



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DIVERSIDAD DE FENOTIPOS ASOCIADOS A VIRULENCIA ENTRE CEPAS DE
Salmonella enterica serovar Enteritidis AISLADAS DESDE DISTINTOS HOSPEDEROS
EN CHILE.

VANESSA PAOLA GORNALL CONCHA.
Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal.

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT DE INICIACIÓN 11110398.

SANTIAGO, CHILE.

2012.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DIVERSIDAD DE FENOTIPOS ASOCIADOS A VIRULENCIA ENTRE CEPAS DE
Salmonella enterica serovar Enteritidis AISLADAS DESDE DISTINTOS HOSPEDEROS
EN CHILE.

VANESSA PAOLA GORNALL CONCHA.
Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal.

PROFESOR GUÍA:	PATRICIO RETAMAL	NOTA	FIRMA
PROFESOR CORRECTOR:	HÉCTOR HIDALGO	NOTA	FIRMA
PROFESOR CORRECTOR:	SERGIO BUCAREY	NOTA	FIRMA

Financiamiento: Proyecto FONDECYT DE INICIACIÓN 11110398.

SANTIAGO, CHILE.

2012.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA.

Este trabajo no me habría sido posible sin la orientación del doctor Patricio Retamal, a quién le agradezco por entregarme parte de su conocimiento, tiempo, apoyo y paciencia, además de darme algo muy valioso para poder obtener resultados significativos en la investigación; un ambiente de trabajo tranquilo y agradable.

A Catalina Pardo, Marcela Fresno y Katherine Rodríguez, les doy las gracias eternas por el excelente recibimiento, amistad, apoyo incondicional y disponibilidad para cualquier problema que enfrenté durante mi trabajo en el laboratorio, además de expresarles mi respeto y admiración en todos los sentidos existentes.

A los demás integrantes del laboratorio de Medicina Preventiva, gracias por su amabilidad y en especial a los “tíos de la sala de lavado”; Patricio Toro y Humberto Antilef, gracias mil por su simpatía, respeto y porque sin ustedes no podría haber tenido lo necesario tanto en materiales como en conocimiento para llevar acabo mis experimentos.

Finalmente pero no menos importante, dedico esta memoria de título a mi familia y a mis amigos, quienes componen lo que soy. Les estaré eternamente agradecida por la incondicionalidad, respeto y amor que día a día recibo de ustedes, ya que sin ello no habría de tener la motivación para construir mi vida.

RESUMEN.

En Chile y el mundo, el aumento de la prevalencia de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), ha generado gran preocupación sanitaria y económica. La principal fuente de infección para el ser humano es el consumo de productos avícolas, aunque también se ha sugerido el rol de aves silvestres en la transmisión directa del agente, hacia personas y aves comerciales. El objetivo de este trabajo, fue determinar la diversidad fenotípica ligada a virulencia de cepas de *S. Enteritidis*, aislada desde aves comerciales, aves acuáticas y seres humanos en Chile y observar su asociación a estos hospederos. Los fenotipos de virulencia testeados *in vitro* fueron la supervivencia en acidez (pH3), en estrés oxidativo ($H_2O_2/NaNO_2$) y hambruna. Bajo acidez, se observó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre cepas a los 30min de ensayo. En estrés oxidativo ($H_2O_2/NaNO_2$), se determinó diferencias ($p \leq 0,05$) entre cepas a los 30min y 3h respectivamente. Finalmente, bajo hambruna se observó diferencias ($p \leq 0,05$) entre cepas y entre hospederos en todos los días de medición (días 10, 20, 30 y 40). En conclusión, existe diversidad fenotípica ligada a virulencia entre cepas de *S. Enteritidis* y en el caso de hambruna, se evidenció que la diversidad también se asocia al hospedero de origen, lo que sugiere procesos de adaptación de la bacteria a condiciones específicas frente a la falta de nutrientes en cada uno de ellos o en el ambiente en que viven.

Palabras clave: *S. Enteritidis*, diversidad fenotípica, virulencia.

ABSTRACT.

In Chile and the world, the increasing prevalence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis within foodborne diseases (FBD), has generated considerable health and economic concern. The main source of infection for humans is consumption of poultry products, although it has been suggested the role of wild birds in the direct transmission of the agent, to individuals and commercial birds. The aim of this study was to determine the diversity of *in vitro* virulence phenotypes of *S. Enteritidis* strains isolated from commercial poultry, waterfowl and humans in Chile and the host-association of them. The phenotypes tested were survival to acidic conditions (pH3), oxidative stress ($H_2O_2/NaNO_2$) and starvation. Under acidic stress, significant differences ($p \leq 0.05$) between strains at 30min were observed. In oxidative stress ($H_2O_2/NaNO_2$) differences ($p \leq 0.05$) between strains at 30min and 3h were determined respectively. Finally under starvation, differences ($p \leq$

0.05) between strains and between hosts at all measures (days 10, 20, 30 and 40) were observed. In conclusion, the virulence phenotypes tested are diverse among *S. Enteritidis* strains. In the case of starvation, it became clear that diversity is also associated with the source host, suggesting adaptation processes of bacteria to specific conditions of nutrients absence in each or the environment in which the hosts are living.

Keywords: *S. Enteritidis*, phenotypic diversity, virulence.

INTRODUCCIÓN.

La bacteria.

Salmonella spp. es un género de bacterias Gram negativas, generalmente móviles y anaerobias facultativas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, dentro de la cual se distinguen dos especies, *S. bongori* y *S. enterica* (Health Protection Agency, 2007). Dentro de *S. enterica*, se sabe que hay más de 2.500 serovares diferentes (López-Martín *et al.*, 2011) agrupados en seis subespecies (Health Protection Agency, 2007). En relación a la subespecie *enterica*, ésta alberga alrededor de 1.500 serovares infectantes, que producen diferentes síndromes según especificidad de hospedero y distribución geográfica (Levantesi *et al.*, 2012), causando gran preocupación en salud humana y producción animal.

La transmisión entre hospederos es vía fecal-oral, para lo cual esta bacteria debe superar la barrera ácida estomacal y el ambiente hiperosmolar del intestino delgado y así poder inducir su internalización en las células epiteliales del íleon (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011). En la submucosa intestinal, es fagocitada por células dendríticas y macrófagos que la transportan al tejido linfoide subyacente y linfonodos mesentéricos. Se describe que los macrófagos son las células blanco de la infección, puesto que la bacteria una vez internalizada en ellos, reside en un compartimento ácido atípico llamado Vacuola Contenedora de *Salmonella* (VCS) que le permite evadir la actividad lítica lisosomal y así sobrevivir para diseminar la infección en el tejido intestinal, o en el organismo del hospedero (Cossart y Sansonetti, 2004).

La habilidad de *Salmonella spp.* para sobrevivir en el hospedero, sugiere la existencia de funciones patogénicas codificadas en su genoma, que aumentan la resistencia en ambientes estresantes y/o modifican las respuestas del hospedero. Los segmentos del cromosoma que agrupan genes que codifican factores específicos de virulencia, se denominan islas de patogenicidad (Figuroa y Verdugo, 2005) y están involucrados en procesos como por ejemplo, la invasión y supervivencia intracelular (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011).

Epidemiología.

Registros epidemiológicos a nivel mundial, desde hace un tiempo vienen atribuyendo a *S. enterica*, particularmente a su serovar Enteritidis, la responsabilidad causal en las enfermedades transmitidas por los alimentos (López-Martín *et al.*, 2011; Sánchez-Vargas *et al.*, 2011). Mediante tipificación fágica, la concordancia epidemiológica existente entre fagotipos involucrados en brotes por enfermedad alimentaria en seres humanos y aislados en muestras avícolas avala lo anterior (Prat *et al.*, 2001). Las causas que originan la emergencia de *S. Enteritidis* no están claras (Prat *et al.*, 2001; Yim *et al.*, 2010). Sin embargo, el abastecimiento de agua potable que en países industrializados desplazó la prevalencia de otras *Salmonellas*, el uso de antibióticos, la distribución de productos de consumo (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011), las nuevas prácticas agrícolas, la evolución de virulencia (Yim *et al.*, 2010) y la heterogeneidad de reservorios (Gopinath *et al.*, 2012) entre otros sucesos, podrían explicar lo ocurrido. En el caso de Chile al menos, se postula que la condición de endemia (Prat *et al.*, 2001; Sturm *et al.*, 2011) en que se encuentra *S. Enteritidis*, podría estar relacionada con la contaminación de establecimientos avícolas por cepas naturales nacionales (Prat *et al.*, 2001).

Prat *et al.* (2001), describe que una fuente de infección importante de *S. Enteritidis* para seres humanos son los productos avícolas, principalmente el huevo. Esta bacteria en forma asintomática infecta el tracto gastrointestinal y reproductivo de las aves, del tal forma que contamina el huevo pudiendo persistir en el ambiente hostil de la albúmina (Yim *et al.*, 2010), o en su defecto puede infectar al pollito, de manera que puede provocar transmisión vertical permanente o intermitente (Gopinath *et al.*, 2012). Así en el hospedero humano, esta bacteria ingresa vía oral y coloniza el intestino delgado causando cuadros de gastroenteritis autolimitante, (Monack, 2012) o en casos más graves, enfermedades sistémicas como osteomielitis, neumonía y meningitis (Levantesi *et al.*, 2012; Monack, 2012).

No sólo las aves de corral son reservorios de *S. Enteritidis*. Al ser una bacteria ubicua (Levantesi *et al.*, 2012) y hospedero inespecífica (Gopinath *et al.*, 2012), puede infectar otros animales incluyendo al ser humano (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011), por lo que los productos de consumo no animal, el medio ambiente contaminado (Levantesi *et al.*, 2012) y el contacto con otros animales reservorio (Hoelzer *et al.*, 2011), pueden estar implicados en la transmisión de esta zoonosis. Si bien el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) incluye la infección de *S. enterica* dentro de la lista de enfermedades notificables, su vigilancia en

vida silvestre no se realiza (Sturm *et al.*, 2011). En este sentido, Dhama *et al.* (2008) confirman la participación de aves migratorias en la diseminación de *Salmonella spp.* en seres humanos y animales. López-Martín *et al.* (2011), evidencian la creciente preocupación en salud pública por las aves migratorias, principalmente gaviotas, como diseminadores de *S. Enteritidis* en seres humanos, ya que se observó brotes de enfermedad debido al consumo de agua contaminada por estas aves.

Diversidad fenotípica asociada a virulencia.

La adaptación de *Salmonella spp.* en ambientes bióticos y abióticos (Sánchez-Vargas *et al.*, 2011) y la resistencia creciente a los antimicrobianos (Levantesi *et al.*, 2012), demuestran la evolución de virulencia que ha tenido este microorganismo en el tiempo. Se describe que la variabilidad genética en las islas de patogenicidad influyen en gran parte en este proceso adaptativo, en la diversidad de hospederos y síntomas clínicos observados en las infecciones causadas por *S. enterica* (Schmidt y Hensel, 2004). Además, el estudio de Yim *et al.* (2010), concluye que existe diversidad de fenotipos de virulencia entre cepas de *S. Enteritidis* humanas y no humanas, a pesar de la homogeneidad genética de las mismas. Sin embargo, no se detectaron diferencias asociadas al origen de los aislados.

Factores Estresantes.

Como determinantes de virulencia en *Salmonella spp.*, se han descrito las condiciones de supervivencia a acidez, estrés oxidativo y hambruna, ya que representan parte de los desafíos que esta bacteria enfrenta en su ciclo de vida, que por cierto los ha sabido evadir con el tiempo, otorgándole potencial patogénico (Spector y Cubitt, 1992). Durante la infección vía oral, *Salmonella spp.* debe pasar por el pH estomacal del hospedero, que puede caer en ayuno a un valor de pH2 antes de ingresar al intestino, así como también debe soportar la acidificación del fagolisosoma para mantenerse en el ambiente intracelular. En respuesta a este estrés, la bacteria ha evolucionado para tolerar exposiciones normalmente letales (pH2.5-3.0) mediante dos mecanismos; respuesta de tolerancia al ácido y de resistencia al ácido (Spector y Kenyon, 2012).

Por otra parte, durante el metabolismo aeróbico o la fagocitosis en la respuesta inmune, se originan especies bactericidas reactivas del oxígeno, para las cuales *Salmonella spp.* expresa dos mecanismos de respuesta; el regulador OxyR que responde en presencia de H₂O₂ y SoxRS que interviene en el estado redox celular. En el ambiente intracelular de los macrófagos, se generan además especies bactericidas reactivas del nitrógeno. Para

ambos tipos de estrés en *S. enterica*, se describe la participación de los productos codificados en la isla de patogenicidad SPI2, entre otros mecanismos de protección (Spector y Kenyon, 2012).

Finalmente, es común para *Salmonella spp.* durante su ciclo de vida que tenga que enfrentar la falta de nutrientes como carbono, fosfato y/o nitrógeno. Para ello, la bacteria desarrolla una respuesta fisiológica análoga a la esporulación, reprogramando globalmente el metabolismo celular. Esta es la respuesta al estrés por hambruna (*Starvation-Stress Response; SSR*), desencadenada para hacer eficiente la utilización de fuentes nutritivas alternativas, principalmente de carbono (Spector y Kenyon, 2012).

Cabe mencionar que todas estas respuestas adaptativas están controladas por un conjunto de proteínas/sistemas, que inducen o inhiben la expresión de genes asociados a patogenicidad (Spector y Kenyon, 2012).

La hipótesis de este trabajo plantea que hay fenotipos de virulencia asociados a hospedero en cepas de *S. Enteritidis* aisladas en Chile, desde aves de corral, aves acuáticas y seres humanos. Para ello, el principal objetivo fue determinar la diversidad fenotípica asociada a virulencia de *S. Enteritidis*, aislada desde estos hospederos y su asociación con ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Bioseguridad.

S. enterica está clasificada como agente de riesgo intermedio de acuerdo al Manual de Normas de Bioseguridad (2008) editado por CONICYT, por lo que las medidas de contención que se utilizaron corresponden al nivel 2.

Cepas.

Para determinar la capacidad de supervivencia de *S. Enteritidis* frente a los ensayos de pH ácido y radicales libres, se utilizó un total de 90 cepas disponibles en el cepario de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, distribuidas equitativamente según hospedero de origen. De las mismas, para realizar el ensayo de hambruna, se seleccionó 48 cepas distribuidas de igual forma, debido a que esta prueba es de larga duración. Como control en cada

ensayo, se sumó la cepa de colección *S. Enteritidis* SARB-16 (Boyd *et al.*, 1993) (Tabla 1).

Cultivo.

Las cepas fueron crecidas desde su condición de almacenamiento (Microbank®) mediante incubación en 2mL de caldo Luria-Bertani (LB: triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, cloruro de sodio 0,5% y agua destilada c.s.p.) estéril pH7 (NaHPO₄/NaH₂PO₄ 25mM) a 37°C en agitación durante 18h. El sembrado en superficie de éstas se realizó en placas con Agar Luria-Bertani (ALB: medio LB más agar 1,5%), que se incubaron por 24h y luego refrigeraron a 4°C hasta su utilización.

Previo a los ensayos fenotípicos, se resuspendió desde cada placa refrigerada una colonia bacteriana en 2mL de caldo LB estéril pH7, para ser incubada a 37°C en agitación durante 18 a 24h.

Ensayos fenotípicos *in vitro*.

Supervivencia en pH ácido: este ensayo se realizó de acuerdo al protocolo de Lu *et al.* (1999), con algunas modificaciones: Previamente incubadas las bacterias por 18 a 24h, se resuspendieron en una dilución 1:100 en caldo LB pH7 e inmediatamente se sembraron en placas de ALB, para luego ser incubadas a 37°C durante 18 a 24h y obtener como control el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en el tiempo 0. Después se realizó el mismo procedimiento pero se utilizó caldo LB pH3 (C₆H₅O₇Na₃/ C₆H₈O₇ 0,1M) y las bacterias fueron incubadas en agitación por 30min a 37°C sembrándose en placas de ALB, incubadas a 37°C durante 18 a 24h. De esta forma, la supervivencia se evaluó realizando el recuento de UFC en triplicado, a los tiempos 0min en pH7 y 30min en pH3. Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje respecto del recuento en el tiempo 0, considerado como el 100%.

Supervivencia bajo estrés por radicales libres: los ensayos se realizaron de forma similar al anterior, de acuerdo al protocolo de Lu *et al.* (2002), con algunas modificaciones: Para la prueba de H₂O₂ se cambió la molaridad de éste a 15mM y la incubación de *S. Enteritidis* durante 30min a 37°C con agitación. Por su parte, para la prueba de NaNO₂, se utilizó una molaridad de 10mM y el tiempo de incubación fue de 3h a 37°C con agitación. Así, el recuento de UFC se obtuvo para los tiempos 0-30min y 0-3h en cada prueba, respectivamente, siendo el tiempo de recuento 0 el control de estos ensayos y los datos

obtenidos se expresaron como porcentaje respecto de este último recuento, considerado como el 100%.

Supervivencia en hambruna: se utilizó el protocolo experimental de Spector y Cubitt (1992) con algunas modificaciones. Así, al día siguiente de crecer las cepas desde medio líquido MS hiPCN, para el lavado y centrifugación de ellas se utilizó agua destilada estéril y el recuento de supervivencia bacteriana, se midió en placas de ALB de para los 5 primeros días de incubación en hambruna y luego para los días 10,20,30 y 40 de hambruna.

Cabe destacar que la condición de hambruna para *S. Enteritidis* realizada *in vitro*, consiste en dejar las cepas durante 40 días totales en incubación bajo agitación por 37°C, en tubos con medio líquido denominado MS loPCN y en los días descritos anteriormente, hacer los recuentos respectivos en placas, que una vez sembradas se dejan incubar a 37°C por 24h.

Análisis estadístico.

Se consideró la comparación de los resultados obtenidos en cada prueba fenotípica a dos niveles: entre cepas y entre hospederos. Para el primer nivel de análisis, se calcularon los promedios de cada porcentaje de supervivencia en triplicado por cepa y para el segundo nivel, se obtuvo el valor promedio de supervivencia de todas las cepas aisladas desde cada hospedero. Las diferencias fueron determinadas con un error alfa de 5% ($p \leq 0.05$) y se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA). La identificación de las diferencias encontradas se realizó mediante el estadístico de Kruskal Wallis.

Para visualizar gráficamente la asociación entre las variables hospedero y supervivencia a las pruebas fenotípicas, se realizó un análisis de componentes principales. Además, se determinó mediante la correlación de Spearman (Di Rienzo *et al.*, 2008), la relación entre los resultados de las pruebas fenotípicas, que a su vez se interpretaron según las reglas de Colton (Dawson-Saunders y Trapp, 1997).

Este trabajo estadístico fue realizado con el software InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2008).

RESULTADOS.

El análisis entre cepas para todos los ensayos fenotípicos arrojó diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Ensayo de supervivencia en pH ácido (pH3).

En los resultados obtenidos al agrupar los datos de supervivencia por hospedero, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figura 1).

Ensayo de supervivencia a estrés por radicales libres (H_2O_2 y $NaNO_2$).

En el ensayo de H_2O_2 no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de sobrevivencia de las cepas según su procedencia (Figura 2), no obstante, en el ensayo con $NaNO_2$ sí las hubo ($p \leq 0,05$), determinándose que las cepas provenientes de aves comerciales sobreviven más que las de aves acuáticas y humanos (Figura 3).

Ensayo de supervivencia en días 10, 20, 30 y 40 de hambruna.

Según los datos porcentuales de sobrevivencia obtenidos, al ser agrupados por hospedero, sí fue posible observar diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre éstos, a nivel de las cuatro mediciones estipuladas para el ensayo: recuento en el día 10, día 20, día 30 y día 40. En el día 10 hubo mayor supervivencia de cepas humanas, en el día 20; de cepas de aves comerciales y humanos, y en los días 30 y 40 predominó la supervivencia de las cepas de aves comerciales (Figura 4).

Correlación y análisis de componentes principales.

Con el fin de identificar similitud de comportamiento entre cepas frente a los ensayos fenotípicos, se realizó una matriz de correlación entre éstos. De acuerdo con los valores obtenidos en la matriz (Tabla 2), se determinó que entre las pruebas de pH3 y H_2O_2 , entre las de H_2O_2 y hambruna (H) día 40 y entre las de $NaNO_2$ y H10, hubo moderada a buena correlación (valores dentro del rango sugerido para estas asociaciones; +- 0,50 a +- 0,75). Entre las pruebas de pH3 y H10, entre las de H_2O_2 con $NaNO_2$, H10, H20 y H30, entre las de $NaNO_2$ con H20, H30 y H40, entre las de H20 con H30 y H40 y entre las de H30 y H40, hubo correlación muy buena a excelente (valores dentro del rango sugerido para estas asociaciones; +- 0,75 o mayor) (Dawson-Saunders y Trapp, 1997). Por su parte, el análisis de componentes principales (Figura 5), permite visualizar gráficamente los resultados anteriores, además de reflejar la asociación entre las variables hospedero y supervivencia a pruebas fenotípicas.

DISCUSIÓN.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se confirma que existe diversidad fenotípica entre cepas de *S. Enteritidis*. Sin embargo, esta diversidad no se ve reflejada en los ensayos de pH3 y H₂O₂ (Figuras 1 y 2) al momento de agrupar los resultados por hospedero de origen de los aislados, coincidiendo con los resultados de Yim *et al.* (2010). Las razones de ello, pueden ser que el número de cepas testeadas no fue suficiente o que realmente la supervivencia a estos tipos de estrés es una característica necesaria, permanente y general para *S. Enteritidis*. Considerando el descubrimiento de sus mecanismos de adaptación en el tiempo (Spector y Kenyon, 2012), el sobrevivir a esas condiciones es trascendental para su transmisión (Cossart y Sansonetti, 2004; Sánchez-Vargas *et al.*, 2011).

A diferencia de los resultados anteriores, para el caso de supervivencia bajo NaNO₂ (Figura 3), sí se encontró diversidad según hospederos, siendo los mayores valores de sobrevivencia para el caso de las cepas provenientes de aves comerciales. Estos resultados pueden estar reflejando las múltiples respuestas adaptativas de *S. Enteritidis* frente a las condiciones ambientales dinámicas que demanda la industria avícola, o bien que la supervivencia al interior del macrófago de estas aves requiere una mayor demanda de funciones de resistencia al estrés inducido por radicales derivados del nitrógeno, en comparación con el ambiente intracelular de otros hospederos. Cabe destacar que esta información es un nuevo hallazgo, siendo la primera vez que se detectan diferencias fenotípicas relacionadas a la supervivencia bajo estrés por nitritos entre cepas de *S. Enteritidis* aisladas desde distintos hospederos.

Por su parte, las mediciones hechas en la prueba de hambruna también indican diferencias significativas en la capacidad de supervivencia al momento de agrupar las cepas por su hospedero de origen. La falta de estudios referentes a este tema impide generar comparaciones al respecto. No obstante, el análisis estadístico de la Figura 4 evidencia que durante los diez primeros días de hambruna las cepas de humanos sobrevivieron más y a medida que pasó el tiempo, la tendencia indicó mayor supervivencia por parte de las cepas de aves comerciales. En el caso de las aves acuáticas, la supervivencia en ningún tiempo supera la de los otros hospederos.

Los datos obtenidos en la prueba de hambruna pueden ser analizados considerándose diversas aristas, siempre teniendo en cuenta el factor común condicionante; el ambiente de cada hospedero. Así por ejemplo, desde el punto de vista del alto nivel de estrés en

aves comerciales, la alta densidad poblacional, el tipo de alimentación y el dinamismo propio de la industria avícola, se podría explicar la capacidad de adaptación en las cepas de *S. Enteritidis* y por lo tanto, la supervivencia bajo las condiciones evaluadas en este trabajo, así como en el caso de la supervivencia en la prueba de NaNO_2 .

Al observar las correlaciones entre pruebas fenotípicas (Figura 5), se puede inferir que *S. Enteritidis* se comporta de manera similar frente al ensayo de NaNO_2 y durante los días 20, 30 y 40 de hambruna, al igual que para las pruebas de hambruna en día 10 y H_2O_2 . Por su parte se podría pensar que en la prueba pH3, la respuesta adaptativa es distinta. Adicional a lo anterior, también es posible evidenciar que la supervivencia de las cepas provenientes de aves comerciales es mayor frente a las condiciones de hambruna, exceptuando la medición del día 10 (Figuras 4 y 5).

Finalmente cabe destacar, que es necesario reconocer que los resultados obtenidos en general, deben ser observados con cautela, ya que es necesario complementar esta información con estudios filogenéticos y de identificación y/o caracterización de genes de virulencia. Esto, debido a que se han observado diferencias genéticas asociadas al fenotipo de esta bacteria, que permiten agruparlas según su respuesta a diferentes tipos de estrés (Fernandez *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2009).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- **BOYD, E.; WANG, F.; BELTRAN, P.; PLOCK, S.; NELSON, K.; SELANDER, R.** 1993. *Salmonella* reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I. J Gen Microbiol. 139(6):1125-32.
- **CONICYT.** 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2ª ed. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 139 p.
- **COSSART, P.; SANSONETTI, P.** 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science. 304:242-8.
- **DAWSON-SAUNDERS, B.; TRAPP, R.** 1997. Estimación y comparación de medias. In: Bioestadística médica. 2ª ed. Manual Moderno. México D.F., México. 64 p.
- **DHAMA, K.; MAHENDRAN, M.; TOMAR, S.** 2008. Pathogens transmitted by migratory birds: threat perceptions to poultry health and production. Int J Poult Sci. 7(6):516-525.
- **DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W.** 2008. *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- **FERNANDEZ, J.; FICA, A.; EBENSPERGER, G.; CALFULLAN, H.; PRAT, S.; FERNANDEZ, A.; ALEXANDRE, M.; HEITMANN, I.** 2003. Analysis of Molecular Epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Bacteriophage Typing. J Clin Microbiol. 41(4):1617-1622.
- **FIGUEROA, I.; VERDUGO, A.** 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* Rev Latinoam Microbiol. 47(1-2):25-42.
- **GOPINATH, S.; CARDEN, S.; MONACK, D.** 2012. Shedding light on *Salmonella* carriers. Trends Microbiol. In press.
- **HEALTH PROTECTION AGENCY.** 2007. Identification of *Salmonella* species. National Standard Method BSOP ID 24 Issue 2.1. [en línea]. <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp> [consulta: 10-07-2012]

- **HOELZER, K.; MORENO, A.; WIEDMANN, M.** 2011. Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet Res.* 42:34.
- **LEVANTESI, C.; BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; GROHMANN, E.; TOZE, S.; TANDOI, V.** 2012. *Salmonella* in surface and drinking water: occurrence and water-mediated transmission. *Food Res Int.* 45:587-602.
- **LÓPEZ-MARTÍN, J.; JUNOD, T.; RIQUELME, F.; CONTRERAS, C.; GONZÁLEZ-ACUÑA.** 2011. Detección de especies de *Salmonella* y *Mycobacterium* en gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) y gaviotas de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) en la ciudad de Talcahuano, Chile. *Rev Med Chil.* 139:1496-1502.
- **LU, S.; MANGES, A.; XU, Y.; FANG, F.; RILEY, L.** 1999. Analysis of Virulence of Clinical Isolates of *Salmonella* Enteritidis In Vivo and In Vitro. *Infect Immun.* 67(11):5651-5657.
- **LU, S.; KILLORAN, P.; FANG, F.; RILEY, L.** 2002. The global regulator ArcA controls resistance to reactive nitrogen and oxygen intermediates in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun.* 70:451-61.
- **MONACK, D.** 2012. *Salmonella* persistence and transmission strategies. *Curr Opin Microbiol.* 15:100-107.
- **PAN, Z.; CARTER, B.; NUÑEZ-GARCÍA, J.; ABUNOUN, M.; FOOKES, M.; IVENS, A.; WOODWARD, M.; ANJUM, M.** 2009. Identification of genetic and phenotypic differences associated with prevalent and non-prevalent *Salmonella* Enteritidis phage types: analysis of variation in amino acid transport. *Microbiology.* 155:3200-3213.
- **PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A.; FERNÁNDEZ, J.; ALEXANDRE, M.; HEITMANN, I.** 2001. Phage typing of *Salmonella* enteritidis isolated from clinical, food, and poultry samples in Chile. *Rev Panam Salud Pública.* 9:7-12.
- **SÁNCHEZ-VARGAS, F.; ABU-EL-HAIJA, M.; GÓMEZ-DUARTE, O.** 2011. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis.* 9:263-277.
- **SCHMIDT, H.; HENSEL, M.** 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 17.

- **SPECTOR, M.; CUBITT, C.** 1992. Starvation-inducible loci of *Salmonella* Typhimurium: regulation and roles in starvation-survival. *Mol Microbiol.* 6:1467-76.

- **SPECTOR, M.; KENYON, W.** 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res Int.* 45(2):455-481.

- **STURM, N.; ABALOS, P.; FERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ, G.; OVIEDO, P.; ARROYO, V.; RETAMAL, P.** 2011. *Salmonella enterica* in pinnipeds, Chile. *Emerg Infect Dis.* 17:2377-2378.

- **YIM, L.; BETANCOR, L.; MARTÍNEZ, A.; GIOSSA, G.; BRYANT, C.; MASKELL, D.; CHABALGOITY, J.** 2010. Differential phenotypic diversity among epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from humans or animals. *Appl Environ Microbiol.* 76(20):6812-20.

FIGURAS.

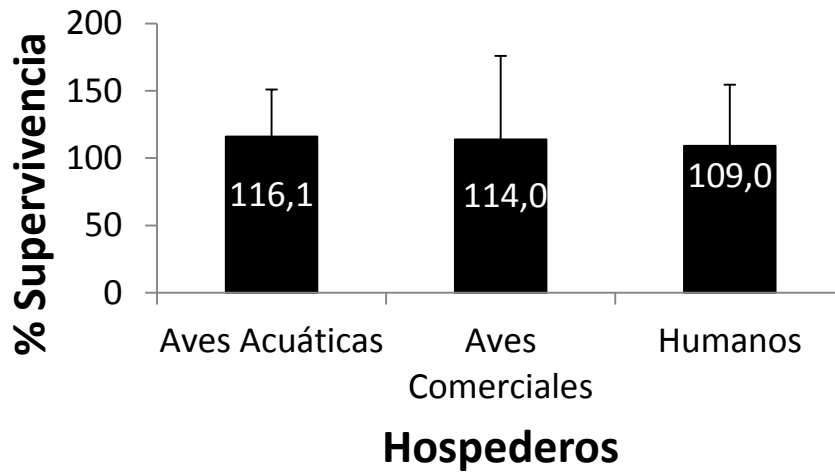


Figura 1: porcentajes de supervivencia en pH3 agrupados por hospedero. No hubo diferencias significativas ($p>0,05$).

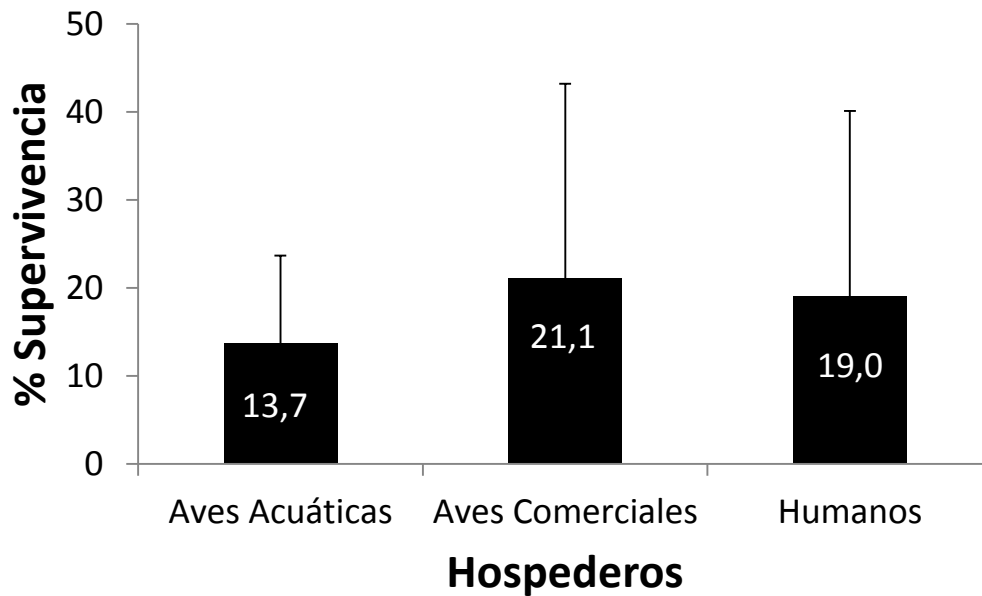


Figura 2: porcentajes de supervivencia en H₂O₂ 15mM agrupados por hospedero. No hubo diferencias significativas ($p>0,05$).

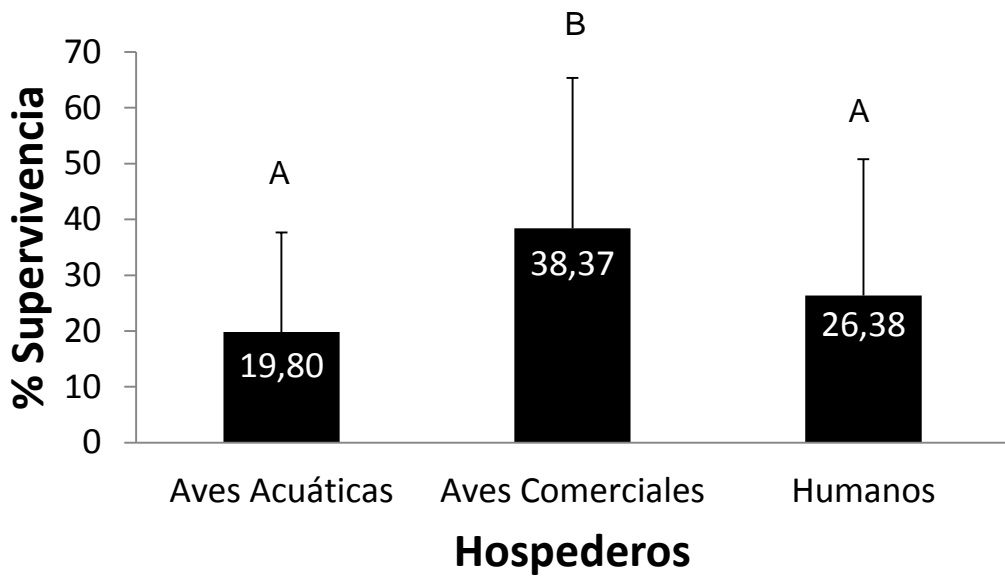


Figura 3: porcentajes de supervivencia en NaNO₂ 10mM agrupados por hospedero. Letras distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0.05).

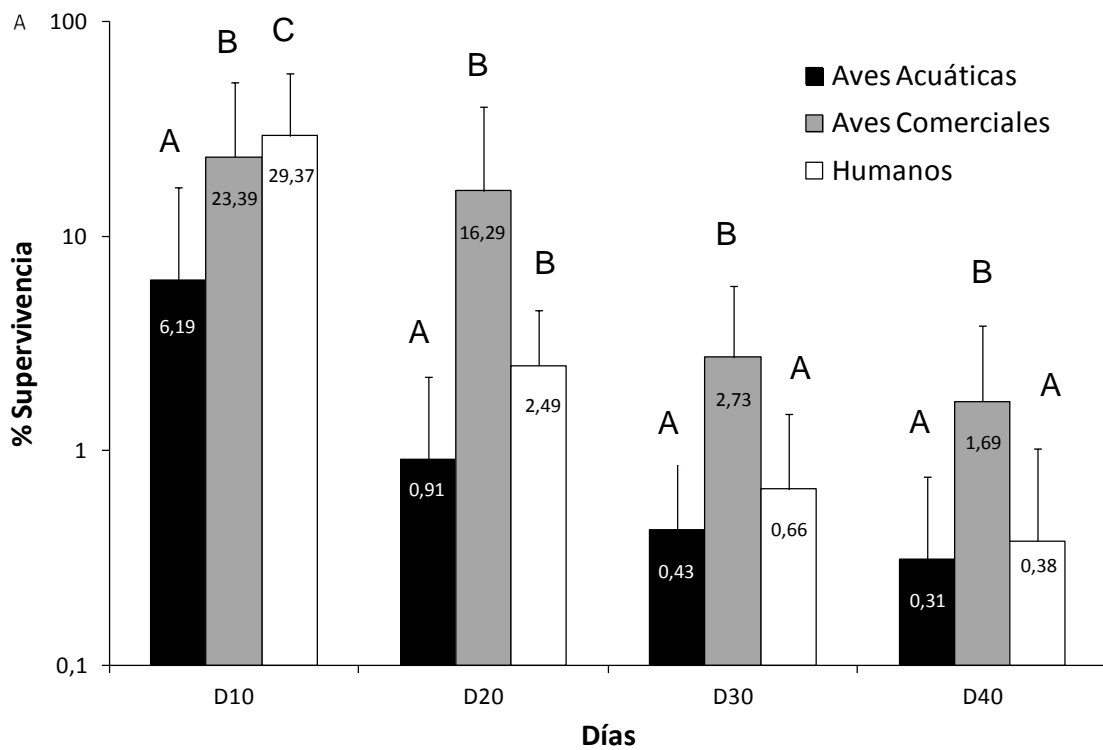


Figura 4: porcentajes de supervivencia en hambruna agrupados por hospedero. Días (D) 10, 20, 30 y 40. Letras distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0.05).

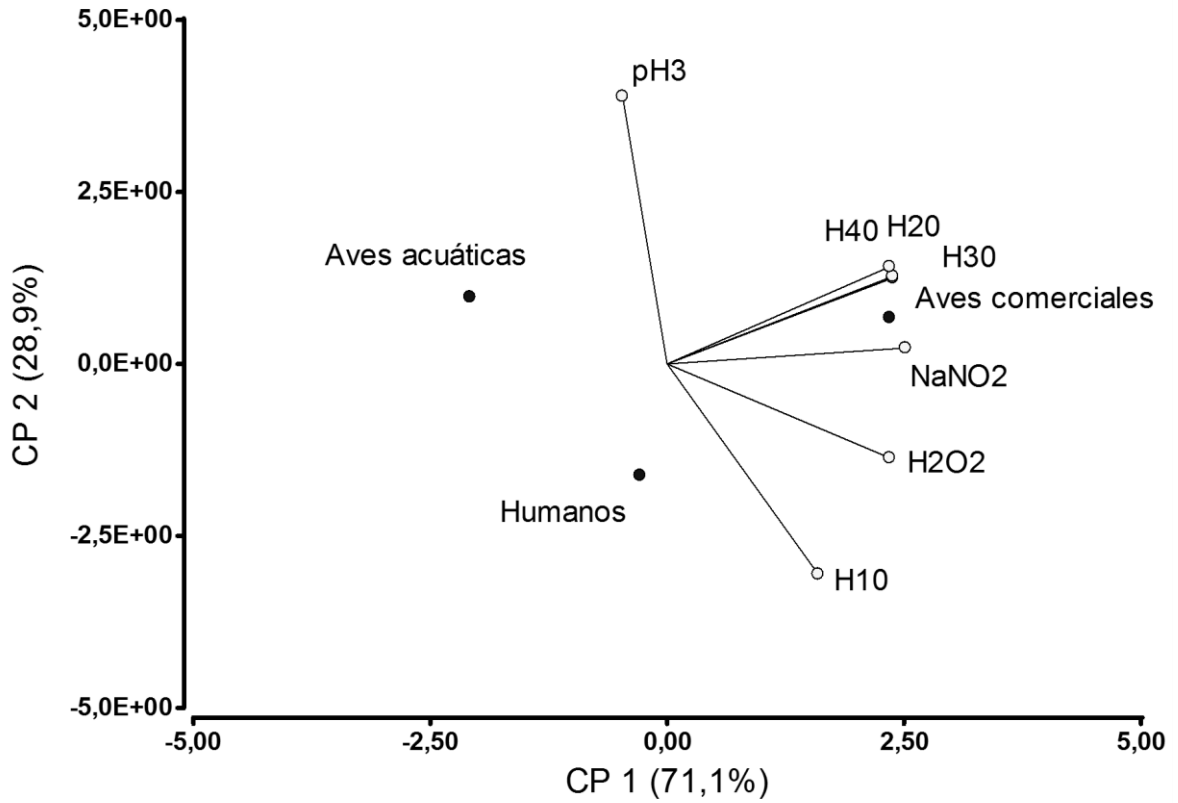


Figura 5: análisis de componentes principales. Asociación entre pruebas fenotípicas y entre hospederos y supervivencia a pruebas fenotípicas. Prueba de acidez (pH3), de radicales libres (NaNO₂ y H₂O₂) y de Hambruna (H) para los días 10, 20, 30 y 40.

TABLAS.

Tabla 1: identificación de cepas (ID) y promedios de porcentaje de supervivencia (% Sup.).

Cepas	ID		Promedios % Sup.					
	Especie origen	pH3	H ₂ O ₂	NaNO ₂	H10	H20	H30	H40
SEN15	Aves acuáticas	168,62	28,33	18,25	1,09	0,06	0,22	1,09
SEN16	Aves acuáticas	38,09	23,56	25,6	0,8	0,1	0,15	0,11
SEN17	Aves acuáticas	112,72	9,09	31,63	1,29	0,06	0,19	0,26
SEN18	Aves acuáticas	90,16	9,64	20,63	0,68	0,02	0,17	0,1
SEN19	Aves acuáticas	140	16,96	22,95	1	0,05	0,21	0,42
SEN20	Aves acuáticas	105,35	19,62	27,03	10,13	0,11	0,14	0,11
SEN95	Aves acuáticas	98,68	29,26	7,11	1,31	0,06	0,52	0,12
SEN96	Aves acuáticas	151,85	4,43	5,46	1,33	0,05	0,12	0,12
SEN97	Aves acuáticas	152,94	9,79	15,78	6,22	2,91	1,27	0,55
SEN98	Aves acuáticas	90,9	11,38	39,08	6,52	2,12	0,52	0,2
SEN99	Aves acuáticas	27,33	1,08	16,3	10,7	1,27	0,61	0,27
SEN100	Aves acuáticas	75,94	43,66	76,19	7,54	2,32	0,55	0,21
SEN101	Aves acuáticas	89,13	8,77	17,44	30,05	2,33	0,76	0,49
SEN102	Aves acuáticas	118,75	9,86	66,66	5,8	0,96	0,39	0,12
SEN103	Aves acuáticas	165,3	4,72	11,02	7,12	0,96	0,54	0,27
SEN104	Aves acuáticas	102,12	4,41	40,93	7,35	1,09	0,48	0,42
SEN105	Aves acuáticas	140,67	8,79	15,09	-	-	-	-
SEN106	Aves acuáticas	109,21	7,21	18,66	-	-	-	-
SEN107	Aves acuáticas	102,35	7,12	15,71	-	-	-	-
SEN108	Aves acuáticas	125,39	12,05	0,69	-	-	-	-
SEN109	Aves acuáticas	164	18	10,75	-	-	-	-
SEN110	Aves acuáticas	127,58	10,96	3,7	-	-	-	-
SEN111	Aves acuáticas	153,19	10,15	4,57	-	-	-	-
SEN112	Aves acuáticas	88,37	8,33	10,14	-	-	-	-
SEN113	Aves acuáticas	138,7	25,71	12,58	-	-	-	-
SEN114	Aves acuáticas	164,15	34,69	5,56	-	-	-	-
SEN115	Aves acuáticas	113,69	10,41	38,57	-	-	-	-
SEN116	Aves acuáticas	107,59	9,27	2,5	-	-	-	-
SEN117	Aves acuáticas	102,35	6,9	8,33	-	-	-	-
SEN118	Aves acuáticas	117,1	6,75	4,86	-	-	-	-
SEN1	Aves comerciales	60,75	40,62	60,39	0,97	0,28	0,3	0,07
SEN2	Aves comerciales	108,33	16,66	50,55	2,92	0,75	0,51	0,3
SEN3	Aves comerciales	113,46	12,15	65,48	1,08	0,26	0,81	0,03
SEN4	Aves comerciales	35,36	10	67,92	2,63	0,14	0,11	0,03
SEN5	Aves comerciales	23,45	10,83	17,66	9,82	9,36	7,99	0,79

SEN6	Aves comerciales	105,66	61	70,45	6,64	4,89	3,05	1,54
SEN7	Aves comerciales	100	62,26	50,38	7,46	4,5	6,22	2,77
SEN8	Aves comerciales	4,53	31,35	72,44	0,94	0,66	3,2	4,46
SEN9	Aves comerciales	126,92	36,95	80,18	-	-	-	-
SEN10	Aves comerciales	134,61	5,71	23,53	-	-	-	-
SEN11	Aves comerciales	135,61	15,18	27,45	-	-	-	-
SEN12	Aves comerciales	101,2	7,98	31,34	-	-	-	-
SEN13	Aves comerciales	0,17	22,75	28,51	-	-	-	-
SEN14	Aves comerciales	1,6	21,76	32,5	-	-	-	-
SEN31	Aves comerciales	95,55	0,41	79,51	-	-	-	-
SEN32	Aves comerciales	96,62	0,55	53,16	-	-	-	-
SEN46	Aves comerciales	103,94	83,92	51,76	-	-	-	-
SEN47	Aves comerciales	202,08	3,58	89,04	-	-	-	-
SEN80	Aves comerciales	114,1	8	14,64	-	-	-	-
SEN81	Aves comerciales	133,89	70,76	43,39	-	-	-	-
SEN82	Aves comerciales	94,02	30,88	62,74	-	-	-	-
SEN83	Aves comerciales	150	10,39	9,23	-	-	-	-
SEN85	Aves comerciales	128,88	16,84	9,04	12,33	9,05	0,85	0,9
SEN86	Aves comerciales	189,09	1,26	5,3	8,78	4,88	0,61	0,72
SEN87	Aves comerciales	127,27	2,74	8,77	41,96	4,55	2,06	0,99
SEN88	Aves comerciales	260	12,38	8,92	38,57	28,61	3,99	3,39
SEN89	Aves comerciales	181,81	10,17	10,68	48,38	48,01	4,44	2,97
SEN90	Aves comerciales	131,57	8,49	9,25	42,81	23,08	0,42	0,25
SEN91	Aves comerciales	138	6,79	10,43	67,02	56,7	4,56	3,91
SEN92	Aves comerciales	220,83	10,31	6,42	81,79	64,79	4,54	3,8
SEN21	Humanos	71,79	22,9	20,97	-	-	-	-
SEN22	Humanos	84,61	10,83	27,32	7,94	0,89	0,46	0,13
SEN23	Humanos	97,87	20,5	21,8	-	-	-	-
SEN24	Humanos	59	5,67	18,25	-	-	-	-
SEN25	Humanos	14,28	12,88	47,36	10,89	1,7	1,04	0,66
SEN26	Humanos	60,15	6,76	51,51	-	-	-	-
SEN27	Humanos	107,86	4,84	11,93	10,1	3,57	2,26	1,53
SEN28	Humanos	112,5	3,6	17,82	-	-	-	-
SEN29	Humanos	1,61	10,21	22,57	-	-	-	-
SEN30	Humanos	65,55	12,38	24,75	-	-	-	-
SEN48	Humanos	97,75	0,27	0,01	-	-	-	-
SEN49	Humanos	149,12	5,42	1,12	7,15	0,89	0,35	0,18
SEN50	Humanos	171,42	7,46	9,84	9,37	0,99	0,63	0,35
SEN51	Humanos	108	8,27	10,81	17,56	3,84	1,47	1,04
SEN52	Humanos	170,58	5,86	23,75	12,02	0,98	0,45	0,16
SEN53	Humanos	193,33	80,85	56,75	13,35	0,98	0,6	0,09
SEN54	Humanos	94,38	9,37	67,44	-	-	-	-
SEN55	Humanos	102,27	30,76	13,63	-	-	-	-

SEN56	Humanos	164,15	56,75	40,29	-	-	-	-
SEN57	Humanos	101,16	32,53	84,21	-	-	-	-
SEN58	Humanos	97,7	23,45	59,67	-	-	-	-
SEN59	Humanos	131,66	29,26	39,65	-	-	-	-
SEN72	Humanos	135,89	7,14	11	37,4	1,81	0,15	0,09
SEN73	Humanos	116,66	86,56	12,5	46,07	1,8	0,24	0,12
SEN74	Humanos	87,27	16,38	1,85	58,84	2,51	0,24	0,18
SEN75	Humanos	130,43	12,98	11,16	55,33	3,41	0,17	0,38
SEN76	Humanos	136,2	2,91	3,53	83,09	3,49	0,64	0,13
SEN77	Humanos	200	7,79	7,38	63,98	2,62	0,37	0,16
SEN78	Humanos	136,66	3,82	4,56	32,56	4,26	1,03	0,84
SEN79	Humanos	82,85	33,69	5,18	24,6	3,2	0,37	0,09
SARB16	Humanos	96,47	17,39	88,88	8,95	5,38	0,65	0,27

H: hambruna.

Tabla 2: matriz de correlación entre pruebas fenotípicas.

Matriz de correlación/Coeficientes							
	pH3	H ₂ O ₂	NaNO ₂	H10	H20	H30	H40
pH3	1						
H ₂ O ₂	-0,52	1					
NaNO ₂	-0,13	0,92	1				
H10	-0,88	0,86	0,59	1			
H20	0,14	0,78	0,97	0,36	1		
H30	0,14	0,78	0,96	0,35	1	1	
H40	0,18	0,75	0,95	0,31	1	1	1

H: hambruna.