 41. VanCott J.L., Chatfield S.N., Roberts M., et al. Regulation of host immune response by modification of Salmonella virulence genes. *Nature Medicine.* (1998); 4(11): 1247-1252.
 42. Wallis T.S., Paulin S.M., Plested J.S., Watson P.R. y Jones P.W. The Salmonella dublin virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infection and immunity.* (1995); 63(7): 2755-2761.
 43. Watson P.R., Paulin S.M., Bland P., et al. Characterization of intestinal invasion by Salmonella typhimurium and Salmonella dublin and effect of a mutation in the *invH* gene. *Infection and Immunity.* (1995); 63(7): 2743-2754.
 44. Watson P.R., Galyov E.E., Paulin S.M., et al. Mutation of *invH*, but not *stn*, reduces Salmonella-induced enteritis in cattle.. *Infection and Immunity.* (1998); 66(4): 1432-1438.
 45. Wilson J.A., Doyle J.A. y Gulig P.A. 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.* (1997); 143: 3827-3839.
 46. Zierler M.K. y Galán J.E. Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of Salmonella typhimurium invasion protein *invJ*. *Infection and Immunity.* (1995); 63(10): 4024-4028.