

# Evaluación de la capacidad de invasión de serovariedades de *Salmonella* enterica a células Hep-2

Evaluation of the invasive capacity of *salmonella* enterica serum varieties to hep-2 cells

NORA MARÍA CARDONA CASTRO<sup>1</sup>, MIRYAN MARGOT SÁNCHEZ JIMÉNEZ<sup>2</sup>

Forma de citar: Cardona N, Sánchez M. Evaluación de la capacidad de invasión de serovariedades de *Salmonella* enterica a células Hep-2. Rev CES Med 2005; 19 (2) : 7-17

## RESUMEN

**L**a especificidad de hospedero de *Salmonella* enterica sugiere diferencias en los pasos iniciales de patogénesis y en la expresión de genes de invasión.

En este estudio, se evaluaron las diferentes capacidades de invasión a células Hep-2 de *Salmonella* serovariedades typhimurium, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* y *S. pullorum*. Se buscó también la presencia del gen *hila* (locus de hiperinvasividad A, regulador de la isla de patogenicidad 1) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los ensayos de invasión se realizaron mediante la técnica de protección con gentamicina. Las células Hep-2 fueron inoculadas con aislamientos de *Salmonella* obtenidos de cultivos de diferente osmolaridad en caldo Luria Berthani. El porcentaje de recuperación de *Salmonella* intracelular se determinó por cultivos de diluciones por lisis de las células Hep-2 y del sobrenadante.

Todos los aislamientos presentaron el gen *hila*; *S. typhimurium* presentó el porcentaje más alto de invasión, respecto a las otras serovariedades. *S. enteritidis*, *S. choleraesuis* y *S. typhi* presentaron un porcentaje de invasión similar y *S. pullorum* presentó el porcentaje más bajo.

<sup>1</sup> Magíster en Enfermedades Infecciosas. Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Grupo Medicina Tropical. Médica. ncardona@ces.edu.co

<sup>2</sup> Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas. Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Grupo Medicina Tropical.

La presente investigación fue financiada por: Colciencias - Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT)- Instituto de Ciencias de la Salud (CES) - Department of Microbiology Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

**Recibido: 20 septiembre/ 2005, Revisado: 18 octubre/ 2005, Aceptado: 18 noviembre/2005**

Estos hallazgos evidencian las diferencias en el proceso de invasión de aislamientos de *Salmonella* que afectan diferentes tipos de hospederos.

## **PALABRAS CLAVE**

*Salmonella*

PCR

Invasión

Células Hep-2

## **SUMMARY**

Host specificity of *Salmonella enterica* suggests differences in the early steps of pathogenesis and different expression of invasive genes. In this study, invasion to Hep-2 cells was evaluated to detect different capacity of invasion among *Salmonella* serovars Typhimurium, *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhi* and *S. Pullorum*. Also, the presence of *hilA* gene (hyperinvasive locus A, a regulator gene of the pathogenicity island 1) was investigated by polymerase chain reaction (PCR) in these isolates. Invasion was performed using the gentamicin protection assay. The Hep-2 cell cultures were inoculated with *Salmonella* isolates obtained from different osmolarity of Luria Berthani broth. The percentage of recovering of intracellular *Salmonella* was determined through dilution cultures of the intracellular bacteria recovered. The percentage of recover of intracellular *Salmonella* was compared among serovars to determine its invasive capacity to Hep-2 cells.

All isolates showed the *hilA* gene. The serotype Typhimurium has the higher percentage of invasion respect to other serotypes.

*S. Enteritidis*, *Choleraesuis* and *Typhi* have similar invasion levels and *S. Pullorum* has low invasion index.

These findings show differences in the initial step for invasion of *Salmonella* isolates than proceed in different kind of hosts.

## **KEY WORDS**

*Salmonella*

PCR

Invasión

Hep-2 cells

## **INTRODUCCIÓN**

Las bacterias del género *Salmonella* son agentes causales de infección y síndromes clínicos como bacteremia, fiebre entérica y enterocolitis. Algunas serovariedades de *S. enterica*, como las serovariedades typhimurium y enteritidis, pueden causar enfermedad en un amplio rango de hospederos mientras otras serovariedades tienen un rango reducido, lo que se ha denominado como especificidad de hospedero. La invasión de células no fagocíticas y fagocíticas es esencial para la producción de infección por *Salmonella*. Estas bacterias han desarrollado la habilidad de interactuar con células hospederas no fagocíticas induciendo su propia internalización.<sup>(1)</sup>

El ganar acceso a la célula hospedera constituye un paso muy importante en su ciclo de vida patogénico. Se conoce que *in vivo*, *Salmonella* induce el rearrreglo del citoesqueleto de actina de la célula eucariótica para permitir su interiorización.<sup>(2)</sup>

Los diferentes patógenos microbianos han evolucionado a lo largo del tiempo adquiriendo nuevos factores de virulencia que les permiten interactuar de una manera más íntima y compleja con sus hospederos para poder ganar acceso a ellos. Las bacterias intracelulares evaden la respuesta inmune y se establecen en nichos en el interior de la célula eucariótica, replicándose y diseminándose a células vecinas, produciendo diferentes cuadros clínicos.<sup>(3)</sup>

*Salmonella* es un buen ejemplo de este tipo de microorganismos que se encuentran muy bien adaptados a sus hospederos. Sus mecanismos de invasión varían dependiendo del serovar infectante, el inóculo y el tipo de célula que esta siendo invadi-

da, ya que *Salmonella* tiene la capacidad de activar diferentes grupos de genes, dependiendo de si está ingresando en células epiteliales no fagocíticas o en macrófagos.<sup>(4)</sup>

*Salmonella* es una de las bacterias patógenas mas ampliamente estudiada en cuanto a su fisiología, genética, estructura celular y patogénesis, principalmente el serovar typhimurium, debido a su fácil manejo en el laboratorio y posibilidad de manipulación con técnicas moleculares.

El gen *hilA* es un componente de la denominada "Isla Patogénica I" (40-kb) que ha sido encontrado en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Typhi, Enteritidis, Choleraesuis, Paratyphi y Pullorum.<sup>(5)</sup> El gen *hilA* es importante para la regulación de los genes de virulencia tipo III o aparato de secreción, los cuales permiten la invasión de células no fagocíticas, como son las células epiteliales del intestino delgado, células diana de *Salmonella* para producir infección.

La detección de la secuencia del gen *hilA* en *Salmonella enterica* serovar typhi, enteritidis, choleraesuis, paratyphi y pullorum podría indicar que los mecanismos de la regulación de los genes de virulencia en estos serovariedades, son similares a los encontrados en *S. enterica* serovar Typhimurium. Este es un hallazgo que aporta al entendimiento de los mecanismos patogénicos de *Salmonella* spp.

La presencia de por lo menos cuatro sistemas fimbriales sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares puede ser un paso crítico en la supervivencia de *Salmonella* en el medio ambiente, ya que esta responde a factores del medio como el pH y la osmolaridad.<sup>(6)</sup>

*Salmonella* establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio intestinal, el cual permanece intacto. Sin embargo, cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado ruffling (rizado).<sup>(1)</sup> Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospede-

ra para reorganizar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que en últimas causan que estas células, normalmente no fagocíticas, internalicen la bacteria en un proceso llamado invasión.

Los estudios de invasión con *Salmonella* han sido llevados a cabo en diversas líneas celulares cultivadas *in vitro* utilizados para observar el fenómeno de invasión. La línea Hep-2 es ampliamente usada por su capacidad *in vitro* de reorganizar sus filamentos de actina, lo cual constituye un evento que facilita el fenómeno de invasión inducido por *Salmonella* en forma similar a como ocurre en el hospedero infectado. La mayoría de estos estudios han sido realizados con el serovar typhimurium por su facilidad de manejo en el laboratorio, ya que no está clasificada como patógeno de alto riesgo; con otros serovariedades clínicamente importantes, se han realizado pocos trabajos sobre su capacidad de invasión *in vitro*.<sup>(7)</sup>

Estudios previos con *S. Typhimurium*, han reportado que el proceso de invasión se ve afectado por condiciones medio ambientales como la osmolaridad, la concentración de oxígeno y las fases de crecimiento bacteriano.<sup>(8,9)</sup>

Este artículo presenta los hallazgos encontrados sobre las diferencias en la capacidad de invasión de serovariedades de *Salmonella enterica* con importancia clínica para humanos, aves y cerdos, bajo condiciones de crecimiento diferentes en cultivos de células Hep-2 y la detección del gen *hilA* en cada serovar estudiado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR para detección del gen *hilA*.

Cada serovar de *Salmonella* estudiado fue repicado en agar Luria Bertani e incubado a 37°C toda la noche; de las colonias obtenidas, se realizó un inóculo en Luria Bertani caldo y se incubó a 37°C nuevamente por 4 horas.

De aquí se tomaron 2 tubos con 1 ml de cultivo de cada serovar para realizar la extracción de DNA. Se utilizó el protocolo de buffer de lisis propuesto por Haque y colaboradores,<sup>(10)</sup> con algunas modificaciones: Se centrifugó cada muestra por separado a 10,000 rpm por cinco minutos a 4°C. Al sedimento se le adicionó 1 ml de buffer de lisis (0.2% Triton X100 en Tris HCL mas EDTA pH 8.0). El tubo fue centrifugado a 12,000 rpm a 4°C por 6 minutos, el sobrenadante fue descartado y el procedimiento fue repetido nuevamente. El sedimento fue lavado una vez con agua destilada y centrifugado a 12,000 rpm a temperatura ambiente por 1 minuto. El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue resuspendido en 30 µl de agua destilada estéril. Los tubos fueron sellados, puestos en agua en ebullición por 20 minutos, y dejados enfriar a temperatura ambiente antes de realizar la PCR.

Los primers utilizados en este trabajo fueron diseñados con base en la secuencia del gen *hilA* descrita previamente.<sup>(11)</sup>

La secuencia de los primers es la siguiente:

Primer US:

5´-GCATGGATCCCCGCCGGCGAGATTGTG-3´

Primer DS:

5´-CGGAACGTTATTTGCGCCATGCTGAGGTAG-3´

El fragmento correspondiente al gen *hilA* es de 854 bp.

Para la realización de la PCR se preparó una mezcla de reacción para amplificación de DNA de 50 µl la cual contiene: 1.5 µl de cada primer a una concentración 20 µM, 10 µl de DNA, 3 µl de Taq polimerasa (Promega, Inc.) (diluida para uso 1:10 en agua destilada), 5 µl de buffer 10x, 6 µl de cloruro de magnesio 20 mM, 0.1 µl de cada dNTP y 22.6 µl de agua destilada para completar el volumen de reacción.

Se utilizó un termociclador PTC 100 MJ research, inc. Peltier-effect cycling, para amplificar el DNA sometiendo la muestra a un ciclo inicial de desnaturación a 94 °C por 5 minutos, un segundo ciclo que constó de 3 pasos: paso 1: 94 °C por 1 minu-

to, paso 2: 65 °C por 1 minuto y paso 3: 72 °C por 1 minuto. El ciclo 2 se repitió 30 veces. Finalmente el ciclo 3 a 72 °C por 10 minutos para la extensión final. 12 ul del producto de reacción fueron fraccionados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% conteniendo 10 ml de bromuro de etidio (10 mg / ml), y fue fotografiado utilizando una cámara Fotodyne (Polaroid)®. La PCR fue realizada por duplicado para cada serovar. En cada gel se corrió adicionalmente un control positivo (Plasmido pVV441 en *E. coli*) y dos controles negativos, uno inicial y otro final que no incluían DNA.

## 2. Pruebas de invasión celular:

### Cultivo de células Hep-2

Los cultivos celulares se realizaron en el medio Eagle's Modified Essential medium (EMEM; Gibco/BRL, Life Technology, Inc., Gaithersburg, Md), suplementado con suero bovino fetal al 5%, glutamina (Gibco/BRL) y Buffer fosfato (PBS). Las células Hep-2 fueron incubadas en botellas planas toda la noche a 37°C con 10 ml de medio de cultivo celular EMEM. Al día siguiente, se confirmó la existencia de la monocapa a través de visualización al microscopio. Se descartó el medio de cultivo y se lavó con 10 ml de PBS. Se lavó una vez mas con PBS-EDTA 0.5%. Se adicionaron 2 ml de PBS-EDTA 0.5% por 10 minutos a 37°C, para desprender la monocapa del frasco y se confirmó a través de la visualización al microscopio. Se adicionaron 8 ml de EMEM. Se realizó recuento de las células Hep-2 en hemocitómetro. A través de diluciones, se ajustó a una concentración de 0.5 x 10<sup>5</sup> a 1 x 10<sup>5</sup> células/ml, y se sembraron las placas con pozos de 1 ml por pozo, las cuales se incubaron a 37° toda la noche.

### Inóculo bacteriano y cuantificación de la invasión.

Se utilizaron aislamientos de las siguientes serovariedades de *Salmonella* enterica: *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* y *S. pullorum*.

Cada serovar de *Salmonella* fue cultivado en agar Luria Berthani a 37°C toda la noche y posteriormente repicados en caldo LB e incubados sin agitación (proporcionando baja concentración de oxígeno) a 37°C. (9) Se prepararon inóculos de 10<sup>6</sup> Unidades Formadoras de Colonia por ml (UFC/ml); de este inóculo se sembraron 100µl en cada pozo de los cultivos celulares los cuales se incubaron a 37°C por dos horas.

Un control del inóculo fue realizado sembrando 100 ul de cultivo bacteriano en agar Luria Bertani a 37°C durante la noche, posteriormente se realizó recuento de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

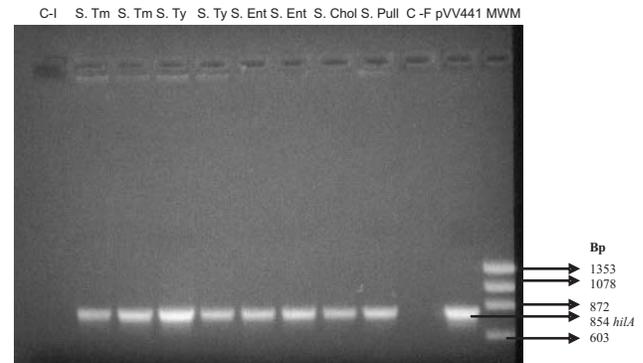
A las dos horas de incubación al cultivo celular inoculado con las bacterias, se le aspiró el medio de cultivo y se adicionó 1 ml de EMEM más 100 ug/ml de gentamicina. El plato se incubó durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente cada pozo se aspiró y lavó 2 veces con PBS, y se adicionó 100 ul de Tritón X-100 al 1 % en agua destilada, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se adicionó 1 ml de Caldo LB a cada pozo. Con una pipeta Pasteur se removió el contenido de cada pozo despegando y lisando las células para liberar las bacterias, este producto se diluyó 1:10, 1:100 y 1:1000. Se sembraron 20 ul de cada dilución y del producto no diluido en agar LB, se incubaron a 37°C por 12-18 horas, se contó el número de UFC/ ml y se calculó el porcentaje de bacterias recuperadas con respecto al inóculo sembrado en cada pozo. Cada ensayo se realizó por triplicado y el resultado final se obtuvo al promediar los porcentajes obtenidos en cada ensayo.

Iguals ensayos se realizaron para determinar la capacidad de invasión de bacterias cultivadas en medios de baja osmolaridad (1% NaCl) y alta osmolaridad (5% NaCl).

## RESULTADOS

Todos los aislamientos presentaron el gen *hilA*, lo cual se evidenció por la presencia de una banda de 854 bp (figura 1).

**Figura 1: Electroforesis de los productos de amplificación de las serovariedades de *Salmonella enterica* probados para la presencia del gen *hilA*.**

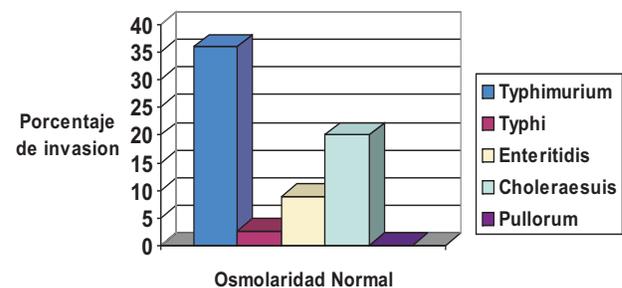


Las serovariedades de *Salmonella* evaluadas presentaron diferentes capacidades de invasión en cultivos celulares.

En los ensayos realizados con aislamientos provenientes del medio con osmolaridad normal se encontró que el mayor porcentaje de invasión correspondió a *S. typhimurium* (36%), seguido por *S. choleraesuis* (20%) y *S. enteritidis* (8.9%). *S. typhi* presentó un bajo porcentaje de invasión (2.3%) y el porcentaje de invasión de *S. pullorum* fue 0; esto se puede observar en la tabla 1 y figura 2.

En los ensayos realizados con aislamientos obtenidos a partir de medio con alta osmolaridad, se presentaron variaciones en los resultados:

**Figura 2: Porcentaje de invasión a osmolaridad normal.**



**Tabla 1. Número y porcentaje de UFC/ml recuperadas de las células Hep-2 de los ensayos de invasividad a osmolaridad normal**

<b>Ensayo</b>	<b>1 Osmolaridad Normal</b>	<b>2 Osmolaridad Normal</b>	<b>3 Osmolaridad Normal</b>	<b>Total</b>	<b>UFC/ml %</b>
Typhimurium	0.42	0.51	0.16	0.36	<b>360.000 – 36</b>
Typhi	0.034	0.014	0.021	0.023	<b>23.000 - 2.3</b>
Enteritidis	0.045	0.073	0.15	0.089	<b>8.900 - 8.9</b>
Choleraesuis	0.051	0.53	0.022	0.20	<b>200.000 - 20</b>
Pullorum	0	0	0	0	<b>0 - 0</b>

**Tabla 2. Número y porcentaje de UFC/ml recuperadas de las células Hep-2 de los ensayos de invasividad a alta osmolaridad**

<b>Ensayo</b>	<b>4 Osmolaridad Alta</b>	<b>5 Osmolaridad Alta</b>	<b>6 Osmolaridad Alta</b>	<b>Total</b>	<b>UFC/ml %</b>
Typhimurium	0.138	No dato	No dato	0.138	<b>138.000 - 13.8</b>
Typhi	0.019	0.041	No dato	0.03	<b>30.000 - 3.0</b>
Enteritidis	0.169	No dato	No dato	0.169	<b>169.000 - 16.9</b>
Choleraesuis	0.106	No dato	No dato	0.106	<b>106.000 - 10.6</b>
Pullorum	0	0.003	0.0115	0.0073	<b>7.300 - 0.73</b>

El mayor porcentaje de invasión lo presentó S. enteritidis con un 16.9%, seguido por S. typhimurium con un 13.8%, S. choleraesuis presentó un 10.6% de porcentaje de invasión, S. typhi presentó una invasión de 3.0%. S. pullorum presentó un porcentaje de invasión de 0.73%, esto se puede observar en la tabla 2 y figura 3.

Comparado con los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se presentó una disminución de la invasión en S. typhimurium y S. choleraesuis y un aumento en el porcentaje de invasión de las otras serovariedades.

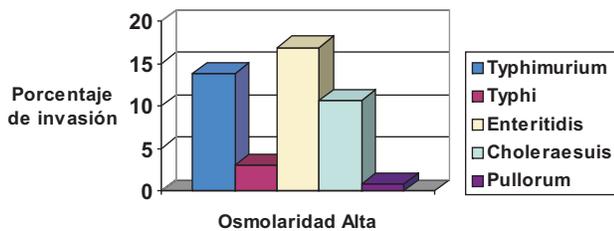
En los ensayos de invasión utilizando aislamientos provenientes de medios de baja osmolaridad, se

observó un porcentaje de invasión similar al obtenido en el ensayo de osmolaridad normal en S. typhimurium, S. enteritidis presentó 11.2% de invasión, S. pullorum 5.7%, S. choleraesuis 3.8% y S. typhi 2.1%, esto se puede observar en la Tabla 3 y la figura 4.

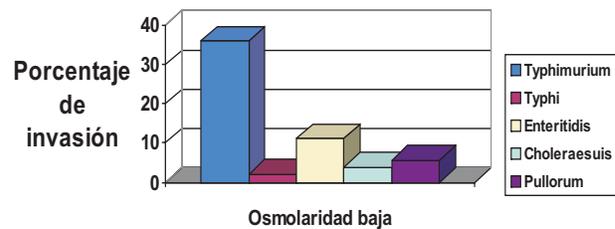
Quando se observan los datos consolidados de invasión en los tres ensayos (Tabla 4) podemos observar que S. typhimurium presentó un porcentaje de invasión del 28.6%, S. enteritidis un 12.3%, S. choleraesuis 11.5%, S. typhi 2.5% y S. pullorum 2.1%.

Estos resultados evidencian que S. typhimurium presentó mayor capacidad de invasión que las demás serovariedades.

**Figura 3: Porcentaje de invasión a alta osmolaridad.**



**Figura 4: Resultados porcentaje de invasión a baja osmolaridad**



**Tabla 3. Número y porcentaje de UFC/ml recuperadas de las células Hep-2 de los ensayos de invasividad a baja osmolaridad**

Ensayo Serovariedad	7 Baja osmolaridad	8 Baja osmolaridad	9 Baja osmolaridad	Total	UFC/ml %
Typhimurium	0.075	0.37	0.64	0.36	<b>360.000 - 36</b>
Typhi	0.005	0.037	No dato	0.021	<b>21.000 - 2.1</b>
Enteritidis	0.033	No dato	0.19	0.112	<b>112.000- 11.2</b>
Choleraesuis	0.038	No dato	No dato	0.038	<b>38.000 - 3.8</b>
Pullorum	0	0.004	0.11	0.057	<b>57.000 - 5.7</b>

**Tabla 4. Consolidado datos de ensayos de invasión celular a diferentes osmolaridades.**

Medio Serovariedad	LB	% recuperación	LB Alta osmolaridad	% recuperación	LB Baja osmolaridad	% recuperación	Total UFC/ml %
S. Typhimurium	0.36	36	0.138	13.8	0.36	36	<b>286.000 - 28.6%</b>
S. Typhi	0.023	2.3	0.03	3	0.021	2.1	<b>25.000 - 2.5%</b>
S. Enteritidis	0.089	8.9	0.169	16.9	0.112	11.2	<b>123.000 - 12.3%</b>
S. Choleraesuis	0.20	20	0.106	10.6	0.038	3.8	<b>115.000 - 11.5%</b>
S. Pullorum	0	0	0.0073	0.73	0.057	5.7	<b>21.000 - 2.1%</b>

S. enteritidis y S. choleraesuis presentaron niveles de invasión intermedia, esto fue similar para las dos serovariedades, sin diferencias significativas.

Las tres serovariedades anteriores como se mencionó previamente, tienen un amplio rango de hospederos; mientras que S. typhi y S. pullorum, que

presentan especificidad de hospedero presentaron porcentajes de invasión bajos (2.5% y 2.1 % respectivamente).

Se observó también que la invasión en cultivos celulares, varió dependiendo de la osmolaridad del medio, pues la invasión de las serovariedades de

*Salmonella* aumentó en condiciones de alta osmolaridad y bajas concentraciones de oxígeno.

## **DISCUSIÓN**

Diversos estudios se han llevado a cabo tanto *in vivo* como *in vitro* para dilucidar los mecanismos patogénicos de *Salmonella*, principalmente las interacciones con células no fagocíticas. Tradicionalmente *in vivo* se ha utilizado el modelo murino infectado con *S. typhimurium* para simular el proceso de fiebre tifoidea que se desarrolla en el humano. Con base en esto se ha obtenido información sobre algunos de los mecanismos de interacción de *Salmonella typhimurium* con el hospedero, que ha sido interpretada como mecanismos comunes al género *Salmonella*.

Se conoce ahora que este proceso no es similar en el ratón y en el humano, ya que el serovar *typhimurium* en el ratón produce un cuadro clínico de fiebre tifoidea y en el humano produce enteritis. En la mayoría de los casos la infección producida por *S. typhimurium* en humanos se queda restringida a nivel del epitelio intestinal y no presenta diseminación sistémica. Por esto, el modelo de fiebre tifoidea murino debe ser interpretado con cuidado cuando los resultados se extrapolan al proceso que ocurre en humanos infectados con *S. Typhi*.

Otros modelos animales como terneras, gatos, cerdos y aves han sido menos estudiados, utilizando otras especies de *Salmonella*.<sup>(12)</sup>

Teniendo como base las dificultades de los estudios en modelos animales, tanto por las implicaciones éticas como por las diferencias intrínsecas del hospedero, un gran número de trabajos se han realizado *in vitro* en cultivos de diversas líneas celulares humanas como Henle-407, Int 407, Hela, Caco-2 y Hep-2<sup>(13)</sup> y animales como MODE-K (14), tratando de obtener resultados específicos para cada hospedero.

En este trabajo se realizaron cultivos celulares de las células HEP-2 (carcinoma de laringe humano),

· células no fagocíticas, reconocidas por su capacidad *in vitro* de reorganizar su citoesqueleto de actina, lo cual permite que la interacción con *Salmonella* pueda semejar lo que ocurre en el humano.

· Las serovariedades de *Salmonella*, no *typhimurium*, han sido menos estudiadas, lo cual se refleja en el poco conocimiento acerca de sus mecanismos de invasión y las diferencias que se puedan observar entre ellos en cuanto a su capacidad de invasión y a su especificidad de hospedero.

· En este trabajo se evaluó la capacidad de invasión de *Salmonella* serovariedades *typhimurium*, *typhi*, *enteritidis*, *choleraesuis* y *pullorum*, por ser clínicamente importantes para el hombre y/o los animales. *S. typhimurium* y *S. enteritidis* pueden producir en el humano enteritis y en casos menos frecuentes septicemia; en los animales, ratones y aves respectivamente, pueden producir cuadros sistémicos. *S. typhi* es específica del humano y produce fiebre tifoidea, *S. choleraesuis* es patógeno de cerdos, en el humano puede producir septicemia. *S. pullorum* es específico de aves y en casos excepcionales puede producir infección en el humano.

· En este trabajo *S. typhimurium* presentó mayor capacidad de invasión que las otras serovariedades evaluadas, independiente de la osmolaridad del medio de cultivo del cual provenía. La capacidad de invasión de *Salmonella* se favoreció por la disminución de la concentración de oxígeno, la alta osmolaridad y el pH ácido.<sup>(15)</sup>

· En otros estudios, la capacidad de invasión de las serovariedades de *Salmonella* en estas líneas celulares determinaron que existe interacción diferencial de las tres serovariedades de *Salmonella* (*typhi*, *typhimurium* y *dublin*) estudiadas, con células humanas y murinas, siendo el de mayor capacidad de invasión en ambas líneas celulares *S. typhi*, que bajo condiciones óptimas se adhiere e invade más efectivamente que los otros dos serovariedades de *Salmonella* analizados,<sup>(16)</sup> a diferencia de estos reportes, en nuestro estudio encontramos que *S. typhi* fue una de las serovariedades que presentó menor invasión en células Hep-2.

Esta diferencia probablemente se deba al tipo de cultivo celular utilizado para realizar el estudio y a las diferencias de los ensayos realizados.

La capacidad de invasión tanto a baja como a alta osmolaridad de *S. pullorum*, fue baja, esto puede atribuirse a que normalmente esta serovariedad no induce enfermedad en el humano y su invasión en células humanas está determinada por factores como la presencia de ciertas fimbrias o hemaglutininas que le permiten adherirse a las células epiteliales e invadir. Un estudio previo<sup>(17)</sup> demostró que *S. pullorum* y *S. gallinarum*, aumentaban su capacidad de invasión cuando presentaban en su genoma una inserción de una secuencia de *S. typhimurium* que correspondía a la fimbria.

Otros trabajos han explorado específicamente las interacciones de estas serovariedades productoras de enfermedad en las aves con células de pollos,<sup>(18)</sup> en las cuales la salmonelosis constituye una importante causa de infección con las consiguientes pérdidas económicas o transmisión al humano por la ingestión de alimentos de origen aviar contaminados.

En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de invasión de las otras serovariedades; esto se puede deber a que la capacidad de invasión *in vivo* no corresponde a lo observado *in vitro*, por la ausencia de factores del medio ambiente intestinal diferentes a la osmolaridad, como la presencia de ácidos grasos,<sup>(19)</sup> que influyen la capacidad de invasión de estas bacterias y cuyos requerimientos no se tomaron en cuenta en el modelo *in vitro* realizado. Por otra parte *Salmonella*, responde a la presencia de la célula hospedera por activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado Tipo III o dependiente de contacto. Este sistema permite secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera eucariótica.<sup>(1)</sup>

Los dos sistemas de secreción tipo III de *Salmonella* son codificados en dos distintos grupos de genes llamados islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-

2),<sup>(20)</sup> tradicionalmente se ha considerado que cumplen dos papeles diferentes durante la patogénesis, SPI-1 es requerida para la penetración inicial de la mucosa intestinal y SPI-2 necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica.

SPI-1, contiene por lo menos 29 genes, que codifican varios componentes de un sistema de secreción tipo III, sus reguladores y sus efectores secretados, está localizada en su centisoma 63.

Muchos genes de invasión son codificados en la SPI-1, y su expresión es activada por HilA, un factor de transcripción codificado por el gen *hilA* de SPI-1.

Murray y col,<sup>(21)</sup> proponen un modelo para la patogénesis de *S. enterica* en el cual *hilA* y los genes de invasión son requeridos por *Salmonella* para evitar el aclaramiento por la respuesta inmune del hospedero, despertada por otros productos de los genes de la SPI-1.

Los genes de SPI-1 son expresados en forma máxima a 37°C y bajo condiciones de oxígeno limitado, además la expresión es óptima a pH neutro, a alta osmolaridad, y durante la última fase de crecimiento logarítmico.<sup>(22)</sup>

El gen *hilA* es un regulador transcripcional de genes de invasión, su expresión es activada por la proteína SirA que es codificado por el gen *sirA*.<sup>(23)</sup> La expresión de *hilA* también es regulada por PhoP - PhoQ un sistema de dos componentes que gobierna la virulencia, mediante la adaptación a medios ambientes limitados en magnesio. Actualmente se conoce que el gen *hilD* reprime la expresión de *hilA* cuando las condiciones ambientales no son favorables para la invasión.<sup>(24)</sup>

La presencia del gen *hilA* de las serovariedades probados fue determinada por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con primers diseñados por el grupo de trabajo de *Salmonella* del Instituto Colombiano de Medicina Tropical, específicos para la secuencia del gen *hilA* que amplificaban una banda correspondiente a 854 pb.

Este gen *hilA* es requerido por las bacterias para invadir las células Hep-2.<sup>(25)</sup>

## CONCLUSIÓN

Estos hallazgos evidencian diferencias en el proceso de invasión de aislamientos de *Salmonella* que afectan diferentes tipos de hospederos. Además demuestran la importancia del gen *hilA* en el proceso de invasión de células epiteliales no fagocíticas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin Microbiol Rev 1999; 12(3): 405-428.
2. Zhou D, Galán J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. Microbes Infect 2001; 3(14-15): 1293-1298.
3. Miller S, Hohmann E, Pegues D. *Salmonella* (including *Salmonella* Typhi). In: Mandell, G, Bennett J, Dolin R. Principles and Practice of Infectious diseases. Fourth edition. Churchill Livingstone; 1995. p. 2103-2133.
4. Winstanley C, Hart CA. Type III secretion systems and pathogenicity islands. J Med Microbiol 2001; 50(2): 116-126.
5. Cardona-Castro N, Restrepo Pineda E, Correa-Ochoa M. Detection of *hilA* gene sequences in serovars of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(8): 1153-1156.
6. Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA. Co-ordinate regulation of *Salmonella* typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. Mol Micro 1996; 22(4): 703-714.
7. Pace J, Hayman MJ, Galan JE. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. Cell 1993; 72(4): 505-514.
8. Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(15): 7800-7804.
9. Mill SD, Finlay BB. Comparison of *Salmonella* typhi and *Salmonella* typhimurium invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. Microb Pathog 1994; 17(6): 409-423.
10. Haque A, Ahmed J, Quieshi JA. Early detection of typhoid by polymerase chain reaction. Ann Saudi Med 1999; 19(4): 337-340.
11. Cardona-Castro NM, Sanchez-Jiménez MM, Correa-Ochoa MM. Desarrollo de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa PCR, utilizando la secuencia del gen *hilA* para diagnóstico de fiebre tifoidea. Infectio 2001; 5(2): Resumen D8: 101.
12. Santos RL, Zhang S, Tsohis RM, Bäumlner AJ, Adams LG. Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. Vet Pathol 2002; 39(2): 200-215.
13. Solano C, Sesma B, Alvarez M, Urdaneta E, Garcia-Ros D, Calvo A, Gamazo C. Virulent strains of *Salmonella enteritidis* disrupt the epithelial barrier of Caco-2 and HEp-2 cells. Arch Microbiol 2001; 175(1): 46-51.
14. Schmitt CK, Ikeda JS, Darnell C, Watson R, Bispham J, Wallis T, et al. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture

- invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* 2001; 69(9): 5619-5625
15. Lundberg U, Vinatzer U, Berdnik D, von Gabain A, Baccarini M. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* 1999; 18(11): 3433-3437.
  16. Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figuereido J, et al. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 2003; 71(1): 1-12.
  17. Wilson RL, Elthon J, Clegg S, Jones BD. *Salmonella enterica* serovars gallinarum and pullorum expressing *Salmonella enterica* serovar typhimurium type I fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells. *Infect Immun* 2000; 68(8): 4782-4785.
  18. Aabo S, Christensen JP, Chadfield MS, Carstensen B, Jensen TK, Bisgaard M, Olsen JE. Development of an in vivo model for study of intestinal invasion by *Salmonella enterica* in chickens *Infect Immun* 2000; 68(12): 7122-7125.
  19. Cano, DA, Martínez-Moya M, Pucciarelli MG, Groisman EA, Casadesus J, Garci - Del Portillo F. *Salmonella enterica* serovar typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* 2001; 69(10): 6463-6474.
  20. Ochman H, Groisman EA. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 1996; 64(12): 5410-5412.
  21. Murray RA, Lee CA. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island I has alternative functions during infection. *Infect Immun* 2000; 68(9): 5050-5055.
  22. Weinstein DL, O'Neill BL, Hone DM, Metcalf ES. Differential early interactions between *Salmonella enterica* serovar Typhi and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66(5): 2310-2318.
  23. Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BM. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 2003; 185(24): 7257-7265.
  24. Lucas RL, Lee CA. Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expresion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2001; 183(9): 2733-2745.
  25. Galan JE. Interactions of *Salmonella* with host cells: encounters of the closest kind. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(24): 14057-14059.

