

Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular

Mussaret B. Zaidi,* Constantino López Macías,** Edmundo Calva***

RESUMEN. En esta revisión se presenta el trabajo en *Salmonella* de tres grupos de investigación en México, cada uno en diferentes disciplinas que son, sin embargo, complementarias. Se plantea, por un lado, la necesidad de una vigilancia epidemiológica continua de *Salmonella* a lo largo de la cadena alimenticia, aunada a una tipificación molecular de las cepas aisladas. Los hallazgos epidemiológicos y moleculares servirán, por otro lado, como base para establecer un programa nacional o regional de control que incluya el desarrollo de vacunas específicas. La información también puede ser utilizada para el desarrollo de sistemas de diagnóstico más rápidos y específicos.

Palabras clave: *Salmonella*, epidemiología, tipificación molecular, vacunas.

ABSTRACT. This review presents the studies on *Salmonella* conducted by three research groups in Mexico. Each of these groups belongs to different but complementary disciplines. The need for continuous epidemiological surveillance of *Salmonella* throughout the food chain, in conjunction with molecular typing of the isolates is discussed. The epidemiological and molecular findings should serve as the basis for a national or regional control program that includes the development of specific vaccines. The information can also be used to develop rapid and specific diagnostic tests.

Key words: *Salmonella*, epidemiology, molecular typing, vaccines.

LA SALMONELOSIS Y LA FIEBRE TIFOIDEA EN MÉXICO

La salmonelosis se considera un problema de salud pública mundial. *Salmonella enterica* causa infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede ocasionar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunosuprimidos.⁷ En los países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia, que les permite conocer con relativa certeza la incidencia de las infecciones por *Salmonella* y otros patógenos causales de diarrea, así como el impacto de cada una de éstas en la morbilidad y mortalidad de la población.^{2,11,19} En los Estados Unidos de América y el Reino Unido, por ejemplo, se calcula que al año ocurren 1'412,498 y 73,193 infecciones por *Salmonella* no-Typhi,^{1,11} respectivamente, y se estima que este patógeno es responsable de aproximadamente 30% de las muertes relacionadas a infecciones transmitidas por alimentos. La comunidad científica y las autoridades sanitarias asumen que, en

general, los pollos, cerdos y bovinos son los reservorios mas frecuentes de *Salmonella*; que la ingestión de alimento directa o indirectamente contaminado es la causa más común de las infecciones en el humano; y que todas las serovariedades tienen el mismo grado de patogenicidad.^{6,16} Por las dificultades técnicas y logísticas, existen pocos estudios sobre la transmisión de este patógeno a lo largo de toda la cadena alimenticia y las condiciones necesarias para producir enfermedad en un hospedante humano. Por ende, la legislación referente a inocuidad alimentaria establece medidas de control o límites de tolerancia basados en información epidemiológica obtenida de estudios transversales realizados en las naciones industrializadas. En muchas ocasiones esta información no puede ser extrapolada al panorama de los países en desarrollo.

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos, y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *Salmonella* en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que cada una de estas entraña para la salud de los seres humanos. Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*.

* Departamento de Investigación, Hospital General O'Horan, Mérida, Yucatán, México, mbzaidi@prodigy.net.mx

** Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México, constantino@sminmunologia.org

*** Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, ecalva@ibt.unam.mx

En respuesta a la necesidad de obtener mayor información sobre la transmisión de *Salmonella* a través de la cadena alimenticia en México, la Dra. Mussaret B. Zaidi y sus colaboradores establecieron un sistema de vigilancia activa, que incluyó a los Estados de Yucatán, San Luis Potosí, Michoacán y Sonora. La vigilancia incluyó muestras de humanos, carnes crudas, e intestinos de animales sacrificados en rastros.

Una forma particular de infección por *Salmonella* en el humano es la fiebre tifoidea, la cual es causada por la ingestión e invasión intestinal por un serotipo específico de *Salmonella enterica*, el serovar Typhi (*S. typha*), que produce infección sistémica.³ De hecho, las salmonelosis producidas por otros serotipos causan comúnmente una gastroenteritis aunque, como se apuntó con anterioridad, pueden presentar cuadros invasivos. Aquí surgen preguntas muy interesantes, como las referentes a conocer si hay determinantes genéticos de las salmonelas no-Typhi para los cuadros invasivos y si algunos de estos determinantes se comparten con *S. Typhi*.

Anualmente, en el mundo hay al menos 16 millones de casos de fiebre tifoidea, resultando en 600,000 muertes. En México se han reportado alrededor de 15 mil casos al año de fiebre tifoidea.¹⁸ Es relevante insistir, como se mencionó con anterioridad, que esta incidencia se basa primordialmente en una valoración clínica, sin que se hayan aplicado métodos confiables de diagnóstico. Esto implica, por tanto, un grado de incertidumbre en la estadística.

Las vacunas actualmente disponibles contra la fiebre tifoidea son: a) La vacuna parenteral K (muerta por acetona) y vacuna parenteral L (muerta por calor-fenol). A pesar de que estas vacunas inducen protección de 79-88% y de 51-77% respectivamente, presentan fuertes efectos secundarios adversos lo cual las hace imprácticas. b) La vacuna oral Ty21a, producida con *S. Typhi* atenuada mediante mutagénesis química. Aunque esta vacuna ha mostrado inducir protección del 67% al 96%, se requieren de 3-4 dosis para la generación de protección y de refuerzo cada 5 años, lo cual hace que sea una vacuna cara y poco práctica para zonas endémicas. c) La vacuna parenteral a base del antígeno capsular Vi, el cual es un polisacárido que cubre a la bacteria. En estudios de campo, la vacuna indujo elevados títulos de anticuerpos y confirió una protección del 64% al 72%. Debido a su naturaleza química, el polisacárido Vi no induce memoria inmunológica por lo cual se requieren refuerzos cada 3 años y es poco inmunogénico en niños menores de 2 años y en adultos mayores.¹⁵ Cabe mencionar, por otro lado, que no hay actualmente una vacuna contra las otras serovariedades de *Salmonella* capaces de producir infecciones sistémicas.

Con el fin de desarrollar una vacuna contra la fiebre tifoidea que sea efectiva, barata y que induzca una respues-

ta protectora de larga duración, el grupo del Dr. Armando Isibasi ha utilizado las proteínas de la membrana externa de *S. Typhi* denominadas porinas;^{8-10, 15} mientras que el Dr. Constantino López-Macías y su grupo han analizado los mecanismos moleculares y celulares de la respuesta inmune inducida por la vacuna de porinas.^{15,17}

EPIDEMIOLOGÍA DE LA *SALMONELLA* EN MÉXICO

La Dra. Zaidi y colaboradores colectaron, entre 2003 y 2005, 2,893 muestras fecales de pacientes con diarrea, 5334 muestras de carne de pollo, puerco y res, y 1,882 muestras de intestinos de pollo, cerdo y bovino en rastros. Se aisló *Salmonella* no-Typhi en 12.8% de los pacientes con diarrea. Las dos serovariedades más frecuentes en estos últimos fueron Typhimurium (22.2%) y Enteritidis (14.5%). La primera se encontró en los tres tipos de animales y sus carnes crudas, siendo el cerdo el reservorio principal (10.2% de todas las serovariedades aisladas en este animal), seguido por bovino (6.8%) y pollo (4.6%). *S. Enteritidis* se aisló casi exclusivamente de pollo (11.9% de todas las serovariedades aisladas en este animal); en bovino y cerdo, el aislamiento de esta serovariedad apenas alcanzó el 0.1%. En un estudio previo demostraron, mediante la técnica de electroforesis de campos pulsados, que las cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, aisladas de niños con diarrea en el estado de Yucatán, eran genéticamente idénticas o muy relacionadas con aquéllas aisladas de las carnes crudas.²⁰ Los estudios preliminares de los aislamientos en los otros tres Estados también muestran una relación clonal entre las cepas de *S. Typhimurium* procedentes de humanos y animales. Cabe mencionar que durante el periodo de estudio, los hospitales participantes de los cuatro Estados reportaron 26 casos de bacteremia y meningitis, de los cuales destacaron las serovariedades Enteritidis (seis), Typhi (seis) y Typhimurium (siete).

Otro hallazgo importante del programa de vigilancia fue la resistencia a múltiples antibióticos en la serovariedad Typhimurium. En el 2002 se detectó la aparición de *S. Typhimurium* resistente a diez antibióticos, tales como ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, ácido nalidíxico y cefalosporinas de espectro extendido, en el estado de Yucatán. Hasta la fecha se han registrado tres decesos por *S. Typhimurium* multirresistente, en lactantes menores de seis meses atendidos en el Hospital General "O'Horán" del Estado de Yucatán. Este microorganismo parece causar cuadros diarreicos más severos que los provocados por otras serovariedades o por *S. Typhimurium* no-multirresistente. En el caso de *S. Enteritidis*, se han registrado casos de meningitis asociadas a defunción o secuelas neurológicas graves. Otro hallazgo de gran preocupación es que desde el año 2003 se detectó re-

sistencia a cefalosporinas de espectro extendido en otras serovariedades, como Newport, Reading, Kentucky, Anatum, Uganda y Bredeney. Estos aislamientos también eran resistentes a varios otros antimicrobianos, pero en menor número que *S. Typhimurium*. El impacto de estas cepas multirresistentes debe vigilarse cuidadosamente en el futuro.

En resumen, los estudios de Zaidi y colaboradores indican que *Salmonella enterica* continua siendo una importante causa de morbimortalidad en México. *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son las serovariedades más frecuentemente aislados de niños con diarrea; además, junto con *S. Typhi*, han sido causa de sepsis y meningitis fatales. En los últimos años, los aislamientos de *Salmonella* presentan un aumento progresivo de la resistencia a los antibióticos, lo cual complica el manejo de los pacientes. La creación de un sistema de vigilancia epidemiológica para *Salmonella* que integre los sectores médicos, de regulación sanitaria, veterinaria y de investigación, es indispensable para que las autoridades respectivas establezcan intervenciones basadas en la evidencia y adecuadas a las necesidades nacionales.

EL DESARROLLO DE UNA VACUNA MEXICANA

En referencia al desarrollo de una vacuna en México contra *S. Typhi*, el grupo del Dr. Isibasi ha demostrado que las porinas son blancos importantes durante la respuesta inmune en pacientes con fiebre tifoidea y en humanos vacunados, y también que las porinas son antígenos que inducen protección en un modelo experimental con ratones.⁸⁻¹⁰ A partir de estos estudios, los doctores Isibasi y López Macías han desarrollado una preparación vacunal para uso en humanos con estas proteínas. La vacuna es estable a temperatura ambiente y no indujo fiebre ni efectos tóxicos en estudios preclínicos en modelos animales. Recientemente, evaluaron la respuesta inmune celular y humoral inducidas por las porinas en humanos (Fase I). La vacuna de porinas no induce efectos secundarios adversos y generó la producción de anticuerpos específicos caracterizados por IgM, IgG1 e IgG2 con capacidad bactericida, al igual que una respuesta inmune celular caracterizada por la producción de interferón gamma.¹⁵

En este mismo trabajo, este grupo demostró que las porinas son capaces de activar a la respuesta inmune innata, al ser captadas por macrófagos derivados de médula ósea, señalizando a través de TLR-2 y TLR-4 e induciendo la activación de células dendríticas y macrófagos, lo cual genera una sobre expresión de moléculas co-estimuladoras, moléculas de clase II y de activación. Además, las porinas activaron células dendríticas, induciendo la producción de citocinas pro- y anti- inflamatorias y mostraron capacidad adyuvante en la respuesta de anticuerpos contra antígenos

modelo: esta capacidad se conservó 400 días posteriores a la primera inmunización.

También se ha evaluado la capacidad de las porinas y de sus componentes (OmpC y OmpF) de conferir inmunidad humoral de larga duración.¹⁷ La inmunización de ratones BALB/c con porinas, sin la presencia de adyuvante, indujo altos títulos de IgG durante toda su vida (año y medio después de la inmunización). La caracterización de las subclases de IgG observadas durante la respuesta de larga duración mostró la presencia de IgG2b, IgG1, IgG2a y bajos títulos de IgG3. Los sueros anti-porinas mediaron un efecto bactericida específico contra la cepa tipo silvestre de *S. Typhi*, mediante la unión a la superficie bacteriana y activación de la vía clásica del complemento.

Debido a que la preparación de porinas está compuesta por las proteínas de la membrana externa C y F (OmpC y OmpF), estas proteínas se purificaron en forma individual y se evaluó la capacidad de cada una de inducir anticuerpos de larga duración, así como su importancia en conferir protección al reto con *Salmonella*. Se observó que OmpC indujo altos títulos de anticuerpos bactericidas que se mantuvieron durante los 300 días posteriores a la inmunización, mientras que los títulos bactericidas de OmpF dejaron de detectarse después del día 90. Estos resultados fueron confirmados al efectuar ensayos de protección, donde se encontró que OmpC confirió el 100% y 80% de supervivencia al reto con 100 y 500 DL₅₀ de *S. Typhi*, mientras que OmpF sólo indujo el 70% y 60% de protección al reto con las mismas dosis. Esto indica que OmpC es el principal componente que confiere la mayor inmunogenicidad y capacidad protectora de las porinas.

En conclusión, se demostró la gran capacidad inmunogénica de las porinas para inducir anticuerpos bactericidas de larga duración, que pueden ser un mecanismo efector importante del sistema inmune contra *Salmonella*. Estos resultados nos indican que las porinas son proteínas capaces de activar de manera simultánea tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, por lo que pueden considerarse como antigénicas y como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La capacidad adyuvante intrínseca mostrada por las porinas pudiera ser la responsable de la inducción de anticuerpos bactericidas vitales y de la protección ante la infección con la bacteria que se han descrito anteriormente.

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS PORINAS

Entusiasmado por una conversación con el Dr. Jesús Kumate, el Dr. Edmundo Calva se enfocó en la biología molecular de las porinas. Su grupo en México aisló el gen para la porina OmpC de *S. Typhi*, cuando el único gen

ompC que se había aislado era el de *Escherichia coli*.¹³ Siguiéron estudios sobre la regulación del gen *ompC* y sobre la capacidad de la proteína OmpC para acarrear epítopos heterólogos, entre otros.

Recientemente, el grupo del Dr. Calva descubrió los genes para dos nuevas porinas, OmpS1 y OmpS2. A diferencia de OmpC y OmpF, que son proteínas muy abundantes en la célula, las porinas descubiertas se sintetizan en concentraciones muy bajas en condiciones estándar de laboratorio. Al igual que las porinas mayoritarias, OmpS1 y OmpS2 son regulados positivamente por el regulador OmpR; asimismo, el gen *ompS1* es regulado negativamente por la proteína nucleoide H-NS y *ompS2* es regulado positivamente por el regulador LeuO.^{4,5,12} Interesantemente, mutantes en *ompS1*, *ompS2* y en *leuO* están atenuadas para la virulencia en el ratón, por lo que las porinas y el regulador correspondiente aparentan tener un papel en la patogénesis.¹⁴

PERSPECTIVAS

El estudio de la *Salmonella* en México se presta para un proyecto de largo aliento interdisciplinario. En él se deberán conjugar estudios epidemiológicos cuidadosamente diseñados, en los cuales se identifiquen las serovariedades asociadas con mayor frecuencia a morbimortalidad y en donde se correlacionen los diferentes cuadros clínicos con las cepas aisladas. Esto permitirá explorar si, en este patógeno, existen bases genéticas para el desarrollo de cuadros clínicos diferentes y si las cepas tienen orígenes evolutivos diferentes. De esta manera, se podrán tomar medidas de control de acuerdo a la virulencia de las cepas que prevalezcan en los alimentos. En cuanto al desarrollo de vacunas, la vasta experiencia con la vacuna de las porinas para la fiebre tifoidea, deberá aprovecharse para generar vacunas contra las cepas no-Typhi que representen un mayor peligro por su virulencia. Asimismo, será interesante probar la capacidad protectora de los antígenos recientemente identificados, OmpS1 y OmpS2.

AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los apoyos de la United States Food and Drug Administration (Donativo FD-U-001934-03-2) y del Capítulo Peninsular de la Fundación Mexicana para la Salud, a M.B.Z.; y del Conacyt (Donativo 46115-Q) a E.C.

REFERENCIAS

- Adak, G.K., S.M. Meakins, H. Yip, B.A. Lopman & S.J. O'Brien. 2005. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerg Infect Dis*. 11:365-372.
- de Jong, B. & K. Ekdahl. 2006. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. *BMC Public Health* 10: 6-4.
- Everest, P., J. Wain, M. Roberts, G. Rook & G. Dougan. 2001. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol.* 9:316-320.
- Fernández-Mora, M., J.L. Puente & E. Calva. 2004. OmpR and LeuO regulate the *Salmonella typhi ompS2* quiescent porin gene. *J. Bacteriol.* 186:2909-2920.
- Flores-Valdez, M.A., J. L. Puente & E. Calva. 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J. Bacteriol.* 185:6497-6506, 2003.
- Food Safety and Inspection Service. Pathogen reduction; hazard analysis and critical control point systems; proposed rule. 1995. *Federal Register* 60: 6774-6889.
- Goldberg, M.B. & R.H. Rubin. 1988. The spectrum of *Salmonella* infection. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2:571-598.
- Isibasi, A., V. Ortiz, M. Vargas, J. Paniagua, C. Gonzalez, J. Moreno & J. Kumate. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d, Vi. *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
- Isibasi, A., V. Ortiz-Navarrete, J. Paniagua, R. Pelayo, C. R. Gonzalez, J. A. Garcia & J. Kumate. 1992. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* 10:811-813.
- Isibasi, A., J. Paniagua, M. P. Rojo, N. Martín, G. Ramírez, C. R. González, C. López-Macias, J. Sánchez, J. Kumate & V. Ortiz-Navarrete. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 730:350-352.
- Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin & R.V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect. Dis.* 5: 607-625.
- Oropeza, R., C.L. Sampieri, J.L. Puente & E. Calva. 1999. Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *S. typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* 32: 243-252.
- Puente, J.L., V. Flores, M. Fernández, Y. Fuchs & E. Calva. 1987. Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* 61:75-83.
- Rodríguez-Morales, O., M. Fernández-Mora, I. Hernández-Lucas, A. Vázquez, J.L. Puente & E. Calva. 2006. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infect. Immun.* 74:1398-1402.
- Salazar-González, R. M., C. Maldonado-Bernal, N. E., Ramírez-Cruz, N., Ríos-Sarabia, J. Beltrán-Nava, J. Castañón-González, N. Castillo-Torres, J. A. Palma-Aguirre, M. Carrera-Camargo, C. Lopez-Macias & A. Isibasi. 2004. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol. Lett.* 93:115-122.
- Sarwari, A.R., L. S. Magder, P. Levine, A.M. McNamara, S. Knowler, G.L. Armstrong, R. Etzel, J. Hollingsworth & J.G. Morris, Jr. 2001. Serotype distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. *J. Infect. Dis.* 183:1295-1299.
- Secundino, I., C. López-Macias, L. Cervantes-Barragán, C. Gil-Cruz, N. Ríos-Sarabia, R. Pastelín-Palacios, M. A. Villasis-Keever, I. Becker, J. L. Puente, E. Calva & A. Isibasi. 2006. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 117:59-70.

18. Valdespino-Gómez, J.L., M.L. García-García, A. Del Río-Solezzi, S.Giono-Cerezo, R.A. Salcedo-Álvarez & J. Sepúlveda-Amor. 1994. Epidemiology and etiology of infectious diarrheas. The case of Mexico. Rev. Latinoam. Microbiol. 36:307-324.
19. World Health Organization. WHO global strategy for food safety: safer food for better health. 2002. Geneva, Switzerland (ISBN-92-4-154574-7).
20. Zaidi, M.B., P.F. McDermott, P. Fedorka-Cray, V. León, C. Canché, S.K. Hubert, J. Abbott, M. León, S. Zhao, M. Headrick, L. Tollefson. 2006. Non-typhoidal *Salmonella* from hu-

man clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. Clin. Infect. Dis. 42:21-28.

Correspondencia:

Dr. Edmundo Calva,
Instituto de Biotecnología, UNAM,
Av. Universidad 2001,
Cuernavaca, Morelos 62210 México.
Correo electrónico: ecalva@ibt.unam.mx