

## **FACTORES DE VIRULENCIA DE SALMONELLA TYPHI EN RELACIÓN AL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS**

Salud Pública Méx1989 Vol. 31(3):262-267

Artículos Originales

JOSÉ A. GARCÍA, Q.F.B.,(1) JORGE PANIAGUA, Q.F.B., M. EN C.,(2)  
ROSANA PELAYO, Q.F.B., M. EN C.,(1) ARMANDO ISIBASI, M.C., DR. EN  
C.,(1)

### **Resumen**

A pesar de que se han desarrollado diversas preparaciones vacunales para la prevención de la fiebre tifoidea, ninguna de éstas ha sido adecuada para su aplicación masiva en países en vías de desarrollo. Con el fin de generar mejores vacunas, se han estudiado los factores de virulencia tanto de *S. typhi* como de *S. typhimurium*. De esta manera se han realizado ensayos en los cuales se utilizan los antígenos de superficie de la bacteria o bien cepas mutadas en algún gen involucrado en la virulencia. En este artículo se presenta una breve revisión de los avances en el estudio de la virulencia de la bacteria encaminados a la obtención de nuevas vacunas.

### **Abstract**

Although many vaccines against typhoid fever have been developed, none have been adapted for their further application on developing countries. In order to get better vaccines, the virulence factors of both *S. typhi* and *S. typhimurium* have been studied. Thus, some protection assays have been made using surface antigens involved on virulence or using live attenuated vaccines of bacteria mutated on virulence genes. Here we present a brief review about virulence factors studied so far for the development of new vaccines.

### **Introducción**

LA FIEBRE TIFOIDEA es una enfermedad que se considera un buen candidato para el control por inmunización. Las vacunas parenterales actualmente disponibles no son adecuadas para aplicación en gran escala, pues frecuentemente dan lugar a reacciones secundarias indeseables y no generan inmunidad de larga duración. Por otro lado, las vacunas orales disponibles no tienen buena capacidad protectora en regiones endémicas. Es por lo tanto deseable trabajar en el desarrollo de un agente vacuna. efectivo y exento de

estos inconvenientes.

La fiebre tifoidea tiene una distribución mundial. En la región de las Américas se calculan alrededor de 89 590 casos, que representan una tasa de incidencia de 20.83 casos por cada 100 000 habitantes; el 58.6 por ciento de los casos se presenta en el grupo de 15 a 44 años de edad. Se han registrado brotes debidos a bacterias multirresistentes a los antibióticos. Datos preliminares de la Encuesta Seroepidemiológica Nacional muestran que alrededor del 8.8 por ciento de la población tiene anticuerpos con títulos altos contra *Salmonella typhi*, los cuales se determinaron por un ensayo inmunoenzimático (ELISA) semiautomatizado, utilizando antígeno somático de *Salmonella typhi* O 901. La enfermedad es producida por *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d, una enterobacteria gram-negativa. La *Salmonella typhi* tiene una estructura antigénica de superficie que incluye al antígeno H o flagelar, el antígeno O ó somático y lipopolisacáridos cuya especificidad está dada por la composición de azúcares en la fracción polisacáridica.<sup>2</sup> El antígeno Vi forma parte de la membrana externa, está formado por polisacáridos y su presencia es indicadora de virulencia.<sup>3</sup> Finalmente, existen muchos otros productos potencialmente antigénicos,<sup>4</sup> tales como las proteínas de la membrana externa, entre las cuales se encuentran las porinas, la lipoproteína de Braun y otras proteínas con diversas funciones que han sido muy poco estudiadas desde el punto de vista inmunológico.

La infección se adquiere mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados, no existen reservorios animales y la principal fuente de la infección son los portadores asintomáticos. El padecimiento tiene un periodo de incubación de aproximadamente 10 días. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, cefalea, malestar general, diarrea o constipación, en ocasiones puede haber exantema, desorientación y estado toxoinfeccioso; el padecimiento puede complicarse con perforación intestinal o choque séptico que pueden llevar a la muerte.

Las alternativas de prevención mediante saneamiento de agua y alimentos, control y reducción del número de portadores y otras personas infectadas, se deben promover activamente como tareas de salud pública. Sin embargo, el control de la enfermedad mediante estas estrategias no será posible en el corto y mediano plazo en muchos países, debido a la crisis económica que afecta sobre todo a los países en vías de desarrollo, por lo que la obtención de una vacuna mejorada se debe considerar como una opción efectiva de control. Empero, la vacuna candidato deberá ser de alta inocuidad y capacidad protectora para aplicación masiva en niños y adultos. Es por esto que para lograr productos que generen inmunidad efectiva, es necesario comprender con profundidad los mecanismos de virulencia, así como la naturaleza de la respuesta inmune que se monta en contra del microorganismo responsable de la enfermedad.

#### FACTORES DE VIRULENCIA

Ha pasado más de un siglo desde que *Salmonella typhi* fue aislada y reconocida como el agente causal de la fiebre tifoidea en humanos y, sin embargo, los mecanismos de virulencia de esta bacteria no han sido entendidos del todo aún. Algunas de las manifestaciones son producidas por la liberación de una endotoxina,<sup>6</sup> la cual tiene diversos efectos biológicos, incluyendo la inducción de fiebre, hipotensión arterial, cambios en la cuenta leucocitaria y estimulación policlonal de linfocitos B.<sup>7-9</sup> La alta especificidad de esta bacteria por su hospedero ha provocado la necesidad del estudio de la infección en ratones por *Salmonella typhimurium*.

El antígeno Vi de *Salmonella typhi* ha sido objeto de muchas investigaciones

desde los años treinta, época en la que se identificó su importancia en la patogénesis e inmunidad de la enfermedad:.. invariablemente *S. typhi* aislada de sangre de pacientes con fiebre tifoidea contenía este antígeno;) El antígeno Vi parece no actuar como un prerrequisito de invasión a las células epiteliales, sino más bien como un factor protector de los antígenos O contra la acción de los anticuerpos o el complemento." Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno Vi parecen facilitar la fagocitosis, ya que las bacterias con este antígeno capsular son típicamente resistentes a la fagocitosis en la ausencia de anticuerpos específicos.

Por otra parte, se ha demostrado que el antígeno O aumenta la virulencia de la bacteria cuando la infección ocurre por una ruta en la cual éstas son expuestas a macrófagos capaces de matar a la *Salmonella*.<sup>12</sup> Este efecto parece ser mediado por la activación de la vía alterna del complemento. Los antígenos O que evitan esta activación, por una concentración relativamente baja de los componentes del complemento en los tejidos, escapan

de la fagocitosis y muerte. Hay evidencias de que algunas cepas mutantes galE, que carecen de antígeno O pero lo sintetizan parcialmente en medio que contiene galactosa, despiertan una respuesta inmune específica y además son avirulentas;<sup>13</sup> sin embargo, también se han informado resultados contrarios, que sugieren que el antígeno O no es esencial para la virulencia, y que la respuesta inmune que induce no es protectora a la infección con la bacteria.<sup>14</sup>

En varias especies de *Salmonella* se ha demostrado que existe un plásmido necesario para causar la infección más allá de las placas de Peyer del intestino, en los nódulos linfáticos mesentéricos y en el bazo.<sup>15</sup> Hasta la fecha este tipo de plásmidos no se han estudiado en *S. typhi*.

Jones y colaboradores<sup>16</sup> han propuesto que los plásmidos de virulencia están involucrados en la adherencia e invasión de las células de mamíferos, y que estos plásmidos pueden integrarse en el cromosoma bacteriano, lo que evita la expresión del fenotipo de virulencia. Cuando los plásmidos se escinden del cromosoma, se presenta de nuevo la virulencia bacteriana.

Se han propuesto tres probables mecanismos por los cuales la bacteria evade su destrucción en el interior de los fagocitos:<sup>17</sup> a) inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma; b) interferencia con los metabolitos reactivos del oxígeno o con las enzimas lisosomales y, c) transición en el interior del citoplasma.

Se han obtenido evidencias que apoyan la hipótesis de que la sobrevivencia de *Salmonella* en macrófagos es un factor primordial en la patogenia del microorganismo. Una de ellas es que los mutantes por inserción de transposón en *S. typhimurium*, que no sobrevivieron intercelularmente en macrófagos cultivados, tienen reducida virulencia en ratones.<sup>18</sup>

Al respecto, en estudios simultáneos, los grupos de Mekalanos<sup>19</sup> y Heffron,<sup>20</sup> demostraron que las *S. typhimurium* con mutaciones en el locus regulador *phoP* (responsable de la síntesis de una fosfatasa ácida periplásmica), avirulentas cuando se inyectan en ratones BALB/c, son incapaces de sobrevivir en macrófagos y son extremadamente sensibles a péptidos con actividad antimicrobiana, tales como las defensinas. El locus *phoP* está compuesto de dos genes presentes en un operón: *phoP* y *phoQ*, y las secuencias de aminoácidos de los productos génicos tienen alta homología con otros miembros de reguladores transcripcionales bacterianos de dos componentes que responden a estímulos ambientales, tales como *PhoB* y *OmpR*. Se ha propuesto entonces, que el sistema *phoP/ phoQ* regula la expresión de genes involucrados en la virulencia de *Salmonella*.

Recientemente se identificó un grupo de proteínas de membrana externa (PME), las porinas (denominadas así por constituir poros de difusión), involucradas en la patogénesis de ciertas bacterias. Las porinas de *S. typhi* inducen la activación del complemento por la vía clásica y por la vía alterna;<sup>21</sup> son capaces de unirse a leucocitos polimorfonucleares de humanos, afectando la integridad de su membranas y su actividad funcional;<sup>22</sup> parecen tener relación con la adherencia e invasión de las bacterias a células epiteliales, y son capaces de inducir la proliferación de linfocitos T.<sup>23</sup> La participación de estas proteínas en la patogénesis apoya su empleo como inmunógenos protectores.

#### VACUNAS ACTUALMENTE EN USO Y ESTADO DE LAS INVESTIGACIONES

Existen dos vacunas aprobadas por la OMS contra la fiebre tifoidea: la elaborada a partir de bacterias inactivadas por acetona (K) y la proveniente de bacterias inactivadas por calor (L). Estas vacunas producen reacciones colaterales debido a la presencia de endotoxinas, y la inmunidad protectora que generan es poco eficiente y de corta duración, por lo que no es recomendable para campañas masivas de vacunación ni para su aplicación en niños.

Actualmente se encuentra disponible en el comercio una vacuna oral elaborada a base de bacterias atenuadas de *Salmonella typhi* Ty21a, deficiente en 4-UDP-galactosa epimerasa.<sup>25</sup> Los inconvenientes de esta vacuna son el alto costo y la falta de una protección realmente efectiva y duradera en regiones donde la fiebre tifoidea es endémica.<sup>26</sup> Esta vacuna, desarrollada por Germanier, no tiene antígeno Vi e induce respuesta inmune humoral y celular a los antígenos proteicos, incluyendo porinas de *S. typhi* 9, 12, Vi:d. Recientemente se ha descrito una modificación a *S. typhi* Ty21a que expresa antígeno Vi, pero su utilidad como inmunógeno no ha sido evaluada.

Robbins y Robbins desarrollaron una vacuna contra la fiebre tifoidea a partir del antígeno Vi.<sup>27</sup> Esta vacuna, actualmente preparada por el Instituto Merieux, ha sido evaluada en estudios de campo en Nepal<sup>28</sup> y Africa del

Sur.<sup>29</sup> Los informes preliminares de los estudios muestran una eficacia de 72 y 64 por ciento, respectivamente. Una desventaja de esta vacuna es que como el polisacárido es un antígeno timo-independiente, no genera respuesta inmune celular ni se desarrollan efectivamente células de memoria para inmunizaciones o retos posteriores.<sup>30</sup>

Ambas vacunas, las elaboradas con la cepa Ty21a y el polisacárido Vi, han mostrado ser prácticamente inocuas con un buen grado de eficacia. Algunos informes recomiendan su aplicación simultánea en programas de vacunación.<sup>14</sup> Esta estrategia podría realizarse en personas de países desarrollados que viajan a regiones donde la fiebre tifoidea es endémica; sin embargo, en los países del Tercer Mundo, incluyendo América Latina y el Caribe, es inaplicable debido a su alto costo y a lo impráctico de su aplicación. Stocker y colaboradores han desarrollado una mutante de *Salmonella typhi* auxotrófica aro pur para utilizarla como vacuna por vía oral. Los resultados preliminares muestran que su utilización es segura en humanos y es capaz de inducir respuesta inmune celular; sin embargo, la respuesta serológica es pobre aún después de la ingestión de grandes cantidades de bacteria, lo que sugiere que la cepa resulta ser muy atenuada.<sup>31</sup>

Una de las estrategias usadas recientemente ha consistido en realizar mutaciones a cepas de *Salmonella*, de modo que a pesar de ser avirulentas, preserven su capacidad inmunogénica, y puedan ser además empleadas como vectores de genes codificantes para diversos antígenos de virulencia de otros microorganismos patógenos.<sup>32</sup> Empleando esta estrategia, el grupo

de Curtiss ha desarrollado mutantes de *S. typhimurium* con defectos en el gen regulador *crp* (que codifica para un receptor del CAMP), o en el gen *cya* (que codifica para la adenilato ciclasa), que son avirulentas y proveen de cierta protección en el modelo murino 33 Sin embargo, estas cepas pueden revertir al estado virulento, ya que los genes regulados por *crp* y *cya* que son necesarios para la virulencia, no se encuentran deletados.<sup>32</sup> Por otra parte, el grupo de Mekalanos ha hecho uso de transposones para la generación de cepas mutantes en el gen *pagC* (responsable de activar al gen de *phoP*) dando origen a cepas con una atenuación de mil veces en su virulencia.<sup>19</sup> Ya que las proteínas de membrana externa (PME) se encuentran en la superficie de las bacterias gram-negativas y son accesibles a las células del sistema inmune, se considera que pueden ser antígenos importantes en la inducción de una respuesta inmune protectora específica. Varios grupos de investigación han realizado estudios para evaluar la capacidad protectora de las PME de *S. typhi* o *S. typhimurium* en modelos murinos con resultados alentadores.<sup>34-36</sup> Finalmente, la eficacia de las vacunas conjugadas ya ha sido demostrada en la prevención de otras enfermedades, como la meningitis<sup>37</sup> y la salmonelosis<sup>38</sup> entre otras, por lo que se ha pensado que una vacuna elaborada a partir de conjugados de porinas de *Salmonella typhi* con acarreadores como toxoide diftérico o tetánico, o bien el antígeno Vi podría generar una respuesta inmunológica más eficiente y duradera. En el caso del conjugado Vi-porinas, se estarían sumando dos antígenos protectores de la misma bacteria, dando origen a una respuesta inmune humoral contra el polisacárido que evitaría la infección inicial de la bacteria. Por otra parte, la presencia de células específicas contra la proteína intervendría en el desarrollo de la respuesta anamnésica y de control de la bacteria intracelular.

## CONCLUSIONES

A la fecha se han estudiado diversos mecanismos de virulencia de *Salmonella* que incluyen tanto antígenos superficiales como genes involucrados en la sobrevivencia del microorganismo en el interior del macrófago. El estudio de estos factores ha permitido comprender mejor la relación que establece la bacteria con su hospedero, y por tanto generar nuevas y mejores vacunas. Sin embargo, no es factible esperar resultados espectaculares en un futuro cercano ya que es necesario conocer a profundidad estos mecanismos.

## Bibliografía

1. González C, Ortiz V, Rojas R, Ramírez A, Isibasi A, Kumate J. Seroepidemiología de la fiebre tifoidea en 8 estados del norte de la República Mexicana. XX Congreso Nacional de Microbiología; 1989; Morelia, Michoacán, México.
2. Jann K, Jann B. Polysaccharide antigens of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* 1987;9(Suppl 5):517-526.
3. Felix A, Pitt RM. The pathogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigenic constituents. *J Hyg (Camb)* 1951;49:92-110.
4. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* 1989;53:210-230.
5. Kumate J. Inmunidad, inmunización y vacunas. 2a. ed. México, D.F.: Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, 1979:227-247.
6. Hornick RB, Greisman SE, Woodward TE y col. Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *N Engl J Med* 1970;283:686-691.

7. Galanos C, L&uuml;deritz O. Lipopolysaccharide: properties of an amphipathic molecule. En: Rietschel E, ed. Handbook of endotoxin. Amsterdam: Elsevier, 1984:46-58.
8. Valtonen MV, Plosila M, Valtonen VV, M&acaron;kel&acaron; PH. Effect of the quality of the lipopolysaccharide on mouse virulence of *Salmonella enteritidis*. Infect Immun 1975;12:828-832.
9. Morrison DC, Bety SJ, Jacobs DM. Isolation of a lipid A bound polypeptide responsible for &laquo;LPS initiated&raquo; mitogenesis of C3H/HeJ spleen cell. J Exp Med 1976;144:840-846.
10. Felix A, Krikorian AS, Reitler R. The occurrence of typhoid bacilli containing Vi antigen in cases of typhoid fever and of Vi-antibody in their sera. J Hyg (Camb) 1935;35:421-427.
11. Liu SL, Ezkal T, Miura H, Matsui K, Yabuuchi E. Intact motility as a *Salmonella typhi* invasion-related factor. Infect Immun 1988;56:1967-1973.
12. M&acaron;kel&acaron; PH, Hovi M, Sax&acaron;n H, Valtonen M, Valtonen V. *Salmonella*, complement and mouse macrophages. Immunol Lett 1988;19:217-222.
13. Wandan MH, Serie C, Cerisier Y, Saallam S, Germanier R. Controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty2la a oral vaccine against typhoid: three years results. J Infect Dis 1982;145:292-293.
14. Levine MM, Ferreccio C, Black ER, Tacket OC, Germanier R, Chilean Typhoid Committee. Progress in vaccines against typhoid fever. Rev Infect Dis 1989;2:(Suppl 3):S552-S567.
15. Gulig PA, Curtis R. III. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 1987;55:2891&not;2901.
16. Jones GW, Rabert DK, Svinarich DM, Whitfield HJ. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *S. typhimurium* with autonomous 60 megadalton plasmid. Infect Immun 1982;38:476-486.
17. Kaufmann SHE, Munk ME, Koga T y col. Effector T cells in bacterial infections. En: Melchers F, ed. Progress in immunology. RFA: Springer-Verlag, 1989:963-970.
18. Fields PI, Swanson R, Haidaris C, Heffron F. Mutants of *S. typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:5189&not;5193.
19. Miller S, Kukral A, Mekalanos JJ. A two-component regulatory system (phoP and phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:5054-5958.
20. Fields PI, Groisman EA, Heffron F. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. Science 1989;243:1059-1062.
21. Galdiero F, Tufano M, Sommese L, Folfore A, Tedesco F. Activation of complement system by porins extracted from *S. typhimurium*. Infect Immun 1984;46:559-563.
22. Tufano M, Ianniello R, Galdiero M, De Martino L, Galdiero F. Effect of *S. typhimurium* porins on biological activities of human polymorphonuclear leukocytes. Microb Pathogen 1989;7:337-346.
23. Tufano MA, Berlingieri MT, Sommese L, Galdiero F. Immune response in mice and effects on cells by outer membrane porins from *Salmonella typhimurium*. Microbiologica 1984;7:353-366.
24. Hornick RB, Dupont HL, Dawkins AT, Snyder MJ, Woodward TE. Evaluation of typhoid fever vaccines in man. Symposium Series in Immunobiological Standardization 1968;15:143-150.
25. Germanier R, F&uuml;rer E. Isolation and characterization of *S. typhi* gal E

mutant Ty 21a: a candidate strain for a live typhoid vaccine. *J Infect Dis* 1975;131:553-558.

26. Wandan M, Serie C, Cerisier Y, Sallam S, Germanier R. Oral vaccine against typhoid: three years results. *J Infect Dis* 1982;145:229-293.
27. Robbins JD, Robbins JB. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. *J Infect Dis* 1984;150:436-449.
28. Acharya IL, Lowe CL, Thapa R y col. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. *N Engl J Med* 1987;317:1101-1104.
29. Klugman KP, Koomhof IJ, Gilbertson IT y col. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* 1987;ii:1165-1169.
30. Mosier DE, Subbarao B. Thymus-independent antigens: complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunol Today* 1982;3:217-222.
31. Edwards MF, Stocker BAD. Construction of aroA his pur strains of *Salmonella typhi*. *J Bacteriol* 1988;170:3991&not;3995.
32. DiRita VJ, Mekalanos JJ. Genetic regulation of bacterial virulence. *Annu Rev Genet* 1989;23:455-582.
33. Curtiss R III, Kelly SM. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect Immun* 1987;55:3035-3043.
34. KussiN, NurminenM, SaxénHy col . Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis in mice. *Infect Immun* 1979;25:857-862.
35. Udhayakumar V, Muthukkaruppan Vr. Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* 1987;55:816-821.
36. Isibasi A, Ortiz V, Vargas M, González C, Paniagua J, Moreno J, Kumate J. Protection agai nst *Salmonella typhi* infection after immunization with outer-membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d,Vi. *Infect Immun* 1988;56:2953-2959.
37. Lenoir AA, Granoff PD, Franoff DM. Immunogenicity of Haemophilas influenzae type b polysaccharideNeisseria meningitidis outer membrane protein conjugate vaccine in 2- 60 6- month old infants. *Pediatrics* 1987;80:283&not;287.
38. Svenson SB, Nurminen M, Lindberg CA. Artificial *Salmonella* vaccines: O-antigenic oligosaccharide-protein conjugates induce protection against infection with *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1979;34:328&not;332.