

TEMA 16:

GÉNERO SALMONELLA



Lucía Camacho Pulido
María Redondo Moya
Lucía Rodríguez Arribas
Alejandro Romeral Buzón
Mariana Yáñez Bartolomé

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
2. PATOLOGÍA
3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS
4. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR *SALMONELLA*
5. INTERACCIÓN DE *SALMONELLA* CON SU HOSPEDADOR
 - 5.1. Determinantes genéticos de virulencia y su regulación
 - 5.2. Etapas de la infección por *Salmonella*
 - 5.2.1. Adhesión a las células epiteliales
 - 5.2.2. Papel del sistema de secreción tipo III en la entrada de la bacteria en las células epiteliales
 - 5.2.3. *Salmonella* promueve una respuesta inflamatoria que promueve la infección
 - 5.2.4. Multiplicaciones de *Salmonella* en el interior de la vacuola
 - 5.3. Regulación de la expresión de los genes de virulencia
6. INTERACCIÓN DE *SALMONELLA* CON LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS
7. EVOLUCIÓN DE *SALMONELLA* EN SU ADAPTACIÓN AL HOSPEDADOR
 - 7.1. Genes antivirulencia perdidos en la evolución hacia patogénesis en *Salmonella*
8. REFERENCIAS

Tema 16. GÉNERO *Salmonella*.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella es un género de bacterias dentro del cual solo se han descrito dos especies en base a las diferencias en el análisis de la secuencia del rRNA 16S: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Cabe destacar que en 2005 fue reconocida una tercera especie denominada *Salmonella subterranean*. El nombre de este género de bacterias se debe a que fue descubierta en 1885 por un veterinario estadounidense llamado Daniel Elmer Salmon y su ayudante Theobald Smith.

Salmonella incluye a un conjunto de bacterias que han evolucionado desde *E. Coli* en un proceso que incluye 3 fases. Tanto *E. Coli* como *Salmonella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. La especie *Salmonella bongori* puede infectar y producir patología en animales de sangre fría, mientras que *Salmonella enterica* es una especie adaptada a la infección en humanos y otros animales de sangre caliente (aves y mamíferos). Esta última especie está constituida por patógenos gram-negativos con morfología bacilar e intracelulares facultativos, lo que implica que suelen multiplicarse de forma extracelular, pero también están adaptados a la proliferación y supervivencia en el espacio intracelular.

La especie de *Salmonella enterica* se divide en un total de 7 subespecies (I, II, IIIa, IIIb, IV, VI, VII). A su vez estas subespecies se dividen en más de 50 serogrupos o serovariantes. La clasificación de las serovariantes responde a las diferentes características del antígeno O (lipopolisacárido o LPS) que se expresa en la superficie bacteriana, que es el elemento principal desencadenante de la respuesta inmunitaria. Los 50 serogrupos se dividen en más de 2600 serotipos (“serovares”), de acuerdo a diferencias en la secuencia codificante del gen del antígeno H (flagelina). Algunos de estos serotipos, en el momento de su aislamiento, se les asignó un nombre específico. A veces, de forma errónea puede parecer que se refiere a especies, porque nombre del serovar o serotipo se indica en cursiva que es la nomenclatura establecida para designar especies. La realidad es que solo existen 2 especies de *Salmonella* y el resto son serovariantes.

De acuerdo con el sistema de clasificación actual, la forma correcta de referirse a los serovares es emplear el nombre del serovar sin cursiva y después añadir el nombre de la especie a la que pertenece (*S. enterica* o *bongori*).

Ejemplo de nomenclatura: *S. enterica* serovar Thyphimurium, Enteritidis o Choleraesuis.

De acuerdo con el rango de hospedador y adaptación que ha experimentado *Salmonella*, los serovares se pueden dividir en 2 grandes grupos:

- Serotipos de *Salmonella* adaptados a un hospedador específico (p. ej., *S. enterica* Typhi y *S. enterica* Gallinarum pueden infectar sólo a humanos o a pollos respectivamente).
- Serotipos poco específicos que infectan a un amplio rango de hospedadores: *S. enterica* Enteritidis (**Fig. 1**).

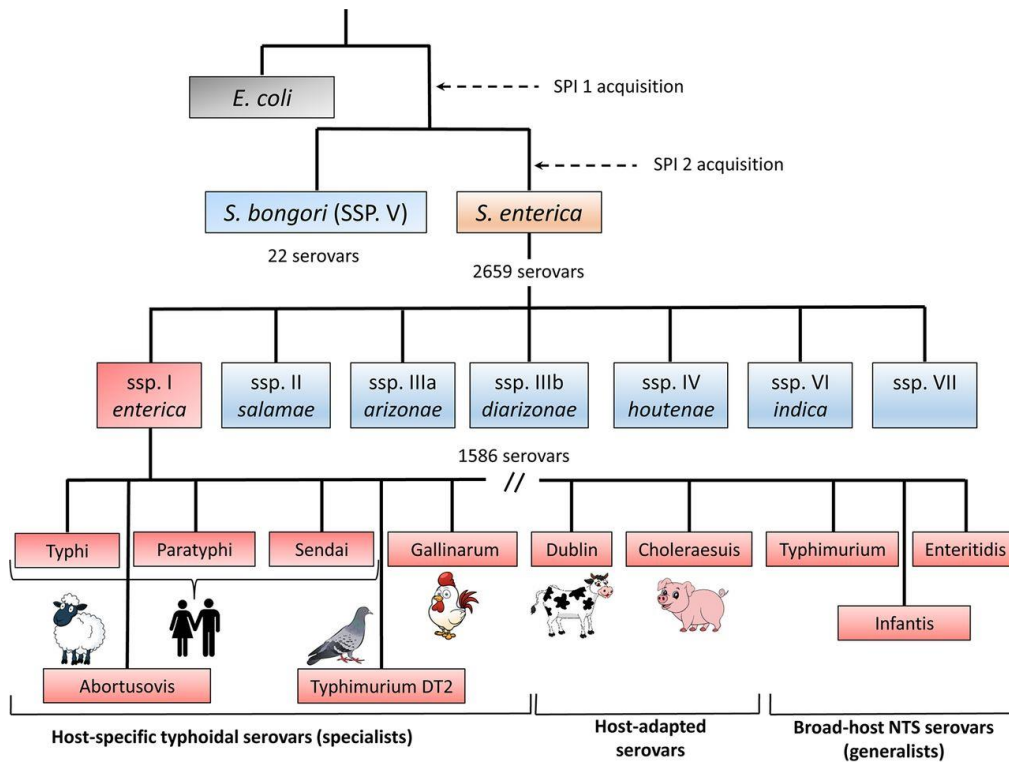


Figura 1. Clasificación y nomenclatura actual de las especies, serovares y serovariantes de *Salmonella*. Obtenida de Gal-Mor (2019).

Las bases moleculares de esta adaptación al hospedador son poco conocidas. Normalmente se establece que las serovariantes más específicas producen patologías más graves.

El tipo de enfermedad causada por estos microorganismos depende de varios factores como el serotipo de *Salmonella* protagonista de la infección, la especie y el estado inmunológico del hospedador infectado.

En humanos, las manifestaciones clínicas de salmonelosis van desde infección sistémica severa a gastroenteritis moderada.

Una característica de la patogénesis de todas las salmonelas es su habilidad para acceder a células que normalmente no son fagocíticas. Esto incluye no sólo las células del epitelio intestinal, la puerta de entrada de estos organismos, sino también otras células que constituyen "sitios seguros" para las salmonelas en las etapas tardías de su ciclo patogénico, como por ejemplo la vesícula biliar. Es decir, *Salmonella* puede emplear células del sistema inmunitario como los macrófagos o las células dendríticas para distribuirse de forma sistémica y acantonarse en determinados órganos.

2. PATOLOGÍA

Las manifestaciones clínicas particulares están normalmente asociadas con serotipos particulares de *Salmonella* (**Fig. 1**).

Prácticamente todas las infecciones de *Salmonella* ocurren por la ingestión oral de la bacteria, normalmente presente en alimentos contaminados. Se requiere una dosis bacteriana importante para superar las defensas inespecíficas intestinales del hospedador como son la acidez gástrica, la flora normal y los movimientos peristálticos. La dosis infectiva en humanos va desde 10^6 hasta 10^9 organismos para la mayoría de los serotipos, incluyendo a *S. enterica* Typhi.

Las bacterias se multiplican en el intestino delgado, en aparente competición con la flora normal (**Fig. 2**). El mecanismo que probablemente emplean para colonizar el intestino es penetrar por medio de células epiteliales especializadas llamadas células M. Estas células se encuentran recubriendo los parches de Peyer que son agregados de tejido linfoide que se encargan de defender el tubo digestivo de la entrada de patógenos. Agrupa diferentes tipos de células del sistema inmunitario que ofrecen una respuesta a nivel local.

Los microorganismos rápidamente penetran la mucosa intestinal y alcanzan los folículos linfoides mesentéricos donde se multiplican. La mayoría de las infecciones no pasan más allá de estos nódulos linfáticos locales, donde las bacterias van a ser controladas por las células polimorfonucleares que llegan a esta zona reclamadas por la respuesta inflamatoria local.

Sin embargo, las cepas más invasivas como son *S. enterica* Typhi y Choleraesuis no inducen una respuesta inflamatoria local, y con frecuencia, ni siquiera inducen un proceso de diarrea. Estas bacterias infectan macrófagos y van a utilizar a estas células inmunes como vehículo para diseminarse a otros órganos del sistema reticuloendotelial. Así se expanden de forma sistémica pudiendo infectar órganos diana vitales como hígado, el bazo, la vesícula biliar y la bilis.

La bilis infectada cuando se vierte sobre el lumen del intestino puede causar una infección intestinal secundaria aproximadamente dos semanas después de la ingestión inicial, especialmente con *S. enterica* Typhi. También la secreción en la bilis es la forma que tiene la bacteria para salir al exterior y propagarse hacia otros hospedadores mediante la transmisión de tipo oral-fecal.

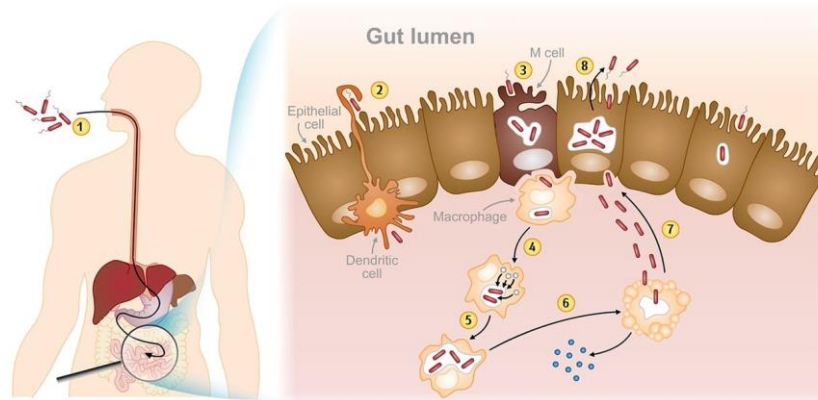


Figura 2. Mecanismo de invasión del intestino en el ciclo de infección por *Salmonella*. Obtenida de Haraga et al (2008).

3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El resultado de las infecciones por *Salmonella* depende tanto del serotipo de *Salmonella* que infecta como de la especie y el estado inmunológico del hospedador infectado.

Gastroenteritis

Está producida por serotipos más generales o poco específicos como Enteritidis y Typhimurium (no son exclusivos de humanos, infectan a otros hospedadores) que causan las salmonelosis más habituales en el entorno (intoxicaciones alimentarias). Incluye un conjunto de síntomas típicos de un proceso de infección agudo. Cursa de forma rápida tras la ingestión del alimento contaminado con este tipo de microorganismos. Se manifiesta con vómitos, diarreas y dolores abdominales. La infección se resuelve de forma benigna muchas veces sin tratamiento, solo con la respuesta inmunitaria en un periodo de 3 a 7 días después del contacto inicial.

En niños o personas inmunodeprimidas, donde su sistema inmunitario no está en las condiciones óptimas para afrontar un proceso infeccioso, el curso de la patología puede complicarse. En estas condiciones se favorece la rápida multiplicación y diseminación de *Salmonella* produciendo graves picos de bacteremia en sangre que pueden tener consecuencias fatales.

La mayoría de estos casos se concentran en países más pobres asociados a malnutrición y estados de inmunosupresión, lo que desemboca en proceso más graves, pudiendo llegar a ser mortales (20% de mortalidad en niños pequeños).

En África y en otras zonas subdesarrolladas la coinfección junto con HIV puede llevar a la muerte del individuo. Se estima que el 10% de los adultos africanos HIV-positivos desarrollan infecciones invasivas que llevan asociada una tasa de mortalidad mayor del 20%.

Fiebres entéricas

Constituyen un cuadro clínico muy grave y provocado por los serotipos Typhi y Paratyphi, que son específicos de humanos y tienen una distribución amplia en África y Asia. Los síntomas asociados a la infección aparecen más tarde, las manifestaciones clínicas se caracterizan por elevadas fiebres que se mantienen de forma sostenida. Los episodios febriles se producen como consecuencia de picos de bacteremia en el torrente sanguíneo. El periodo de incubación es mayor (normalmente 1-2 semanas) hasta que aparecen síntomas típicos de la enfermedad. La enfermedad se prolonga más, pudiendo durar hasta 3 semanas, produciendo fiebres altas (> 39°C).

En este tipo de patologías se activa el sistema reticuloendotelial y se produce una disfunción múltiple de órganos que puede tener consecuencias fatales.

La bacteria se distribuye de forma sistémica y se multiplica dentro de células fagocíticas mononucleares en el hígado, bazo, nódulos linfáticos y parches de Peyer. En algunos casos se puede producir necrosis hemorrágica de los parches de Peyer en el íleon, resultando en una perforación que conduce a peritonitis y posible muerte del individuo.

Las bacterias no producen alteraciones muy significativas, e incluso sin cuadros de dolor intestinal, evaden la respuesta inmunitaria y se adentran en órganos internos. Emplean células inmunitarias como los macrófagos a modo de vehículos para distribuirse desde los nódulos linfoides mesentéricos que colonizan tras atravesar el epitelio intestinal hacia el resto del organismo.

La OMS calcula que actualmente se producen entre 11 y 20 millones de casos de fiebre entérica al año, con 128.000-161.000 muertes en total. Estas patologías más graves están asociadas a problemas de malnutrición, déficit en tratamiento de aguas en alcantarillado, pocos controles en los alimentos de consumo humano y posible contaminación. En Europa, en épocas pasadas las fiebres tifoideas arrasaron con gran parte de la población europea. Sin embargo, en la actualidad en Europa y otros países desarrollados la incidencia de esta enfermedad ha disminuido mucho gracias a la implantación de medidas como el alcantarillado (previene de la vía de transmisión oral-fecal), tratamientos de las aguas y pasteurización de los productos lácteos. En países de África y Asia se concentra el mayor número de casos y muertes por fiebre entérica (**Fig. 3**).

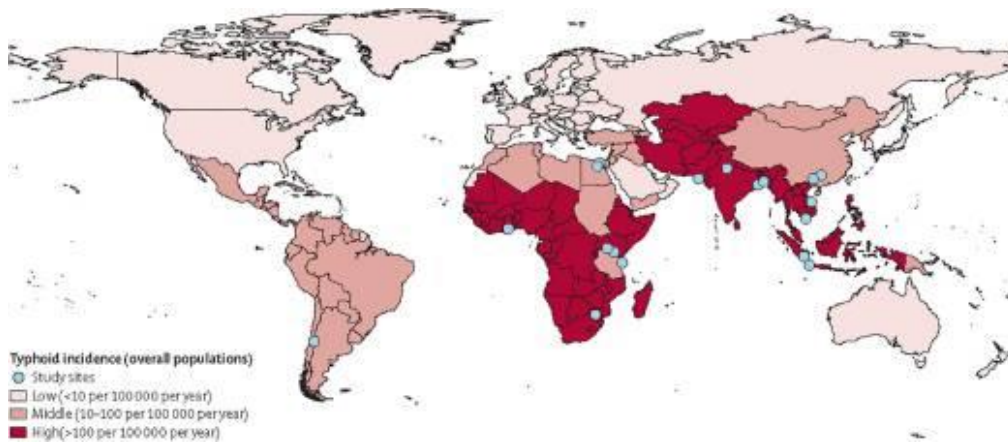


Figura 3. Mapa de distribución actual en el mundo de los casos de fiebres entéricas. Obtenida de Crump et al (2015).

Estado portador

Es una manifestación clínica asintomática crónica poco frecuente que aparece entre el 1-5% de personas que han sufrido un proceso de fiebre entérica provocada en su mayoría por el serotipo Typhi. No presenta manifestaciones clínicas, pero la bacteria se expande y entra en estado de persistencia que puede durar años. En esta situación el individuo puede ser un foco infeccioso capaz de liberar bacterias que infecten a otras personas por la vía de transmisión oral-fecal. La persistencia puede ser temporal, en caso de que la duración sea menor de 12 meses, o permanente en caso de que supere este periodo de tiempo. Se trata de un estado de infección crónica donde la bacteria no se elimina mediante los tratamientos antibióticos clásicos porque se encuentra metabólicamente inactiva y en estas circunstancias no es sensible a los antibióticos.

Con mucha frecuencia se acantona y establece el estado de infección crónica en el conducto biliar y desde ahí la bacteria se secreta al tubo digestivo pudiendo provocar síntomas. Las personas con estado portador constituyen reservorios de la bacteria, pero no presentan síntomas característicos y su identificación es bastante complicada y un problema de salud pública.

Los controles del estado portador se suelen aplicar en los trabajadores de la industria alimentaria, deben ser sometidas a controles. En caso de que se demuestre que son portadores, entonces se puede llegar a tomar la decisión de hacer una colecistectomía que consiste en extraer la vesícula biliar para que puedan seguir trabajando. Esta opción se plantea porque el uso de antibióticos en este tipo de infecciones persistentes no es eficaz. Esta operación es bastante frecuente porque es común que la vesícula biliar forme cálculos o cristales de colesterol que producen mucho dolor.

4. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES POR SALMONELLA

Hay diferentes alternativas para el diagnóstico de la infección por *Salmonella*. Una opción es la vía microbiología clásica, que consiste en el crecimiento de la bacteria en medios de cultivos selectivos a partir de muestras de heces o sangre del paciente.

Una de las cuestiones a tener en cuenta en este método de diagnóstico es que hay que emplear medios de cultivo que permitan distinguir fácilmente de forma visual entre *Salmonella* y *Escherichia Coli* (**Fig. 4**).

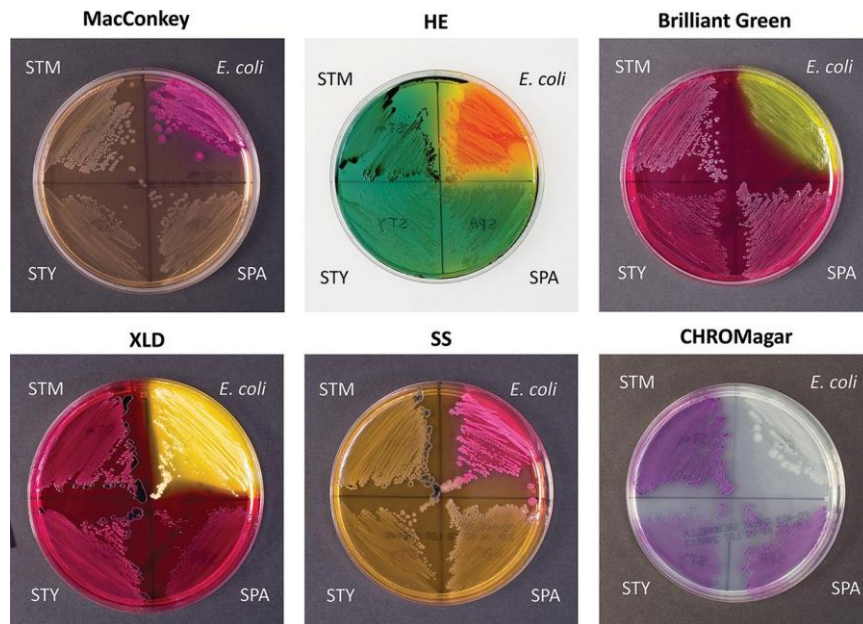


Figura 4. Medios selectivos para el diagnóstico microbiológico de *S. Typhimurium* SL1344 (STM), *S. Typhi* CT18 (STY), *S. Paratyphi* 45157 (SPA) y *E. coli*. Los medios selectivos que incluye son el agar MacConkey, agar entérico de Hektoen (HE), agar XLD, agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar verde brillante y CRHOMagar. Obtenida de Gal-Mor (2019).

Existe una enorme variedad de medios de cultivo disponibles para identificar *Salmonella*. Entre los más destacados están el agar entérico Hektoen (**Fig. 5**) que es un medio selectivo y diferencial recomendado para detectar bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* como *Salmonella* y *Shigella* en muestras de heces. Contiene inhibidores de bacterias gram positivas, glúcidos (lactosa, sacarosa) que no metaboliza *Salmonella* y peptona como fuente de carbono. *Salmonella* emplea la peptona como sustrato preferencial, lo que provoca que el pH del medio vire a azul y visualmente sea muy llamativo. Además, contiene tiosulfato que en presencia de SH₂ producido por *Salmonella* forma un precipitado negro muy característico.

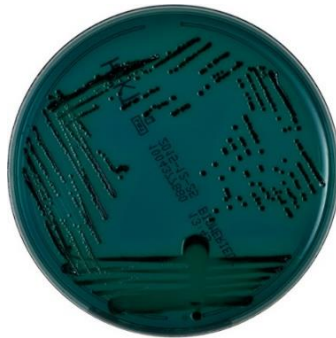


Figura 5. Diagnóstico de *Salmonella* en agar de Hektoen.
Obtenida de BioMerieux.

Otro medio de cultivo ampliamente utilizado en clínica es el agar MacConkey que está compuesto por sales biliares que constituyen un ambiente inhóspito para el crecimiento de bacterias Gram positivas, excepto *Enterococcus* y algunas especies de *Staphylococcus* y un indicador rojo neutro que marca microorganismos que fermenten la lactosa. Así en la placa está distribuidas las bacterias Lac+ y Lac- (*Salmonella*).

Xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) es otro medio altamente selectivo que también detecta la producción de H₂S de especies como *Salmonella*.

Una vez ha pasado el tiempo pertinente y se observan colonias en la placa de cultivo, se procede a la identificación del serotipo de *Salmonella enterica*. Para ello se emplean técnicas inmunológicas basadas en el uso de anticuerpos específicos de los serotipos de la subespecie I que es la que infecta a humanos. Esta segunda parte del diagnóstico se realiza en laboratorios especializados de diagnóstico.

Eventualmente las muestras de heces pueden inocularse en caldos de enriquecimiento antes de preparar los cultivos sólidos clásicos. Los caldos de enriquecimiento sirven para favorecer el crecimiento de *Salmonella* mientras se suprime el crecimiento de la flora fecal normal. Algunos de los más empleados son el caldo de tetratonato y el caldo de selenita. Una vez se aísla la bacteria se procede a la siembra clásica para obtener colonias para la identificación y las pruebas de susceptibilidad (si se indica).

Otra opción es el uso de la vía microbiología alternativa que incorpora técnicas de biología molecular. Entre las más destacadas está la amplificación de ácidos nucleicos por PCR o la secuenciación masiva (NGS). Estos métodos permiten acortar los tiempos de diagnóstico y están más automatizados que los cultivos bacterianos.

Sin duda, el diagnóstico basado en las técnicas de NGS presentan varias ventajas en el ámbito del diagnóstico de infecciones bacterianas:

- No precisa saber contra qué microorganismo se va a diagnosticar
- Permite detectar todos los microorganismos presentes en una muestra biológica
- Identificar aquellos que no crecen en medios de cultivo clásicos
- Determinar variantes, resistencias a antibióticos, seguimiento de pacientes

Como demostración de este hecho, cabe indicar que en 2019, en las bases de datos, el número de genomas disponibles de cepas de *Salmonella* superaba los 110.000.

También las técnicas proteómicas, a través de la generación de espectros de masas a partir de cultivos de la bacteria, están siendo empleadas en el diagnóstico. En este caso, la huella proteómica del aislado clínico es comparada con un base de datos de patrones de espectrometría de masas de microorganismos.

Entre las nuevas opciones de diagnóstico clínico en la actualidad, recientemente se han comercializado varios paneles multipocillo de identificación de patógenos gastrointestinales basados en la PCR para su uso con muestras de heces primarias. Algunos ejemplos son el sistema bioMérieux Biofire Filmarray. Estos paneles permiten la identificación rápida de *Salmonella* y otras bacterias entéricas como *Shigella* y *Yersinia* a partir de muestras primarias de heces. Tienen la ventaja de que ofrecen un tiempo de respuesta sustancialmente mejorado en el diagnóstico de laboratorio primario en comparación con los métodos basados en el cultivo. Estos paneles constan de múltiples pocillos donde hay sondas específicas que son complementarias al genoma de diferentes patógenos gastrointestinales. Se aplica la muestra sobre toda la placa, si hay hibridación entre la sonda de uno de los pocillos y el genoma del patógeno correspondiente para el cual es complementario, se inicia una amplificación por PCR. Es un sistema que permite detectar con mucha sensibilidad y especificidad el agente microbiológico presente en la muestra ensayada.

La desventaja general de estas nuevas técnicas de diagnóstico molecular es que no distinguen entre patógenos viables o no, de forma que la asociación entre patología observada en el paciente y patógeno es menor. Por eso las técnicas basadas en cultivos microbiológicos siguen teniendo mucho valor clínico y se siguen empleando en la actualidad. Por otra parte, muchos de estos nuevos métodos precisan equipos muy caros y costosos de mantener que no todos los hospitales pueden permitirse.

5. INTERACCIÓN DE SALMONELLA CON SU HOSPEDADOR

Cuando examinamos las estrategias empleadas por los patógenos microbianos para colonizar y multiplicarse dentro del hospedador, resulta apropiado hacer una distinción entre los patógenos que accidentalmente se encuentran con un hospedador particular de aquellos que mantienen una larga asociación con los mismos. La distinción es relevante dado que, en el primer caso, la interacción hospedador-parásito no ha sido moldeada por fuerzas evolutivas. Con frecuencia, las infecciones por este tipo de microorganismos conducen a enfermedades serias o letales. En cambio, la interacción entre el patógeno adaptado al hospedador y su hospedador normalmente conduce a infecciones subclínicas o autocurantes. *S. enterica* es un buen ejemplo de un patógeno bacteriano cuyas interacciones con los vertebrados han sido modeladas a través de millones de años de coevolución.

Contrario a *S. Typhimurium*, que infecta roedores, vacas y primates, incluidos los humanos, *S. Typhi* es específica para humanos. Dada la falta de sistemas modelo apropiados, la patogénesis de *S. Typhi* y la respuesta del hospedador son conocidas de una forma pobre. *S. Typhimurium* es considerado el equivalente en ratones a *S. Typhi* en humanos, basado en los síntomas similares de fiebre tifoidea que ocasionan. Así, como regla se viene haciendo una extrapolación de la investigación de *S. Typhimurium* en ratones a *S. Typhi* en humanos. Sin embargo, no hay que olvidar que ambos serotipos difieren en una gran proporción de sus genomas. No obstante, por todo lo dicho, la mayoría de los datos moleculares a los que nos vamos a referir se han deducido de los estudios de *S. Typhimurium* y la infección en ratones.

5.1. Determinantes genéticos de virulencia y su regulación.

La mayoría de los genes de virulencia de *S. Typhimurium* se encuentran agrupados en distintas secuencias referidas como “islas de patogenicidad” o SPI (**Fig. 6**). Se han identificado unas 12 regiones SPI en el genoma de *Typhimurium*, numeradas de acuerdo con el orden cronológico de su descubrimiento. A continuación, se describen algunas características de las cinco mejor caracterizadas.

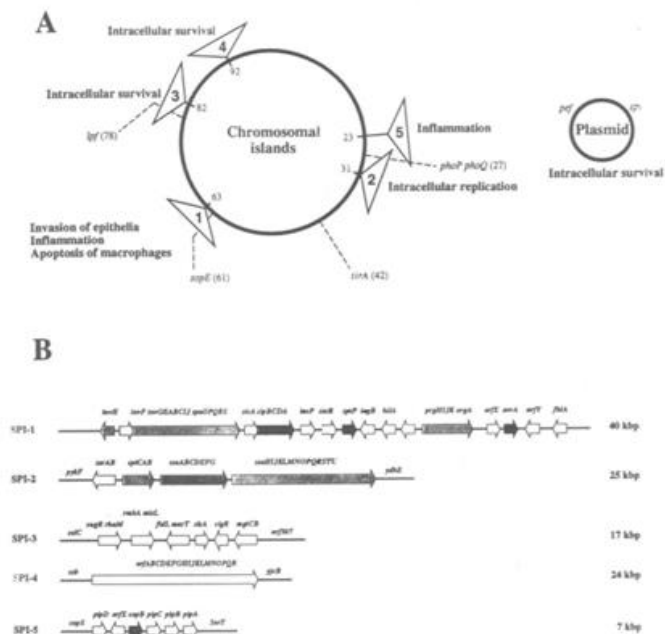


Fig. 6. Determinantes genéticos de la virulencia de *S. Typhimurium*. **A)** Representación esquemática de la distribución física de islas de patogenicidad junto con sus funciones y sus principales factores de virulencia en el genoma de la bacteria **B)** Organización genética de cada tipo de isla de patogenicidad (1-5).

SPI-1 y SPI-2 codifican para sistemas de secreción tipo III, encargados de inyectar proteínas efectoras en el citoplasma de la célula hospedadora a través de “jeringas moleculares”.

La función de SPI-1 es requerida para la invasión de las células no fagocíticas. La maquinaria codificada por SPI-1 inyecta en la célula una serie de proteínas que van a inducir el reordenamiento del citoesqueleto de actina lo que conduce a la aparición de arrugas en la membrana y la internalización de *Salmonella*. Proteínas codificadas en SPI-1 también intervienen en las reacciones inflamatorias generadas por la bacteria en la mucosa intestinal. El contenido en C+G de esta región es considerablemente más bajo que la del resto del genoma. El mecanismo de secreción de estas proteínas es crucial para la invasión de las células por el patógeno y consiste en un sistema T3SS (type 3 secretion system) adquirido por transferencia horizontal que atraviesa la membrana bacteriana y mediante inyección introduce las proteínas efectoras en la célula hospedadora (**Fig 7**).

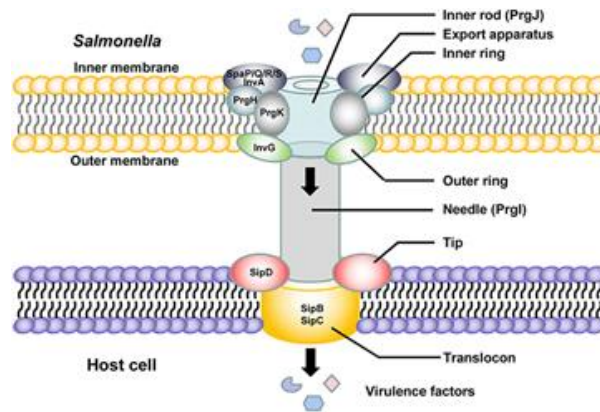


Figura 7. Sistema T3SS de la SPI-I en contacto con la célula huésped. *Obtenida de Lou et al (2019).*

SPI-2 consta de genes que controlan la replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de células fagocíticas y epiteliales. Su función es esencial para que *Salmonella* pueda causar las infecciones sistémicas. El locus SPI-2 está al lado de un gen $tRNA^{Val}$ y también tiene un bajo contenido en G+C. Esta isla también posee un sistema T3SS propio, de nuevo adquirido por transferencia horizontal, que puede liberar a la célula hospedadora hasta 28 efectores diferentes.

Una característica común a SPI-1 y SPI-2 es que no todas las proteínas efectoras que son translocadas a través de estos sistemas están codificadas por genes situados en las correspondientes islas de patogenicidad. Muchos de los genes codificantes para estas proteínas efectoras están dispersos en el genoma y se encuentran asociados a genomas de bacteriófagos, indicando que también han sido adquiridos por transferencia horizontal. Esto demuestra que una función básica de virulencia puede ser adquirida junto con una isla de patogenicidad y que determinantes de virulencia adicionales pueden ser adquiridos posteriormente a través de bacteriófagos u otros elementos móviles.

SPI-3 se requiere para la supervivencia intracelular en macrófagos. El principal factor de virulencia que está codificado en esta isla es un sistema de transporte con alta afinidad por magnesio. Para replicarse de forma intracelular, *Salmonella* debe adaptarse al ambiente nutricionalmente pobre del fagosoma, donde escasean las purinas, las pirimidinas, muchos aminoácidos y Mg^{2+} . Esta isla también tiene un bajo contenido en G+C y está insertada en el gen de un tRNA.

SPI-4 codifica un sistema de secreción tipo I encargado de la secreción de toxinas y se piensa que interviene en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular del macrófago.

Finalmente, SPI-5 codifica factores implicados en la secreción de fluidos y en la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal y también para la invasión, como es SopB (SigD), una proteína efectora secretada a través del aparato SPI-1. También tiene un bajo contenido en G+C y está insertado adyacente a un gen $tRNA^{Ser}$.

Además, existen otras islas de patogenicidad que están presentes en algunos serotipos y ausentes en otros. Por ejemplo, en el serotipo Typhi existe una isla de patogenicidad de enorme tamaño (146,9 kb), asociada con el gen tRNA^{Phe}. En esta región se sitúan varios factores de virulencia:

- La ruta de biosíntesis de la cápsula polisacáridica típica del serotipo Typhi
- El gen codificante para la proteína SopE, que inyectada en la célula por el sistema de secreción codificado en la SPI-1 va a ser fundamental para la invasión de células no fagocíticas por parte de la bacteria
- Un grupo de genes que codifican para los pili tipo 4 que son importantes para la invasión de células epiteliales.

Otro ejemplo, es el locus asociado a resistencia frente a varios antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina) que está presente en algunos aislados del serotipo Typhimurium. Este locus, además de los genes de resistencia a drogas, posee los genes codificantes para enzimas implicadas en la movilidad del DNA (transposasas, integrasas, etc.), lo que le da características de transposición.

5.2. Etapas de la infección por *Salmonella*

Las infecciones de *Salmonella* se inician principalmente después del consumo de alimentos o agua contaminados. Es una de las infecciones transmitidas por alimentos más frecuentes en todo el mundo, en el caso de la fiebre tifoidea causada por *S. Typhi* y *S. Paratyphi* se reportan entre 15 y 20 millones de casos de los que mueren entre 180.000 y 200.000. Las infecciones con *S. enterica* pueden conducir a patologías intestinales crónicas como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa crónica o artritis reactiva. Las bacterias ingeridas alcanzan el tracto digestivo donde interactúan con las células de la mucosa intestinal. Como un resultado de esta interacción, los microorganismos inducen cambios en la membrana de las células M y los enterocitos que conducen a la entrada de la bacteria al interior. *Salmonella* atraviesa la barrera epitelial preferentemente a través de las células M, que son células especializadas del epitelio intestinal encargadas de “muestrear” antígenos intestinales mediante pinocitosis y transportarlos a las células linfoides asociadas a los parches de Peyer. Después de esto, *Salmonella* se ve asociada con células reticuloendoteliales y PMNs, que han sido reclutados al foco de la infección por la producción de quimioquinas y prostaglandinas por parte de las células epiteliales infectadas por *Salmonella*. Finalmente, tras alcanzar la lámina propia, donde se replican, las bacterias pueden caminar hacia tejidos más profundos presumiblemente transportadas dentro de macrófagos no activados. En la **figura 8** se resumen las principales etapas.

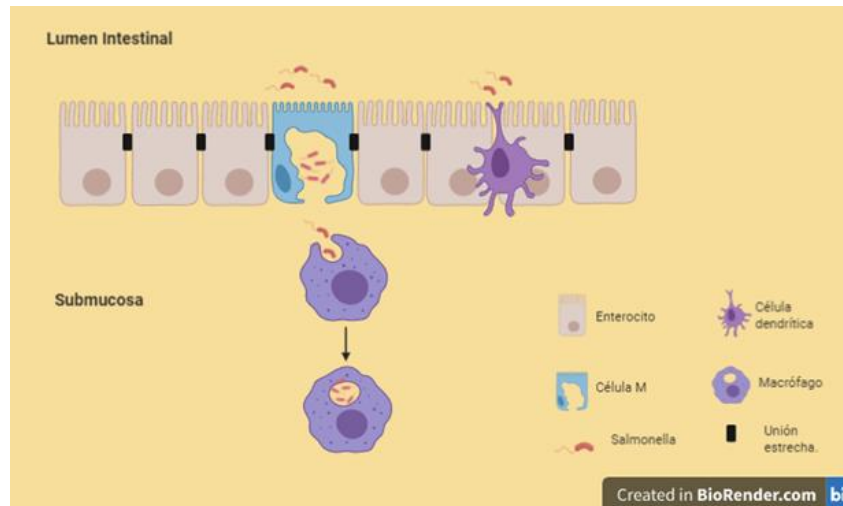


Figura 8. Modelo de patogénesis de *Salmonella* Typhimurium. *Salmonella* se adhiere al epitelio intestinal y es endocitada por estas células. Dentro de la célula, *Salmonella* va a replicarse dentro de vacuolas. Las bacterias llegan por transcitosis a la submucosa intestinal, donde podrán ser fagocitadas por fagocitos que han sido reclutados a esa zona, formándose de nuevo una vacuola parasitófora (principales células donde *Salmonella* se replica). Algunos fagocitos infectados van a viajar a través de la linfa y la sangre. Figura de elaboración propia.

5.2.1. Adhesión a las células epiteliales

Es esencial para que la infección tenga lugar. La interacción de la bacteria con las células epiteliales a través del mucus es mediada por pili o fimbrias. [Los pili son organelas adherentes semejantes a pelos que sobresalen de la superficie de la bacteria. Dado que los pili pueden ser utilizados como apéndices para transferir material genético durante la conjugación bacteriana (reproducción sexual), el término “fimbria” se utiliza con frecuencia para referirse a pili cuya función está dedicada al anclaje de la bacteria a una superficie]. Se han identificado al menos cuatro tipos de fimbrias, codificados por los genes: *lpf*, *fim*, *agf* y *pef*, implicadas en la adhesión de *S. Typhimurium* a células en cultivo. *Salmonella* expresa múltiples tipos de fimbrias con diferente especificidad de unión. Sin embargo, la disrupción de estos genes de fimbrias no suprime totalmente la virulencia de *Salmonella* en ratones, lo que sugiere que otros factores median la adhesión a las superficies epiteliales *in vivo*.

La redundancia en los factores de adhesión probablemente refleja los distintos tropismos y el amplio rango de células epiteliales intestinales y hospedadores que puede infectar *Salmonella*. Se han descrito diferentes operones para las fimbrias en los diferentes serotipos de *S. enterica*. Cada uno participa en adhesión a diferentes tipos celulares y su expresión responde a cambios ambientales como temperatura, osmolaridad, pH o disponibilidad de nutrientes.

5.2.2. Papel del sistema de secreción tipo III en la entrada de la bacteria en las células epiteliales

Estudios de microscopía electrónica de células animales infectadas indican que poco después de entrar en contacto con el epitelio intestinal *S. Typhimurium* induce cambios profundos en la membrana plasmática de las células infectadas mediante un mecanismo llamado disparador

Como elemento central de los mecanismos empleados por *Salmonella* para acceder al interior de células no fagocíticas está el sistema de secreción tipo III, que está codificado en la isla de patogenicidad 1 (SPI1) localizada en el centisoma 63 de su cromosoma (**Fig. 6**). La composición de nucleótidos (alto porcentaje GC) de esta isla de patogenicidad sugiere que estos genes han sido adquiridos por transferencia horizontal a partir de otro organismo algo muy común en los factores de patogenicidad de esta bacteria. Este suceso probablemente tuvo lugar en los primeros pasos evolutivos de *Salmonella*. Este sistema de secreción de proteínas tipo III está encargado de la secreción y translocación dentro de la célula del hospedador de una serie de proteínas bacterianas que tiene la capacidad de modular una gran variedad de funciones de la célula hospedadora. Entre estas funciones está la habilidad de *Salmonella* de reorganizar el citoesqueleto de actina de la célula hospedadora para inducir su propia internalización dentro de la célula no fagocítica, paso esencial para llevar a cabo su patogenicidad.

Estos sistemas de secreción tipo III están ampliamente distribuidos entre bacterias patógenas tanto de plantas como de animales. Estos sistemas están evolutivamente relacionados con el sistema de exportación y formación de flagelos en bacterias. Están compuestos por más de 20 proteínas y constituyen uno de los sistemas de secreción más complejos. Esta complejidad viene dictada por su función tan especializada, que no es sólo la de secretar proteínas a partir del citoplasma bacteriano sino que también las tiene que liberar en el interior de la célula hospedadora. Además, la complejidad aumenta por el hecho de que estas proteínas deben ser secretadas en un momento y ambiente precisos.

Una serie de componentes del sistema de secreción tipo III se ensamblan formando un organelo, llamado el “complejo aguja”, que atraviesa tanto las membranas interna y externa de la cubierta bacteriana (**Fig. 9**). Los mecanismos por los que este complejo media la liberación de proteínas efectoras dentro de la célula hospedadora no son conocidos. Otros componentes importantes de este sistema de secreción son las proteínas chaperonas, cuya función es ayudar al correcto plegamiento de las proteínas efectoras y evitar su degradación en el citoplasma bacteriano. Una ATPasa localizada en la base del complejo aguja, además de proveer la energía en el proceso de transporte, facilita la liberación de las chaperonas de las proteínas efectoras antes del transporte. Aunque el complejo aguja es muy similar en las diferentes bacterias, las proteínas efectoras son únicas para cada especie.

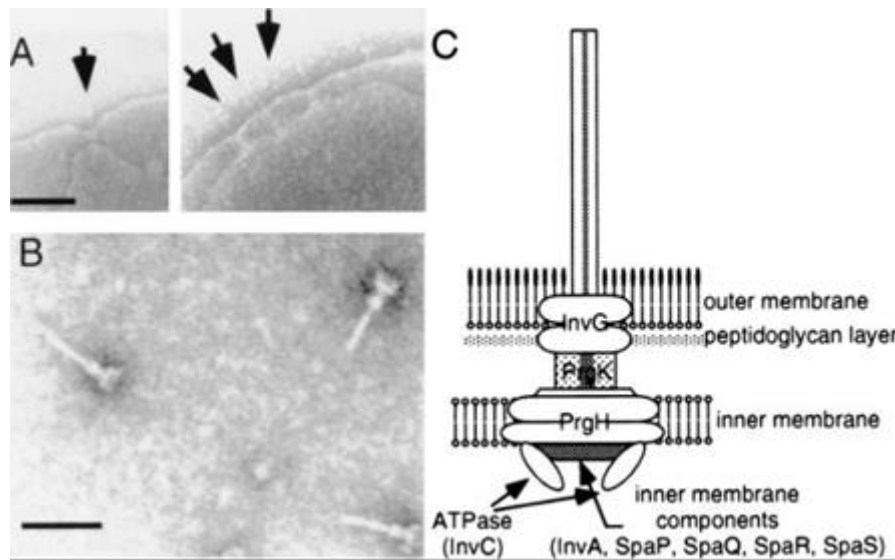


Figura 9. Complejo aguja de *S. Typhimurium* del sistema de secreción tipo III. **(A)** Microscopía electrónica de *S. Typhimurium* sometida a choque osmótico. Las flechas muestran los complejos aguja. **(B)** microscopía electrónica de los complejos aguja purificados. **(C)** Representación esquemática del complejo aguja y sus componentes. *Obtenida de Galan & Zhou (2000).*

No todas las proteínas efectoras secretadas a través del aparato de secreción tipo III, codificado dentro de SPI-1, están codificadas dentro de esta isla de patogenicidad. Así, la proteína SopE, cuyo papel es fundamental en la infección (ver más adelante), es parte del genoma de un bacteriófago que se encuentra integrado en ciertas cepas de *S. enterica*, como son los serovares Dublin y Typhi y algunas cepas del serovar Typhimurium.

Inmediatamente después de contactar con la célula hospedadora, *Salmonella* induce cambios rápidos en la organización del citoesqueleto de actina. La citocalasina D, una droga que desestabiliza el citoesqueleto de actina mediante la unión a los extremos positivos de los filamentos de actina, impide eficientemente la entrada de la bacteria, una indicación de que los reordenamientos de citoesqueleto inducidos por la bacteria son esenciales para el proceso de internalización. La modificación local del citoesqueleto es seguida por cambios grandes en la superficie de la célula hospedadora dando lugar a la aparición de grandes rugosidades en la membrana. Como una consecuencia, las células internalizan grandes partículas tal como bacterias en un proceso conocido como macropinocitosis.

Un importante hallazgo para entender las respuestas celulares que conducen a la internalización de la bacteria fue que Cdc42 y Rac, dos miembros de la subfamilia Rho de proteínas pequeñas de unión a GTP organizadoras de actina, eran esenciales para la entrada de *Salmonella* en la célula hospedadora. Estas pequeñas proteínas se pueden encontrar en dos estados, unidas a GDP (inactivas) y unidas a GTP (activas), en la conformación activa estas proteínas pueden unirse a una gran variedad de proteínas efectoras. Así, estas proteínas pueden verse como unos “interruptores moleculares” muy efectivos para controlar procesos de señalización de formas temporal y espacial. Así, se ha visto que las bacterias no pueden penetrar en células mutantes para estas GTPasas. La estimulación de estas GTPasas por *Salmonella* conduce a la activación de las proteín-quinasa activadas por mitógenos Jnk y p38.

De las proteínas efectoras que son inyectadas por el sistema T3SS-SPI1 (sistema de secreción tipo III de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*) se han identificado tres, SopE, SopE2 y SopB, que activan a las Rho GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoG, lo que a su vez conduce a la reorganización del citoesqueleto de actina, la aparición de arrugas en la membrana y la internalización mediante macropinocitosis. Consistente con esta actividad, la microinyección o la expresión transitoria de SopE en células conduce a marcadas reorganizaciones del citoesqueleto de actina y a cambios en la membrana semejantes a los que induce *Salmonella*.

Mientras SopE y SopE2 son potentes factores de intercambio de nucleótidos de guanina (“GEFs”) para las tres GTPasas, SopB estimula sólo a Cdc42 y RhoG de una forma indirecta mediante su actividad fosfoinosítido fosfatasa; aunque el mecanismo de acción de SopB no es conocido todavía. Además, SopB promueve la enfermedad intestinal estimulando la secreción de iones cloruro y el flujo de fluidos.

Es de destacar que la constante catalítica (Kcat) de SopE es de 10 a 100 veces mayor que la de los GEFs (*G-nucleotide exchange factors*) eucarióticos. Esta alta actividad va a asegurar la activación de una fracción significativa de las Rho GTPasas celulares poco después de su entrada en la célula.

La activación de las Rho GTPasas conduce a la activación de miembros de la familia WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome protein*), N-WASP y WAVE2, lo que produce el reclutamiento del complejo Arp2/3 (*actin-related protein-2/3*) a los sitios de membrana y la estimulación de la polimerización de actina (**Fig. 10**).

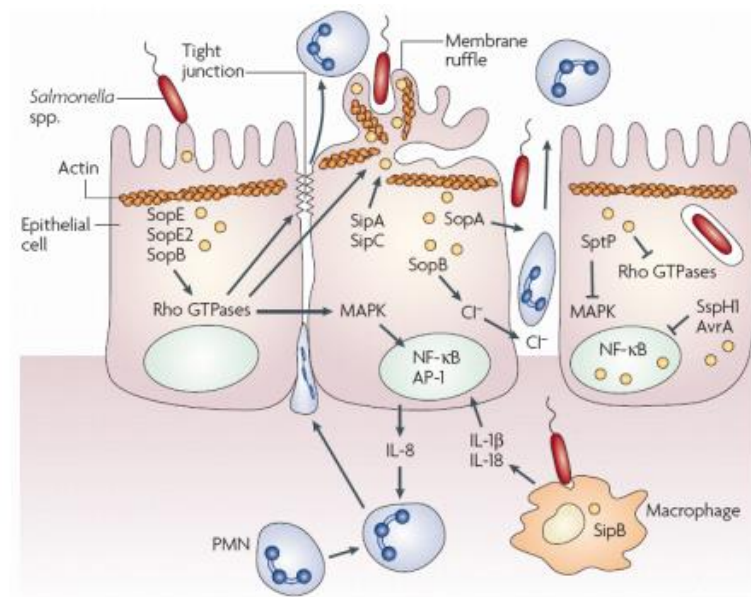


Figura 10: Cambios inducidos en la célula hospedadora tras la interacción del SST3 codificado en SPI-1 de *Salmonella*. Cuando entra en contacto con la célula epitelial, *Salmonella* ensambla su SST3 codificado en SPI-1 e inyecta efectores (esferas amarillas) en el interior del citoplasma eucariota. La acción de los efectores resulta en la formación de pliegues en la membrana y la desestabilización de las uniones estrechas entre los enterocitos. Cambios en el citoesqueleto de actina debidos a la acción de los efectores SipA y SipC, llevan a la internalización de las bacterias. Los procesos de señalización llevan a la secreción de moléculas que funcionan quimioatrayentes de leucocitos polimorfonucleares (PMN). La desestabilización de las uniones estrechas permite la trans migración de PMNs desde la región basolateral del epitelio a la apical, la pérdida de líquido de las células y el acceso de las bacterias a la lámina propia. Posteriormente, el citoesqueleto de actina se recompone y la cascada de señalización se apaga gracias a la acción enzimática de SptP. Esto resulta también en el silenciamiento de la respuesta inflamatoria, al cual también contribuyen SspH1 y AvrA mediante la inhibición de la activación del factor NF- κ B de la cascada de señalización. *Obtenida de Haraga et al. (2008).*

Para que la reorganización de los filamentos de actina sea eficiente en rodear la bacteria y promover su entrada, otras proteínas bacterianas participan en el proceso. SipA, otra proteína efectora inyectada a través del SPII-T3SS, colabora en el proceso de iniciación de la polimerización de actina. Esta es una proteína de unión a actina que inhibe la despolimerización de actina y activa a T-plasmina. Otra proteína efectora, SipC, participa en la nucleación y formación de haces de actina. Ambas proteínas contribuyen a la acumulación de filamentos de actina en el punto de contacto entre la bacteria y la célula hospedadora y facilitan la formación de rugosidades en la membrana promovidas por las GTPasas de la familia Rho.

Estudios de microscopía electrónica han puesto de manifiesto que poco después de la infección, la membrana de las células epiteliales infectadas por *Salmonella* recupera su apariencia normal. Sobre este efecto, otra proteína secretada por el sistema tipo III, llamada SptP, que es una tirosín fosfatasa parece estar implicada en este proceso. Así, se observa que el efecto inducido por SopE resulta bloqueado con la co-microinyección de SptP, lo que hizo pensar que esta proteína tendría una función antagonista sobre Cdc42/Rac-1.

Las proteínas G tienen una actividad GTPasa intrínseca que les permite a ellas “apagarse” después de la activación al alcanzar la conformación de unión a GDP (inactiva). Sin embargo, tal actividad intrínseca es muy baja salvo que se produzca en presencia de proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), las que estimulan la actividad GTPasa en varios órdenes de magnitud. Consistente con su función antagónica, SptP actúa como una potente GAP para Cdc42 y Rac-1. Esta función puede preservar la integridad de su nicho intracelular durante el suficiente tiempo como para permitir su replicación.

En resumen, la entrada de *Salmonella* en la célula hospedadora requiere de la acción coordinada de varias proteínas efectoras bacterianas que, una vez liberadas en la célula hospedadora, ejercen su acción de una forma coordinada temporalmente (**Fig. 11**). Así, la activación de Cdc42 y Rac por SopE y SopB conduce a la reorganización del citoesqueleto de actina, que es modulado adicionalmente a través de la actividad de la proteína de unión a actina SipA. SipA antagoniza las funciones del factor desestabilizador de actina (cofilina) y de la proteína que corta filamentos de actina (gelsolina), impidiendo, en conjunto, el desensamblaje de las fibras de actina formadas. A continuación, las respuestas celulares inducidas por la bacteria son revertidas por otra proteína efectora bacteriana, SptP, que contrarresta las actividades de SopB y SopE.

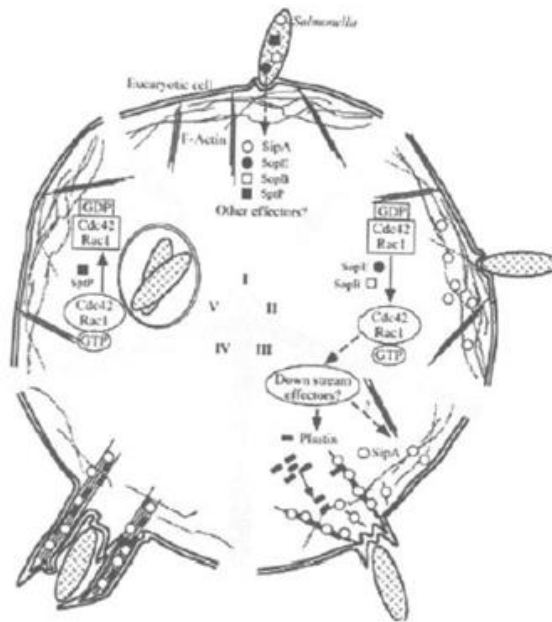


Figura 11. Modelo de los sistemas de secreción de *Salmonella* y función de cada uno de los factores. Los efectores secretados por SPI1-T3SS en el macrófago tienen diferentes funciones y la acción combinada de todos ellos resulta en la deformación de la membrana y entrada de *Salmonella* en la célula. Finalmente, la célula vuelve a recuperar la forma gracias a la acción de SptP entre otras. *Obtenida de Figueroa et al. (2005).*

Puede resultar llamativo que proteínas con funciones opuestas sean inyectadas a la vez en la célula blanco. Parece ser que, aunque son introducidas cantidades similares, SoplE es degradada de una forma rápida por una vía dependiente del proteasoma, mientras que SptP es más estable. Así, *Salmonella* explota la degradación dependiente de ubiquitina de la célula hospedadora para coordinar la función de sus proteínas efectoras. Esto hace que el efecto final es que, aunque ambas proteínas hayan sido inyectadas simultáneamente, actúen de una manera secuencial durante la interacción de *Salmonella* con su célula hospedadora.

Por tanto, la interacción de *Salmonella* con sus células hospedadoras es un ejemplo elocuente de lo sofisticado de los mecanismos empleados por los patógenos bacterianos que han mantenido una larga asociación con sus hospedadores. Tal sofisticación es el resultado de fuerzas evolutivas que han operado durante largos periodos de tiempo, conduciendo a una interacción bien balanceada que permite la replicación de la bacteria mientras impide un excesivo daño en el hospedador.

5.2.3. *Salmonella* promueve una respuesta inflamatoria que favorece la infección.

El epitelio de las mucosas discrimina entre las señales procedentes de organismos beneficiosos (comensales) y peligrosos (patogénicos). Las células epiteliales responden a patógenos ambientales a través de la liberación de moléculas señalizadoras tales como citoquinas proinflamatorias y quimioquinas. Como resultado de la continua interacción que existe entre el microbiota y las células epiteliales del intestino, se produce cierta migración de neutrófilos a través del epitelio, que es inducida por un quimioatrayente epitelial inducido por el patógeno (PEEC, *pathogen-elicited epithelial chemoattractant*) que es liberado apicalmente en respuesta a señales de peligro percibidas por las células epiteliales. Al mismo tiempo, se produce un incremento en la expresión de ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) sobre la superficie apical de los enterocitos mediando, así, la unión de los neutrófilos a las células epiteliales e impidiendo su liberación al lumen.

La activación de las Rho GTPasas por las proteínas efectoras SopB, SopE y SopE2 también conlleva la activación de las vías de las MAPK quinasas que, a través de la activación del factor NF κ B (*nuclear factor- κ B*) y de AP1 (*activator protein 1*), van a activar la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-8. Esta citoquina va a promover la migración transepitelial de los neutrófilos desde el lumen intestinal hasta la submucosa (**Fig. 12**). Por su parte, SipA, otra proteína efectora de la bacteria va a activar a la caspasa 3, que, a su vez, va a procesar proteolíticamente a SipA, y entonces la SipA procesada también va a contribuir a estimular la migración transepitelial de los neutrófilos.

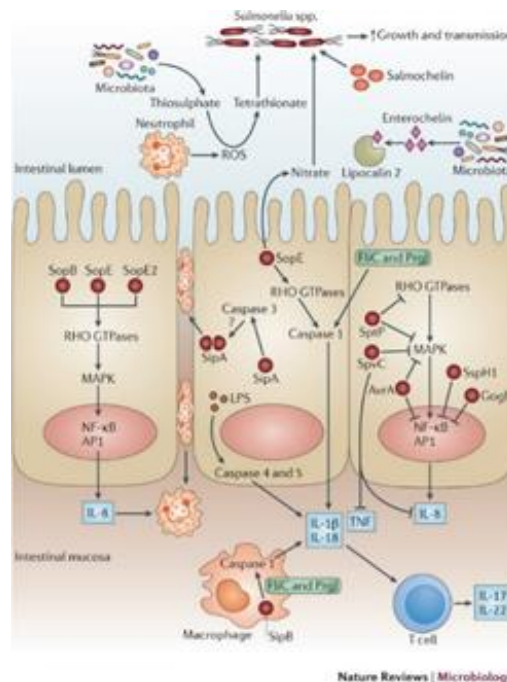


Figura 12. La inducción de la inflamación por *Salmonella* promueve su transmisión. La inflamación localizada en el tracto intestinal es importante para promover la transmisión de *Salmonella*. El mecanismo detallado está explicado en el texto. Obtenida de LaRock et al. (2015)

Por otro lado, la caspasa 1 de células epiteliales o de macrófagos infectados va a ser activada por las proteínas FliC (una flagelina) y PrgJ (una proteína estructural del sistema de secreción tipo III), y posiblemente también la proteína efectora SipB en macrófagos, lo que va a estimular la liberación de las citoquinas IL-1 β e IL-18. La activación de las Rho GTPasas por parte de SopE en células epiteliales también puede conducir a la activación de la caspasa 1. La liberación de IL-1 β e IL-18, a su vez, va a promover la síntesis de IL-17 e IL-22 por linfocitos T, lo que va a contribuir a aumentar la inflamación en la mucosa intestinal. IL-17 e IL-22 actúan atrayendo a los neutrófilos al sitio de infección. Además, una de las principales funciones de las citoquinas IL-17 e IL-22 es la de inducir la expresión por las células del intestino de proteínas antimicrobianas, entre las que se encuentran las proteínas quelantes de metales, lipocalina-2 y calprotectina. Mediante la liberación de estas proteínas, el hospedador limita la disponibilidad de iones metálicos en el intestino como una estrategia para impedir el crecimiento de los microbios patógenos. La lipocalina-2 es producida por las células epiteliales y los neutrófilos que son reclutados, y su secreción va a disminuir el acceso de las bacterias al hierro al secuestrar a las pequeñas moléculas, conocidas como sideróforos, que son liberadas por las bacterias para captar hierro. De igual manera, la calprotectina, un heterodímero de las subunidades S100A8 y S100A9, es producida por las células epiteliales y los neutrófilos, y ejerce su actividad antimicrobiana a través de secuestrar zinc y manganeso. Sin embargo, *Salmonella* expresa un sideróforo (salmoquelina) que no es unido por la lipocalina-2; así, la lipocalina 2 secuestra a la enteroquelina (un sideróforo que une hierro, producido por muchas bacterias de la microbiota), pero no al sideróforo salmoquelina. Por otro lado, posee un transportador de zinc de alta afinidad que permite al patógeno captar zinc aun en presencia de calprotectina.

La activación de la caspasa-1 por SipB en macrófagos conduce también a inducir la muerte celular a través del mecanismo de piroptosis, que conlleva la simultánea activación de una fuerte respuesta inflamatoria. La activación de esta vía por *S. Typhimurium* se ha visto que es fundamental para la diseminación de la infección desde el sitio de entrada a otros órganos. Como refuerzo experimental se encuentra el hecho de que ratones deficientes (*knockout*) en caspasa-1 son muy resistentes a la infección por *Salmonella* administrada por vía oral. En consecuencia, la finalidad de inducir la activación de la caspasa-1 por *S. Typhimurium* es la de inducir una respuesta inflamatoria que va a favorecer el reclutamiento de células inmunitarias que van a ayudar a expandir la infección.

SopE también induce la producción de nitrato por las células hospedadoras, que es utilizado por *Salmonella* en el proceso de respiración. Además, como consecuencia de la inducción de una respuesta inflamatoria, los neutrófilos van a liberar especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*). Los altos niveles de ROS y RNS producidos por los neutrófilos van a generar un ambiente oxidativo que no es permisivo para el crecimiento de Clostridiales y Bacteroidetes, filos de bacterias anaerobias estrictas que constituyen alrededor del 90% del microbiota intestinal. En consecuencia, la disminución de estas poblaciones que se produce durante la infección de *Salmonella*, y dada la resistencia de ésta a estas condiciones oxidativas, va a ser un factor que favorece la replicación de la bacteria. La resistencia de *Salmonella* a estas ROS y RNS y su correspondiente estrés oxidativo viene dada por múltiples estrategias como:

- Presencia de enzimas superóxido dismutasas (SodA y SodCI), catalasas (KatE) y tiol oxidasas (Tpx).
- Formación de enlaces disulfuro periplasmáticos por los sistemas tiorredoxina.
- Transporte de factores para desintoxicar enzimas.
- Sistemas captadores de hierro (Hmp).
- Regulación negativa de la respuesta inflamatoria.

Las especies reactivas de oxígeno van a reaccionar con el tiosulfato (que es generado por la actividad respiratoria del microbiota) transformándolo en tetracionato, que puede ser utilizado por *Salmonella*, pero no por el microbiota habitual del intestino. *Salmonella* es capaz de utilizar al tetracionato como aceptor final de electrones, lo que favorece el crecimiento de la bacteria en un ambiente anaeróbico. Por otro lado, entre las RNS producidas durante la inflamación está el peroxinitrito que espontáneamente isomeriza en nitrato, que también puede ser utilizado por *Salmonella* como un aceptor final de electrones durante la respiración.

Todos estos procesos van a favorecer el crecimiento de *Salmonella* presente en el lumen intestinal y su transmisión.

Finalmente, la respuesta inflamatoria es apagada por las actividades de varias proteínas efectoras (SptP, SpvC, AvrA, SspH1 y GogB), pero los mecanismos a través de los que llevan a cabo estos efectos no son conocidos en su totalidad. Se sabe que SptP, una proteína multifuncional, también está implicada en una inhibición de la respuesta proinflamatoria inducida durante la invasión. Esta proteína tiene actividad tirosín-fosfatasa, lo que va a conducir a la desactivación de la MAPK Erk. Otra proteína efectora, SspH1, también ayuda en el proceso; SspH1, una proteína con repeticiones LRR (*leucine-rich repeat*), se localiza en el núcleo de la célula invadida e inhibe la expresión génica dependiente del factor NF- κ B.

En resumen, la estimulación de las GTPasas Rho por *Salmonella* conduce a dos respuestas claramente definidas:

- Reorganizaciones del citoesqueleto de actina que conducen a la “toma” de la bacteria
- Estimulación de las vías de las proteín-quinasa activadas por mitógenos que conducen a inducir respuestas inflamatorias que, además de ser responsables de los síntomas de gastroenteritis que acompañan a la infección, van a favorecer la expansión de la infección (**Fig. 10**)

SopB (proteína efectora inyectada a través del SPI1-T3SS) también contribuye a agudizar los síntomas de la enfermedad intestinal al aumentar la concentración intracelular de D-mio-inositol 1,4,5,6-tetrafosfato, un compuesto que estimula la secreción de cloro y el flujo de fluidos desde las células del epitelio intestinal.

5.2.4. Multiplicación de *Salmonella* en el interior de la vacuola

Una vez que se produce la entrada en la célula, *Salmonella* se va a localizar en una vacuola que va a experimentar modificaciones importantes en su superficie, por lo que es denominada SCV (“*Salmonella*-containing vacuole”). En las células epiteliales, esta SCV adquiere marcadores lisosomales, como son LAMP1 (“lysosome-associated membrane protein 1”), RAB7, ATPasa vacuolar y colesterol.

RAB7 interacciona con RILP (“RAB interacting lysosomal protein”) y la proteína del motor microtubular dineína, lo que va a favorecer el movimiento de la SCV a posiciones más centrales en la célula (**Fig. 13**). En ese momento, la bacteria va a secretar una serie de proteínas efectoras a través del sistema de secreción tipo III de la SPI-2. Estas proteínas efectoras van a alterar el tráfico vesicular, de tal manera que moléculas metabólicamente importantes, como aminoácidos y lípidos, van a ser dirigidos a la vacuola SCV; además de proveer material membranoso para incrementar el tamaño de la vacuola.

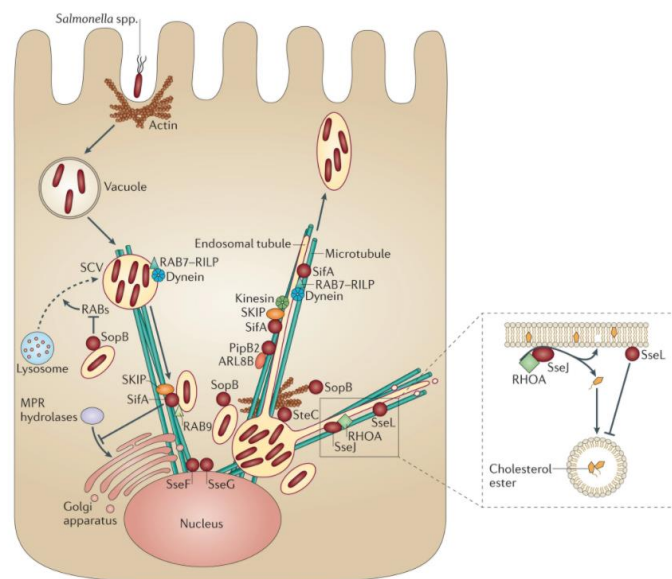
Probablemente con la finalidad de aumentar la superficie de intercambio, la bacteria va a inducir la formación de prolongaciones tubulares de la SCV. La proteína efectora SifA va a interactuar con la proteína celular SKIP (“kinesin interacting protein”), que va a activar a la proteín-quinasa (kinesina) del motor microtubular para la formación de estas extensiones tubulares.

Durante la maduración de la vacuola SCV, en un proceso también dependiente de la actividad del SPI2 T3SS, la bacteria induce la formación de una malla de actina alrededor de la vacuola y que parece ayudar a mantener la integridad de la misma. La importancia de esta modificación del citoesqueleto resulta evidente de experimentos con inhibidores de la polimerización de actina; en presencia de estos inhibidores, la bacteria termina accediendo al citoplasma donde no es capaz de replicarse.

Por otro lado, la migración de la SCV a una posición perinuclear, en proximidad con el aparato de Golgi, va a facilitar una mejor intercepción de vesículas de transporte (endocítico y exocítico) para así obtener nutrientes y componentes membranosos.

La proteína SopB, mediante su actividad fosfatasa, reduce la carga de la membrana de la SCV, lo que va a limitar la presencia de moléculas RABs, y la fusión de nuevos lisosomas. La unión de SifA a RAB9 también va a contribuir a bloquear la fusión de lisosomas a la SCV.

También se ha visto que en fases avanzadas de la multiplicación intracelular la SCV migra desde su localización perinuclear hacia la periferia, lo que podría favorecer una fusión con la membrana celular y la liberación de la bacteria al lumen intestinal desde donde podría infectar a otras células epiteliales.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 13. Manipulación del sistema de membranas de la célula hospedadora por parte de *Salmonella*. Tras la entrada, la bacteria pasa a residir en la SCV, una vacuola que acaba adquiriendo marcadores lisosomales como LAMP1, RAB7, la V-ATPasa y colesterol. Estas proteínas van a modificar el citoesqueleto y el tráfico vesicular, para aumentar el aporte de nutrientes y la resistencia de la vacuola. En fases avanzadas de la multiplicación, la vacuola migra hacia la periferia de la célula desde donde la bacteria sale para infectar otras células. *Obtenida de LaRock et al. (2015)*

5.3. Regulación de la expresión de los genes de virulencia.

Salmonella tiene que adaptarse a cambios ambientales drásticos cuando pasa a lo largo del tracto digestivo y cuando se mueve desde el medio extracelular al intracelular. Durante este proceso, la bacteria va a modular su metabolismo, expresando componentes protectores y produciendo factores tóxicos.

La expresión de los genes de virulencia va a ser dictada por factores ambientales, que actuando sobre vías de regulación génica van a iniciar el proceso de invasión y patogénesis. Se han descrito un número grande de proteínas reguladoras que establecen una compleja red. En la figura 12 se muestra la red de regulación que opera sobre la isla de patogenicidad 1. A continuación se describen los principales factores de regulación.

- HilA es un activador transcripcional que pertenece a la familia OmpR/ToxR; está codificado en la SPI-1 y se autorregula de forma negativa. Este regulador desempeña un papel central y, de hecho, una delección del gen *hila* es equivalente a la delección completa del locus SPI-1. HilA también es un activador transcripcional del operón SPI-4 y del gen *sigD* (SPI-5). En cambio, HilA tiene un efecto represor sobre la expresión de los genes SPI-2.

La expresión de HilA está controlada por tres activadores transcripcionales de la familia AraC: HilC y HilD (ambos codificados en la SPI-1), y RtsA. Cada uno de estos activadores se une al promotor de *hila* y también tienen un efecto autoactivador de su propia expresión.

El regulador negativo más importante de la expresión de HilA es HilE. Se encuentra codificado fuera de la SPI-1. La interacción con la proteína HilD parece ser el mecanismo por el que ejerce su efecto represor de la expresión de *hila* (**Fig. 14**).

- Una vez dentro de la vacuola, *Salmonella* va a activar la expresión génica de factores que contrarresten los efectos dañinos del ambiente fagosomal. Con este fin, *Salmonella* cuenta con el sistema PhoPQ que va a “sentir” los cambios ambientales que se producen en la vacuola que contiene a la bacteria.

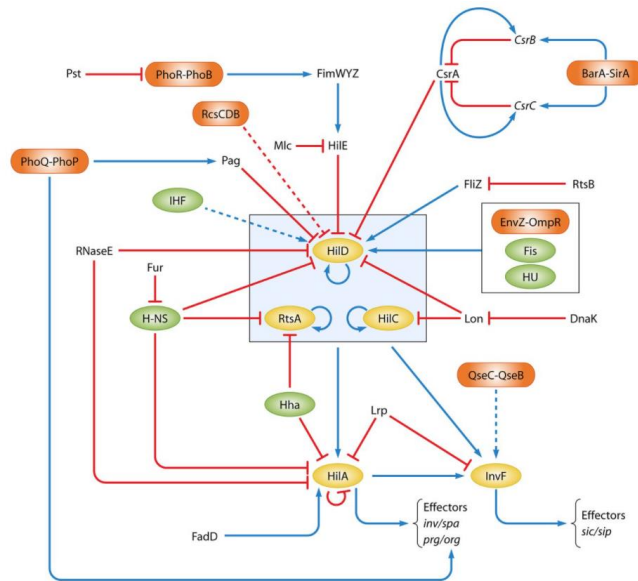


Figura 14. Red de regulación de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). Las flechas azules indican activación mientras que las flechas rojas indican inhibición. Las flechas discontinuas sugieren la regulación putativa de la diana propuesta en este modelo. La activación de IHF se deduce que es mediada por HilD y por Fis y HU, de acuerdo con la información proporcionada en el texto. El efecto represor PhoQ-PhoP en los genes prg, podría ocurrir mediante la represión de HilA por medios de represión postranscripcional de HilD, puesto que no se ha reportado ningún efecto directo en estos genes SPI1. De acuerdo con este modelo, todos los 2CRSs (factores codificados en la región CRS del plásmido de virulencia) ejercen su efecto mediante HilD, a excepción de QscC-QscB, que se sabe actualmente que afecta sólo a InvF. Por esta razón, hemos usado una flecha discontinua, a pesar de la posibilidad de que también esté actuando a nivel de HilD. Es más, la mayoría de las señales de regulación son integradas a nivel de HilD, principalmente por la modulación postranscripcional, que conlleva la jerarquía de los reguladores codificados por SPI-1. *Obtenida de Fàbrega et al. (2013)*

Los sistemas reguladores de dos componentes son empleados por los microorganismos para sentir y responder a los cambios del ambiente. Por lo general, estos sistemas están formados por una histidina quinasa, que siente un determinado estímulo ambiental, y un regulador que media la respuesta celular, principalmente a través de la expresión diferencial de ciertos genes. En respuesta a una determinada señal ambiental, la proteína sensor se autofosforila en un residuo de histidina localizado en el dominio transmisor. A continuación, el grupo fosforilo es transmitido a un aspartato localizado en un dominio receptor de la molécula reguladora. Los reguladores también contienen un dominio efector, que tras la fosforilación adquiere una mayor afinidad por el DNA y su unión va a conducir a una modificación de la transcripción de los genes blanco.

El sistema PhoPQ está compuesto de un sensor unido a membrana, la quinasa PhoQ (también denominada PagJ), y el regulador de respuesta PhoP (o PagK), que es citosólico (**Fig. 15**). PhoQ es una proteína de membrana con un dominio sensor situado en el periplasma y un dominio quinasa situado en el citoplasma. La activación de PhoQ en respuesta a señales ambientales específicas (bajo pH o la presencia de CAMPs) conduce a una autofosforilación de PhoQ y una posterior transferencia del grupo fosfato a PhoP. La forma Fosfo-PhoP va a activar o reprimir la transcripción de alrededor de 200 genes. Entre los genes que se reprimen están el sistema de secreción tipo III (de la SPI-1) y los genes codificantes para proteínas del flagelo. En cambio, PhoPQ activa muchos genes de virulencia entre los que se encuentran el sistema de secreción tipo III (de la SPI-2), muy importante en la modificación de la vacuola a un nicho favorable para la replicación de la bacteria.

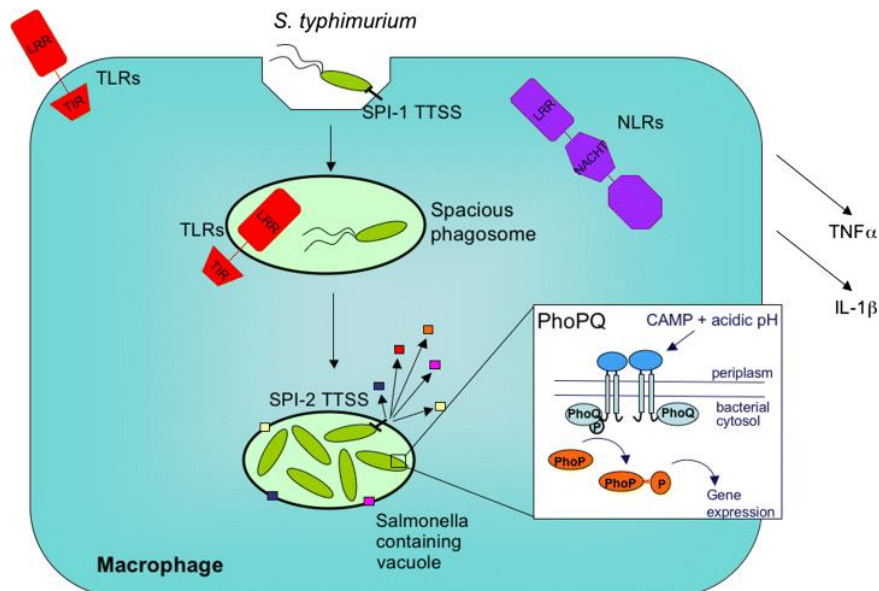


Figura 15. Supervivencia de *Salmonella* en el interior del macrófago. Siguiendo la entrada mediada por SPI-1, *Salmonella* se encuentra en un fagosoma. A medida que la infección progresa, el ambiente fagosomal activa el sistema PhoQ, mostrado en el panel. PhoQ activa muchos genes de virulencia, incluyendo el SPI-2 TTSS, que se encuentra involucrado en la remodelación de la vacuola para ser un nicho replicativo, es decir, un lugar donde la bacteria se divide a gusto. Mientras tanto, los receptores de los macrófagos de la respuesta inmunitaria innata, los TLRs y NLRs, reconocen los ligandos bacterianos y causan secreción de señales inflamatorias, incluyendo IL-1β y TNF-α. Obtenida de Prost et al. (2007).

6. INTERACCIÓN DE SALMONELLA CON LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs) constituyen el eslabón entre la inmunidad innata y la adaptativa. En el estado normal, las DCs se encuentran estratégicamente localizadas en tejidos periféricos que están expuestos a la infección por patógenos. En estos sitios, las DCs actúan de centinelas para la detección de cualquier microbio invasor. Las DCs, a través de receptores específicos tales como los TLRs (“Toll-like receptors”), reconocen a los PAMPs (“Pathogen-associated molecular patterns”) bacterianos. Antes del reconocimiento de los PAMPs, las DCs están en un estado inmaduro, en el que son muy eficientes en la captura de antígenos microbianos a través de fagocitosis. Como una consecuencia del reconocimiento de los PAMPs, las DCs experimentan cambios metabólicos y fenotípicos conocidos como maduración, entre los que se encuentran:

- Una disminución en su capacidad fagocítica
- Una expresión aumentada de moléculas de superficie requeridas para una activación eficiente de células T “naive” específicas de antígeno; entre otras, se aumenta la expresión en superficie de moléculas MHC-I y -II.

Además, durante la maduración, las DCs adquieren la capacidad para migrar desde los tejidos periféricos a los órganos linfoides secundarios, donde residen las células T “naive”. En los nódulos linfáticos, las DCs activan a las células T mediante la presentación de antígenos microbianos acoplados a MHC al tiempo que se activan vías de señalización a través de moléculas coestimuladoras. Así, las DCs activan células T específicas de antígeno que promueven el establecimiento de eficientes respuestas inmunitarias adaptativas celulares y humorales, encaminadas a frenar la proliferación y diseminación de los microbios en el hospedador. En este proceso de activación también son secretadas varias citoquinas que son importantes para el propio proceso de activación.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia que las DCs, situadas en los sitios de entrada de *Salmonella*, desempeñan en la diseminación de la bacteria. Estudios *in vivo* han mostrado que las DCs son capaces de captar *S. Typhimurium* en el sitio de infección. Además, se ha visto que la flagelina de *Salmonella* induce la secreción, por parte de las células epiteliales, de la citoquina CCL20, que es quimioatrayente de DCs inmaduras. El lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella* también se ha visto que es capaz de inducir la maduración y migración de DCs. Dado que las DCs son capaces de captar a *S. Typhimurium* y responder a los PAMPs derivados de este patógeno, iniciando su maduración y migración desde los sitios periféricos de infección a los tejidos linfoides, parece que en estos primeros momentos *S. Typhimurium* no interfiere significativamente con la función de las DCs. Esta migración hacia tejidos más profundos representa una ayuda para la diseminación sistémica de estos patógenos bacterianos (**Fig. 16**).

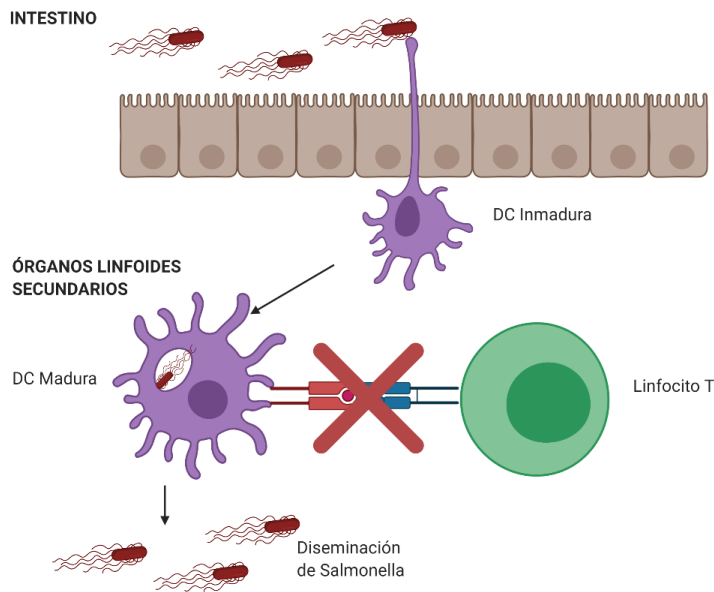


Figura 16. Uso de las células dendríticas como “caballos de Troya”

Sin embargo, aunque las DCs infectadas con *Salmonella* son capaces de llegar a los nódulos linfoides, éstas no son capaces de iniciar una respuesta inmunitaria efectiva frente a la bacteria, probablemente porque las DCs infectadas tienen una capacidad reducida para activar a las células T “naive” específicas frente a *Salmonella*. Se ha encontrado que la infección por *S. Typhimurium* reduce la expresión de moléculas MHC en la superficie de las células dendríticas, tanto humanas como de ratón. En consecuencia, *Salmonella* ha evolucionado adquiriendo mecanismos moleculares que permiten secuestrar a las DCs y usarlas como vehículos (caballos de Troya) para expandirse sistémicamente.

Una vez dentro de las DCs, *S. Typhimurium* es capaz de sobrevivir en estas células durante largos periodos de tiempo, residiendo en vacuolas especializadas. Hay varias evidencias experimentales que indican que *Salmonella* interfiere en el proceso de fusión fagosoma/lisosoma en las DCs. Además, para este proceso se requiere de la inoculación a través del sistema de secreción tipo III (codificado en la SPI-2) de proteínas efectoras en el citoplasma de las DCs. Entre las proteínas bacterianas responsables de este efecto está la proteína SpiC, una proteína ácida codificada en la SPI-2 y que es introducida en el citoplasma de la célula hospedadora a través del sistema de secreción tipo III también codificado en el SPI-2. De esta manera se interfiere con la presentación de antígenos por las DCs y la no activación de respuestas de células T específicas, lo que va a favorecer la expansión sistémica de esta bacteria.

7. EVOLUCIÓN DE SALMONELLA EN SU ADAPTACIÓN AL HOSPEDADOR

Los datos derivados del análisis de la evolución de los diferentes serotipos de *Salmonella* sirven para ilustrar aspectos importantes tales como el origen de las enfermedades infecciosas y la emergencia de nuevos patógenos, y cómo las bacterias son capaces de, atravesando la “barrera de especies”, adaptarse a nuevos hospedadores, con los que llegan a establecer relaciones muy especializadas.

De acuerdo con la divergencia de secuencia entre genes ortólogos de diferentes serotipos de *Salmonella* y teniendo en cuenta su origen clonal, se ha estimado que el ancestro común del género debió existir hace unos 25 a 40 millones de años. Por otro lado, se considera que las especies *E. coli* y *S. enterica* compartieron un mismo ancestro hace unos 100 millones de años.

Se ha propuesto que la virulencia en el género *Salmonella* ha debido evolucionar en tres etapas (**Fig. 17**). La primera fase consistió en la adquisición de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1) mediante transferencia génica horizontal mediada por fagos o plásmidos. SPI1 debió ser adquirida por alguna línea ancestral de todos los serotipos de *Salmonella*, dado que está presente en todas las líneas filogenéticas del género *Salmonella*, pero ausente de *E. coli* y otros organismos relacionados.

SPI1 codifica para los factores de virulencia que median los mecanismos empleados por los serotipos de *Salmonella* durante su fase intestinal de infección, incluyendo la invasión de las células del epitelio intestinal, la inducción del reclutamiento de neutrófilos y la secreción de fluidos intestinales.

El análisis comparativo de secuencias de genes codificantes y genes rRNA ha revelado que el género *Salmonella* consta de dos linajes, que se han propuesto como dos especies distintas, designadas *S. enterica* y *S. bongori* (**Fig. 17**). La formación de estas dos especies puede considerarse como una segunda fase en la evolución de la virulencia en el género *Salmonella*, dado que en el paso de separación de ambas especies tuvo lugar la adquisición de nuevos determinantes de virulencia mediante transferencia génica horizontal.

Los serotipos de *S. enterica* poseen una segunda isla de patogenicidad, designada SPI2, que no está presente en los serotipos de *S. bongori*. Un posible mecanismo para la adquisición de SPI2 mediante transferencia horizontal se sugiere por su inserción en el gen que codifica para el tRNA^{Val}, una región de DNA que facilita la integración de material genético dado que los genes tRNA sirven como sitios de anclaje para las integrasas de los bacteriófagos.

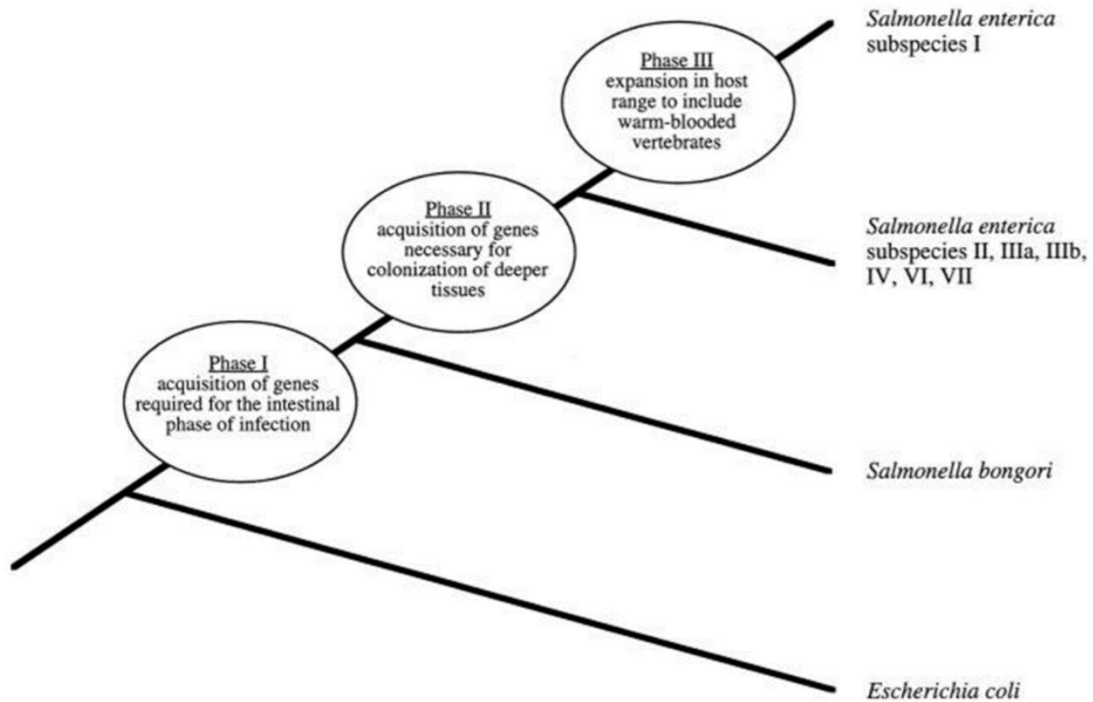


Figura 17. Modelo de la evolución de la virulencia en el género *Salmonella*, desarrollada en 3 fases desde la divergencia con la línea de *E. coli*. El árbol filogenético no está a escala. Obtenida de Baumlér et al (1998).

Experimentos realizados en ratones revelaron que las mutaciones en SPI1 atenúan al serotipo *Salmonella* Typhimurium entre 15 y 50 veces después de la inoculación oral, pero no muestran ningún fenotipo atenuado cuando la fase intestinal de la infección es evitada mediante la inyección intraperitoneal. En contra, mutantes en SPI2 atenúan al serotipo *Salmonella* Typhimurium más de 10.000 veces, aunque se realice una inoculación intraperitoneal. Estos datos indican que los genes de virulencia localizados en SPI1 y SPI2 se requieren en fases diferentes, durante las fases intestinal y sistémica, respectivamente, de la infección.

La SPI2 tiene un tamaño de 40-kb y por análisis de secuencia se ha estimado que existen 42 fases de lectura abierta (**Fig. 18**). Muchos de los genes del locus SPI2 muestran similitud de secuencia con proteínas de los sistemas de secreción tipo III y se ha propuesto una nomenclatura para estos genes que refleja su posible función. Así, los genes que codifican para los componentes del aparato de secreción de tipo III se designan como *ssa* (“Secretion System Apparatus”), los genes que codifican para proteínas sustrato tipo III y sus chaperonas específicas se designan como *sse* (“Secretion System Effector”) y *ssc* (Secretion System Chaperone), respectivamente. Los genes que codifican para proteínas reguladoras de los genes de virulencia SPI2 se llaman *ssr* (“Secretion System Regulator”).

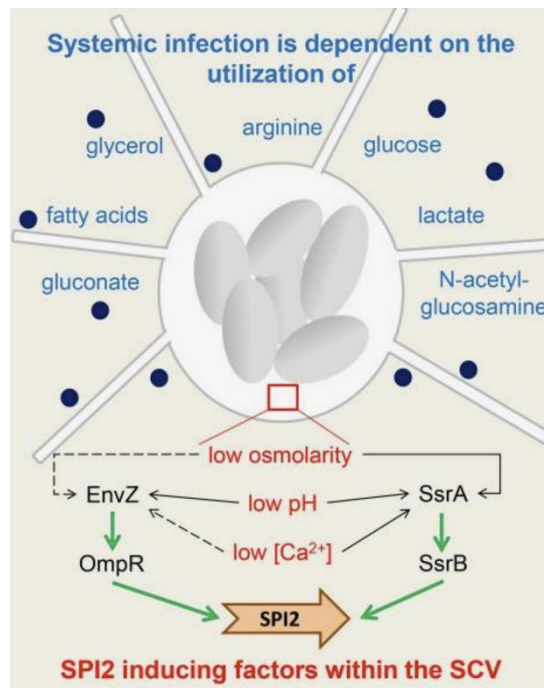


Figura 19. Requerimientos nutricionales de *Salmonella* en el interior celular y adaptaciones regulatorias. En gris se representa la vacuola SCV y los filamentos inducidos por *Salmonella*. En azul se indican los sustratos requeridos por la bacteria para generar la infección, y los puntos azul oscuro representan las proteínas efectoras de la SPI2. En la parte inferior de la imagen, en rojo, se indican las condiciones del medio que inducen la expresión de los genes de la SPI2, mientras que las flechas muestran la interrelación entre dichos factores y la expresión de los dos sistemas primarios de SPI2: EnvZ/OmpR y SsrAB. Obtenida de Srikanth et al. (2011)

En resumen, en *S. enterica* se da una situación única: existen dos sistemas de secreción tipo III implicados en importantes estrategias de virulencia. El sistema codificado por SPI1 es de importancia fundamental para las funciones de virulencia relacionadas con la interacción con las mucosas, tal como la invasión de las células epiteliales, la inflamación y la inducción de diarrea. En cambio, el sistema codificado por SPI2 se activa bajo condiciones intracelulares y se requiere para la supervivencia y proliferación intracelulares de *Salmonella* (Fig. 20). Así, SPI2 representa un ejemplo de un sistema de secreción tipo III empleado para modificar el destino de un patógeno intracelular.

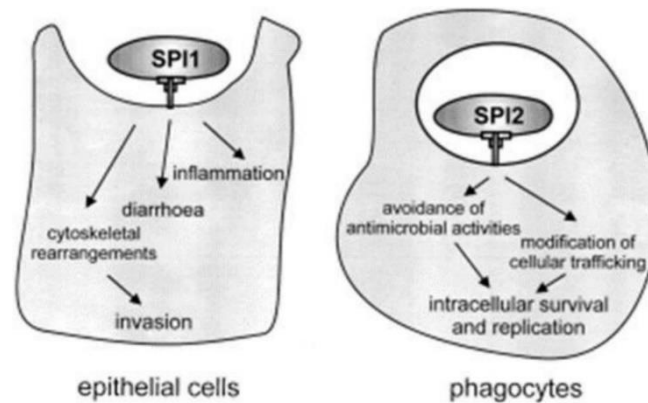


Figura 20. Interacción entre *Salmonella* y las células hospedadoras. *S. enterica* ha desarrollado dos estrategias de virulencia utilizando sistema de secreción. La función del Sistema de Secreción T3 codificado por SPI-1 es necesaria para invadir las células hospedadoras y da lugar a la aparición de diarreas. Por otro lado, el Sistema de Secreción T3 codificado por SPI-2 en respuesta a señales presentes en el fagosoma permite a *Salmonella* sobrevivir y replicarse dentro de las células. Obtenida de *Hensel (2000)*.

Finalmente *S. entérica* se ha dividido en varios grupos filogenéticos, que se consideran como subespecies: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subsp. I), *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (subsp. II), *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (subsp. IIIa), *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (subsp. IIIb), *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (subsp. IV), y *Salmonella enterica* subsp. *indica* (subsp. VI). La especie *S. bongori*, durante mucho tiempo, se clasificó como una subespecie, la V, de *S. enterica*.

La aparición de uno de estos grupos, *S. enterica* subespecie I, supuso una expansión brusca en el rango de hospedador: mientras que *S. bongori* y las subespecies II, IIIa, IIIb, IV, VI y VII de *S. entérica* están asociadas a vertebrados de sangre fría, los miembros de *S. entérica* subespecie I se aíslan más frecuentemente de aves y hospedadores mamíferos. La adaptación de hospedador de *S. entérica* subespecie I a vertebrados de sangre caliente constituye una tercera fase en la evolución de virulencia del género *Salmonella* (**Fig. 14**).

¿Qué nuevas barreras se encuentran los serotipos de *S. enterica* subespecie I en aves y mamíferos? El sistema inmunitario está más desarrollado y muestra una mejor organización en vertebrados superiores que en los vertebrados de sangre fría. Por ejemplo:

1. Los nódulos linfoides asociados al tubo digestivo de mamíferos y aves están organizados en órganos complejos como los parches de Peyer, las amígdalas, el apéndice o la bolsa de Fabricio en las aves, mientras que esta asociación no existe en los vertebrados de sangre fría. Los nódulos linfáticos periféricos de vertebrados superiores actúan como sistemas de filtración de patógenos, lo que limita la expansión de los mismos.

2. En aves y mamíferos, las variantes de linfocitos B pueden aparecer después de hipermutación somática y son seleccionadas en los centros germinales de los órganos linfoides al aumentar la afinidad por el antígeno. Por lo contrario, como los vertebrados de sangre fría carecen de estos centros germinales, la afinidad de los anticuerpos no aumenta durante la respuesta inmunitaria. Así, el repertorio de anticuerpos de los vertebrados inferiores (peces, anfibios y reptiles) es mucho menor que en los mamíferos. Las células B seleccionadas en los centros germinales de los vertebrados superiores muestran cambio isotípico y se acumulan como células de memoria. En vertebrados de sangre fría, por otro lado, la memoria inmunológica está pobremente desarrollada y la inmunización repetida con *S. enterica* induce sólo la producción de anticuerpos IgM en reptiles, lo que indica que el cambio de isotipo no ocurre durante la infección con este patógeno.

Dado que los macrófagos de las distintas especies de animales homeotérmicos difieren en su capacidad para neutralizar un serotipo particular de *S. enterica*, la adaptación a nuevos hospedadores debe requerir la adaptación a sus fagocitos mononucleares (**Tabla 1**). Por ejemplo, el serotipo Typhi es capaz de sobrevivir *in vitro* en macrófagos humanos pero no en macrófagos de ratón, mientras que el serotipo Typhimurium, que causa una enfermedad sistémica en ratones, sobrevive bien *in vitro* en macrófagos de ratón pero no en macrófagos humanos. Así, parece que los fagocitos mononucleares son una barrera importante que restringe el rango de hospedador de los serotipos de *S. enterica*.

Aunque *S. enterica* subespecie I contiene 1.531 serotipos diferentes, sólo uno o unos pocos se encuentran asociados a los casos de enfermedad de una especie particular de ave o de mamífero (**Tabla 1**). Los serotipos se establecen en base a las diferencias antigénicas en el antígeno de superficie O (lipopolisacárido o LPS) y el antígeno H (flagelar). Estos serotipos muestran diferentes grados de adaptación al hospedador. Los patógenos que carecen de especificidad de hospedador, tales como los serotipos Typhimurium y Enteritidis, tienden a estar más frecuentemente asociados con la enfermedad en animales jóvenes, sugiriendo que no están adaptados de forma óptima para enfrentarse con un sistema inmunitario maduro. Los serotipos que son específicos de hospedador, por otro lado, han adquirido la capacidad de romper los mecanismos de defensa en animales maduros, como indica su asociación, con similares índices, con la enfermedad en todos los grupos de edad. Además, los serotipos específicos de hospedador tienden a ser más virulentos como lo ilustra el hecho de que causen mayores índices de mortalidad.

Muchos de los genes codificantes para proteínas efectoras asociadas a patogenicidad se encuentran en locus correspondientes a bacteriófagos, tanto crípticos como funcionales, lo que indica que estos genes efectores constituyen un conjunto dinámico y móvil de genes asociados a virulencia. La combinación de genes efectores en los distintos serotipos de *Salmonella* va a contribuir a la especificidad de hospedador y a la severidad de la enfermedad que son característicos de los diferentes serotipos.

Otras diferencias entre los diferentes serotipos de *Salmonella* parecen radicar en los llamados plásmidos de virulencia. Sin embargo, hasta el momento no se conoce el o los organismos de procedencia de estos plásmidos. Además de la transferencia horizontal, sucesos de delección y de divergencia de secuencia por mutaciones puntuales son también eventos que han contribuido a cambios en los rangos de hospedador de los serotipos de *S. enterica*.

Especie huésped	Enfermedad	Serotipos de la subespecie I de <i>S. enterica</i> más frecuentes	Grupos de edad más susceptibles	Manifestaciones clínicas y síntomas comunes
Humano	Enteritis por <i>Salmonella</i> Fiebre tifoidea Fiebre paratifoidea	Typhimurium, Enteritidis Typhi ^c Sendai, Paratyphi A, B y C ^c	Niños (<4 años) Niños y adultos Niños y adultos	Diarrea, disentería, fiebre Septicemia, fiebre ^a Septicemia, fiebre ^a
Vaca	Salmonelosis	Typhimurium Dublin	Terneros (<8 semanas) Terneros y adultos	Diarrea, disentería, septicemia, fiebre Diarrea, disentería, septicemia, fiebre, aborto
Ave de corral	Pullorosis Tifoidea aviar Paratifoidea aviar	Pullorum ^{c,d} Gallinarum ^{c,d} Enteritidis, Typhimurium	Polluelos recién nacidos Aves en crecimiento y adultas Polluelos recién nacidos	Diarrea, septicemia Diarrea, septicemia, decoloración de la cresta Diarrea, septicemia
Oveja	Salmonelosis	Abortusovis ^c Typhimurium	Ovejas adultas Corderos Corderos	Septicemia, aborto, descarga vaginal Diarrea, disentería, septicemia Diarrea, disentería, septicemia
Cerdo	Paratifoidea porcina Salmonelosis Paratifoidea crónica	Choleraesuis ^c Typhimurium Typhisuis	Lechones y adultos Lechones (<4 meses)	Decoloración de la piel, septicemia, fiebre ^b Diarrea Diarrea intermitente
Caballo	Salmonelosis	Abortusequi ^c Typhimurium	Caballos adultos Potros Potros	Septicemia, aborto Septicemia, diarrea Septicemia, diarrea
Roedor	Tifoidea murina	Typhimurium, Enteritidis		Septicemia, fiebre

Tabla 1. Enfermedades causadas por los serotipos de la subespecie I de *Salmonella* en humanos y vertebrados superiores **a)** Solo 1/3 de las personas que desarrollan fiebre tifoidea padecen diarrea, y por lo general ocurre varios días después del inicio de la fiebre. **b)** La diarrea no es un síntoma común de la paratifoidea de cerdos, pero puede desarrollarse en el tercer o cuarto día de enfermedad. **c)** Estos serotipos son los que se asociaban más frecuentemente como causantes de la enfermedad en la era anterior a los antibióticos, pero en la actualidad son poco comunes o se han erradicado en los países desarrollados. **d)** Gallinarum y Pullorum se consideran biotipos pertenecientes al mismo serotipo. *Obtenida de Baumler et al (1998) y editada por los autores.*

7.1. Genes antivirulencia perdidos en la evolución hacia patogénesis en *Salmonella*

La pérdida de genes puede ser tan importante como la adquisición de otros para la supervivencia del patógeno en el hospedador. Es común que cuando una bacteria se adapta a un nicho más específico se produce un fenómeno de pérdida de función en algunos genes. Cuando ciertos productos génicos o vías metabólicas pasan a ser superfluos en el nuevo ambiente, las mutaciones comienzan a acumularse en estos genes prescindibles. En estas primeras etapas de la evolución reduccionista se generan muchos pseudogenes en vías metabólicas no necesarias, aunque se siguen manteniendo otros funcionales. En una etapa posterior, todos o la mayoría de los genes superfluos quedan inactivados, pero restos de los mismos aun permaneces en el genoma. Esta etapa intermedia de evolución reduccionista se observa en patógenos como *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, y *Yersinia pestis*. Con el tiempo, las regiones carentes de genes funcionales van a ser gradualmente eliminadas del genoma. En la etapa final de la evolución reduccionista, las bacterias poseen genomas considerablemente más pequeños y pocos pseudogenes. Los organismos que se encuentran en esta etapa son los endosimbiontes y los patógenos intracelulares obligados, tales como *Buchnera*, *Mycobacterium leprae* y *Chlamydia trachomatis*; estos microorganismos se han adaptado para obtener la mayoría de los nutrientes de sus hospedadores, habiendo perdido numerosas vías biosintéticas.

Una segunda fuerza evolutiva que conduce a una pérdida de genes es la que ocurre en los patógenos. Como la virulencia es un factor crítico para la supervivencia del patógeno en el hospedador, la expresión de cualquier gen que interfiera con la virulencia será perjudicial para el patógeno. En consecuencia, cualquier gen, cuyo producto interfiera con la adecuada expresión de un nuevo factor de virulencia adquirido por el patógeno, va a sufrir un proceso de selección. Así, estos genes que interfieren con los factores de virulencia, y que se les conoce como genes antivirulencia (AVGs, *antivirulence genes*), van a ser inactivados, delecionados o regulados de forma diferencial. Así, un AVG se puede definir como un gen cuya expresión en un patógeno es incompatible con la virulencia del patógeno.

Una de las características que distingue a *Salmonella* de *E. coli* es la capacidad de fermentar lactosa, mientras que *E. coli* es capaz de utilizar la lactosa, *Salmonella* no lo hace. Esto puede resultar paradójico, pues ambos microorganismos se multiplican en el intestino, donde la lactosa es una fuente de energía muy abundante.

En *E. coli* el sistema Lac contiene cuatro genes, tres de ellos forman un operón: *lacZ* (β -galactosidasa), *lacY* (permeasa de lactosa) y *lacA* (transacetilasa). El cuarto gen, *lacI*, codifica el represor del operón y regula negativamente el sistema cuando no hay lactosa en el medio.

En *S. bongori* el sistema Lac ya no es funcional, pues en su genoma solo se encuentran los genes *lacI* y *LacZ*, y el primero es un pseudogen. En la mayoría de las cepas de *S. enterica* no existe ninguno de los cuatro genes.

Cuando de forma experimental se introduce el gen *lacI* funcional en *Salmonella* (carente del operón Lac funcional), la virulencia se reduce de forma significativa en ratones. Aunque la bacteria que expresa *lacI* es capaz de atravesar la barrera intestinal, ésta ha perdido la capacidad de multiplicarse dentro de macrófagos. Estudios con “microarrays” indican que varios de los genes de la SPI-2, codificantes para el sistema de secreción tipo III implicado en la supervivencia dentro de la vacuola, presentan una expresión muy baja en las bacterias que expresan *lacI*.

Aunque el mecanismo exacto de acción no se ha podido dilucidar todavía, la consecuencia funcional es que la bacteria pierde su capacidad para sobrevivir en la vacuola del macrófago y, por tanto, *lacI* debe ser considerado como un AVG en *Salmonella*.

Otro ejemplo de genes antivirulencia en *Salmonella* lo observamos en el operón *Zir*, más concretamente en la expresión de los genes *ZirTS*. *ZirT* es un transportador de zinc de la membrana externa de *Salmonella*, y *ZirS* es su socio secretado. A diferencia de lo que ocurría con el operón Lac, la expresión de este par génico no impide totalmente la supervivencia de *Salmonella*, sino que actúa disminuyendo su virulencia al reducir el grado de colonización de las bacterias en las células del intestino. El mecanismo por el que efectúan este procedimiento es, por el momento, desconocido.

8. REFERENCIAS

- **Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Ficht, T.A. and Adams, L.G.** (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 66: 4579-4587.
- **Bliven, K.A. and Maurelli, A.T.** (2012). Antivirulence genes: insights into pathogen evolution through gene loss. *Infect Immun* 80: 4061-4070.
- **Brumell, J. H. and Grinstein, S.** (2004). *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 78-84.
- **Bueno, S.M., Tobar, J.A., Iruretagoyena, M.I. and Kalergis, A.M.** (2005) Molecular interactions between dendritic cells and *Salmonella*: escape from adaptive immunity and implications on pathogenesis. *Crit. Rev. Immunol.* 25: 389-403.
- **Cotter, P.A. and DiRita, V.J.** (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 519-565.
- **Cossart, P. and Sansonetti, P. J.** (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304: 242-248.
- **Crump, J.A., Sjolund-Karlsson, M., Gordon, M.A., and Parry, C.M.** (2015). Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. *Clin Microbiol Rev* 28: 901-937.
- **Dandekar, T., Fiesemann, A., Fischer, E., Popp, J., Hensel, M., and Noster, J.** (2014) *Salmonella* - how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. *Front Cell Infect Microbiol* 4:191.
- **Donnenberg, M.S.** (2000) Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406: 768-774.
- **Everest, P., Wain, J., Roberts, M., Rook, G. and Dougan, G.** (2001) The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol.* 9: 316-320.
- **Fàbrega, A. and Vila, J.** (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26: 308-341.
- **Figuroa, O.I.M, Verdugo, R.A.** (2005) Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Microbiología.* 47(1-2):25-42.
- **Finlay, B.B.** (1994) Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Cur.*

- Top. Microbiol. Immunol. 192: 163-185.
- **Gal-Mor, O.** (2019). Persistent infection and long-term carriage of typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Clin. Microbiol. Rev.* 32: e00088-18.
 - **Galán, J.E.** (1996) Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 209: 43-60.
 - **Galan, J.E., and Wolf-Watz, H.** (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444: 567-573.
 - **Galán, J.E. and Zhou, D.** (2000) Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8754-8761.
 - **Haraga, A., Ohlson, M.B. and Miller, S.I.** (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 53-66.
 - **Hensel, M.** (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36: 1015-1023.
 - **Hume, P.J., Singh, V., Davidson, A.C., Koronakis, V.** (2017) Swiss Army Pathogen: The *Salmonella* Entry Toolkit. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:348. doi: 10.3389/fcimb.2017.00348. PMID: 28848711; PMCID: PMC5552672.
 - **Jennings, E., Thurston, T.L.M., Holden, D.W.** (2017) *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion System Effectors: Molecular Mechanisms And Physiological Consequences. *Cell Host Microbe.* 2017 Aug 9;22(2):217-231. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.009.
 - **Kingsley, R.A. and Baumber, A.J.** (2002) Pathogenicity islands and host adaptation of *Salmonella* serovars. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 264: 67-87.
 - **LaRock, D.L., Chaudhary, A. and Miller, S.I.** (2015). Salmonellae interactions with host processes. *Nat Rev Microbiol* 13: 191-205.
 - **Lou, L., Zhang, P., Piao, R. and Wang, Y.** (2019) *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9:270. doi: 10.3389/fcimb.2019.00270
 - **Lucas, R.L. and Lee, C.A.** (2000) Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 36: 1024-1033.
 - **Marzel, A., Desai, P. T., Goren, A., Schorr, Y. I., Nissan, I., Porwollik, S., Valinsky, L., McClelland, M., Rahav, G., & Gal-Mor, O.** (2016). Persistent Infections by Nontyphoidal *Salmonella* in Humans: Epidemiology and Genetics. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 62(7), 879–886. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1221>.
 - **Prehna, G., Li, Y., Stoynev, N., Okon, M., Vuckovic, M., McIntosh, L.P., Foster, L.J., Finlay, B.B., and Strynadka, N.C.J.** (2012) The Zinc Regulated Antivirulence Pathway of *Salmonella* Is a Multiprotein Immunoglobulin Adhesion System. *J Biol Chem* 287(39): 32324-32337.
 - **Prost, L. R., Sanowar, S., and Miller, S. I.** (2007). *Salmonella* sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages. *Immunological reviews*, 219: 55–65.
 - **Rhen M.** (2019) *Salmonella* and Reactive Oxygen Species: A Love-Hate Relationship. *J Innate Immun.* 11(3):216-226. doi: 10.1159/000496370.
 - **Silva G., and López H.S.** (2012) Genes involved in pathogenesis, persistence, and excretion of *Salmonella* in animal models. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25(1):107-122.
 - **Schlumberger, M.C. and Hardt, W.D.** (2005) Triggered phagocytosis by *Salmonella*: bacterial molecular mimicry of RhoGTPase activation/deactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 291: 29-42.
 - **Schmidt, H., and Hensel, M.** (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17, 14-56.
 - **Sirard, J.-C., Niedergang, F. And Kraehenbuhl, J.-P.** (1999) Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol. Rev.* 171: 5-26.
 - **Wallis, T.S. and Galyov, E.E.** (2000) Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.* 36: 997-1005.

Páginas web

- Manuel Megías M. La célula. 7. Citosol. Citoesqueleto. Filamentos de actina. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Mmegias.webs.uvigo.es. 2020 [cited 23 December 2020]. Available from: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/7-actina.php>
- <https://biorender.com/>
- Higiene1.higiene.edu.uy. 2020 Available from: http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella_y_salmonelosis.pdf