



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

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS  
FORMADAS POR CEPAS DE *Salmonella enterica* AISLADAS DESDE  
DISTINTOS HOSPEDEROS EN CHILE.**

**CATALINA ELIZABETH PEÑA PASCUAL**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL MERINO  
Fondo de Apoyo a la Investigación Universidad Autónoma 2013

SANTIAGO, CHILE  
2014



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

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS  
FORMADAS POR CEPAS DE *Salmonella enterica* AISLADAS DESDE  
DISTINTOS HOSPEDEROS EN CHILE.**

**CATALINA ELIZABETH PEÑA PASCUAL**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL MERINO  
Fondo de Apoyo a la Investigación Universidad Autónoma 2013

SANTIAGO, CHILE  
2014

Nota Final.....

Prof. Guía: Patricio Retamal Merino .....

Profesor Corrector: Pilar Oviedo Hannig .....

Profesor Corrector: Lisette Lapierre .....

## INDICE DE CAPITULOS

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
Epidemiología.....	2
Formación de biopelículas.....	5
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Cepas bacterianas.....	8
Cuantificación de biopelículas.....	8
Determinar la asociación existente entre la formación de biopelículas, los serotipos y el hospedero de origen en cepas de <i>S. enterica</i> . ....	9
Determinar la correlación existente entre la formación de biopelículas y la supervivencia a condiciones de estrés en cepas de <i>S. enterica</i> Ser. Enteritidis.....	10
Determinar el tipo de sustancia polimérica extracelular constituyente de biopelículas formadas por cepas de <i>S. enterica</i> .....	10
Normas de bioseguridad.....	11
RESULTADOS.....	12
Detección y cuantificación de la formación de biopelícula en cepas de <i>S. enterica</i> . ....	12
Determinar la asociación existente entre la formación de biopelículas, el hospedero de origen y el serotipo en cepas de <i>S. enterica</i> . ....	14
Determinar la correlación existente entre la formación de biopelículas y la supervivencia a condiciones de estrés en cepas de <i>S. enterica</i> Ser. Enteritidis. ....	16
Determinar el tipo de sustancia polimérica extracelular constituyente de biopelículas formadas por cepas de <i>S. enterica</i> . ....	17

DISCUSIÓN.....	21
Formación de biopelículas.....	21
Matriz extracelular de las biopelículas .....	23
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFIA .....	29
ANEXOS .....	32

## INDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1: Morfotipos .....	4
Tabla Nro. 2: Cepas utilizadas .....	8
Tabla Nro. 3: Clasificación de los aislados de <i>S. enterica</i> de acuerdo a su habilidad de producción de biopelículas a 28°C y 37°C. ....	12
Tabla Nro. 4: Morfotipos expresados por los ochenta serotipos de <i>Salmonella</i> en agar LB con Rojo Congo y Azul de Comassie incubados a 28°C por dos días.....	18
Tabla Nro. 5: Fluorescencia expresada por las cepas sembradas en agar LB incubadas a 28°C por 4 días en relación al morfotipo. ....	19
Tabla Nro. 6: Fluorescencia expresada por las cepas sembradas en agar LB incubadas a 37°C por 2 días en relación al morfotipo. ....	20

## INDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1: Formación de biopelículas (OD <sub>550</sub> ) según el serotipo de <i>Salmonella</i> a 28°C (a) y 37°C (b) y según el hospedero de origen a 28°C (c) y 37°C (d). .....	14
Figura Nro. 2: Morfotipos expresados en agar LB sin NaCl con rojo congo y azul de comassie. (a) Rojo, seco y rugoso; (b) Café, seco y rugoso y (c) Rosado, seco y rugoso. ....	17
Figura Nro. 3: Fluorescencias encontradas en placas de LB sin sal con tinción de calcofluor. (a) Fluorescencia en toda la colonia (b) Fluorescencia en el centro de la colonia y (c) Negativo a fluorescencia. ....	19

## RESUMEN

*Salmonella spp.* es el agente etiológico de la salmonelosis, enfermedad entérica transmitida principalmente por los alimentos. Este patógeno está ampliamente difundido en el medio ambiente y anualmente infecta a millones de animales y personas en todo el mundo.

*Salmonella* es capaz de establecerse en un estado de biopelícula, el que se caracteriza por ser una comunidad de células de una o varias especies protegidas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) autogeneradas y fijadas a una superficie inerte o un tejido vivo. Las biopelículas son de gran importancia pues permiten la persistencia de los patógenos tanto dentro del hospedero como en el medio ambiente.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la formación de biopelículas de los diferentes serotipos de *S. enterica* aisladas de distintos hospederos en Chile. Se cuantificó la formación de biopelículas por medio del método colorimétrico de titulación en placa y a través del coeficiente de correlación de Pearson's se estableció si las características de expresión fenotípica de las biopelículas tenían relación con la capacidad de supervivencia a condiciones de estrés, de las cepas en estado planctónico.

Como resultado no se encontró una asociación significativa entre hospedero, serotipos y formación de biopelícula. Las propiedades de supervivencia a condiciones de estrés de las cepas de *S. enterica* ser. Enteritidis en estado de vida libre fueron independientes de la formación de biopelículas.

Junto a esto, se estudió el fenotipo expresados por las cepas en placas de agar. Para observar la producción de fimbrias curli y celulosa se usaron placas de agar con tinción de Rojo Congo y Azul de Comassie, mientras que para determinar la expresión de ácido colánico se utilizaron placas de agar con tinción de Calcofluor.

Este análisis evidencio que el morfotipo BDAR (café, seco y rugoso) que expresa fimbrias curli pero no celulosa es ampliamente expresado por los serotipos *S. Agona* (83%), *S. Havana* (60%), *S. Infantis* (57%) y *S. Heidelberg* (83%). Esto podría indicar que este morfotipo, relativamente poco estudiado, puede estar siendo expresado ampliamente por las cepas de *Salmonella* no Enteritidis en el medio ambiente.

Mientras que los serotipos *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Enteritidis*, *S. Havana*, *S. Heidelberg* y *S. Infantis* resultaron positivos a ácido colánico. Lo que les otorgaría a estas cepas una mayor capacidad para formar biopelículas sobre células epiteliales.

Palabras claves: *Salmonella*, Serotipo, Biopelícula, Morfotipo, Sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

## **ABSTRACT**

*Salmonella* spp. is the etiologic agent of salmonellosis, an enteric disease primarily transmitted by food. This pathogen is widespread in the environment and annually infects millions of animals and people around the world.

*Salmonella* is able to establish the state of biofilm, which is characterized by a community of cells of one or more species protected by self-generated extracellular polymeric substances (EPS) and attached to an inert surface or living tissue. Biofilms are very important because they allows the persistence of pathogens within the host and the environment.

The aim of this study was to characterize the biofilm formation of different serotypes of *S. enterica* isolated from different hosts in Chile. Biofilm formation was quantified using a colorimetric microtiter plate method and through the correlation coefficient Pearson's, it was if phenotypic characteristics of the biofilm were related to the ability of bacteria to survive stressful conditions in planktonic state.

As a result, a significant association between host, serotypes and biofilm formation was not found. The properties of bacterial survival to stress conditions were independent of biofilm formation.

For to determine the production of curli fimbriae and cellulose, agar plates stained with Congo Red and Blue Coomassie were used, while for determining expression of colanic acid with Calcofluor staining were used.

It was found that the morphotype BDAR (brown, dry and rough) curli fimbrias expressing but not cellulose, is widely expressed by serotypes *S. Agona* (83%), *S. Havana* (60%), *S. Infantis* (57%) and *S. Heidelberg* (83%). This could indicate that this morphotype relatively little studied, may be being widely expressed by strains in the environment.

While serotypes *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Enteritidis*, *S. Havana*, *S. Heidelberg* and *S. Infantis* were positive for cholanic acid. Which would give them a greater capacity to form biofilms on epithelial cells.

Keywords: *Salmonella*, Serotypes, Biofilm, Morphotype, Extracellular polymeric substances (EPS).

## INTRODUCCIÓN

*Salmonella spp.* es el agente etiológico de la salmonelosis, enfermedad entérica que es transmitida por los alimentos y que anualmente infecta a millones de animales y personas en todo el mundo. Los principales reservorios de esta enfermedad son las aves de corral, el ganado vacuno y el porcino; por ende, la fuente de infección en su gran mayoría proviene de las carnes de estos animales y los huevos de las aves.

Múltiples cualidades han hecho de la salmonelosis una enfermedad frecuente y de amplia difusión, gran parte de esto está dado por las propiedades que posee la bacteria, como la aptitud de crecer en un amplio rango de temperaturas, que abarca desde los 7°C a 45°C, siendo destruida solo a 65°C; la capacidad de supervivencia en el medio ambiente y la resistencia a pH entre 4 y 8, sobreviviendo incluso en alimentos congelados y tolerando un 20% de salazón en alimentos conservados. *Salmonella*, es un agente productor de zoonosis, posee algunos serotipos especie-específicos, pero la gran mayoría tienen un amplio rango de hospederos. Junto a estas cualidades, *Salmonella* presenta una estructura bastante versátil, que puede expresar diferentes fenotipos para así poder adaptarse al medio en que se encuentra. Una de estas adaptaciones es la formación de biopelículas o *biofilms*, la que le confiere las características de persistir en condiciones medioambientales extremas y resistir la limpieza mecánica y la desinfección.

Antiguamente el estudio de la *Salmonella* se enfocó en identificar las características de ésta, en su forma libre. Sin embargo, múltiples estudios en diferentes ambientes han llegado a la conclusión de que la forma de expresión planctónica de las bacterias raramente existe en la naturaleza. Hoy en día el estudio de biopelículas está centrado en las vías que regulan y permiten su formación, pero no se ha profundizado en el estudio de la variabilidad que tendrían las diferentes cepas y hospederos en este proceso.

En esta memoria se busca analizar la capacidad de formación de biopelículas de diferentes serotipos de *S. enterica*, aislados desde diversos hospederos, así como la diversidad fenotípica de estas estructuras.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

El género *Salmonella* está conformado por bacterias de tipo bacilo Gram negativo intracelulares facultativas, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae constituida actualmente por las especies *S. bongori* y *S. enterica* dentro de las cuales se han descrito más de 2.500 serotipos (Instituto de Salud Pública, 2012).

### **Epidemiología**

En Estados Unidos más de un millón de casos humanos de enfermedad pueden atribuirse cada año a la salmonelosis, lo que tiene como consecuencia aproximadamente, 20.000 hospitalizaciones y 400 muertes (Díez-García *et al.*, 2012). En el año 2009 la Unión Europea situó a la salmonelosis como la segunda enfermedad zoonótica más frecuentemente reportada en humanos, después de la Campilobacteriosis (Díez-García *et al.*, 2012).

*S. enterica* ser. Enteritidis es el serotipo más frecuente en las infecciones por salmonelosis no tíficas y posee como principal reservorio a las aves tanto domésticas como silvestres siendo transmitida en un 95% de los casos por vía alimentaria (Díez-García *et al.*, 2012). Por lo general, la salmonelosis provoca problemas gastrointestinales auto limitados y solo ocasionalmente puede generar cuadros sistémicos que pueden llegar a comprometer otros órganos (Instituto de Salud Pública, 2012).

Según datos del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) durante el año 2010 se estimó una tasa de 10,7 casos por 100.000 habitantes, observándose un aumento del doble de casos de *S. enterica* ser. Enteritidis en una década (Fica *et al.*, 2012). En el año 2013 fueron notificados 664 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), siendo la causa más frecuente la presencia de *Salmonella spp.* (10,2 % de los brotes registrados). Hace más de una década que la infección por *S. Enteritidis* continua siendo endémica en nuestro país y su control es un desafío constante para la seguridad alimentaria y la salud pública (Fica *et al.*, 2001).

### **Las biopelículas**

Recientemente se confirmó que el porcentaje de muestras de aves de corral contaminadas con *Salmonella* aumentan significativamente durante el procesamiento, como consecuencia

de la presencia de bacterias en superficies con las que entran en contacto durante la cadena de producción (Díez-García *et al.*, 2012). En este hecho tendrían importancia las biopelículas, aumentando el riesgo de contaminación microbiana en plantas de alimentos (Shi y Zhu, 2009).

*Salmonella* invade el epitelio intestinal y los oviductos de aves de corral, persistiendo durante largos períodos de tiempo en el hospedero. En esto podrían desempeñar un papel importante las biopelículas, jugando así un rol aún desconocido en las estrategias de virulencia de *Salmonella* (Ledebøery y Jones, 2005)

En países industrializados se han asociado brotes de esta enfermedad a las semillas germinadas contaminadas, vegetales frescos y frutas. Es más, se ha demostrado que los patógenos entéricos asociados a las plantas no son eliminados por esterilización superficial. Esto evidencia la importancia de las plantas como fómites de la salmonelosis (Steenackers *et al.*, 2012).

Las biopelículas son un gran problema para la industria alimentaria y la salud pública, ya que proveen un ambiente de bacterias patógenas y son causantes del deterioro de los alimentos y equipos generando un gran impacto económico (Díez-García *et al.*, 2012). Un indicio de esto es el reporte del instituto nacional de salud (NIH) de Estados Unidos, en donde se reveló que el 80% de todas las infecciones bacterianas están relacionadas a las biopelículas (Steenackers *et al.*, 2012).

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados, bacterias planctónicas, de libre flotación y bacterias en biopelículas como colonias de microorganismos sésiles (Nazar, 2007).

Una biopelícula es definida como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies protegidas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) autogeneradas y fijadas a una superficie inerte o un tejido vivo (Navia *et al.*, 2010; Steenackers *et al.*, 2012).

Actualmente se piensa que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas (Lasa *et al.*, 2005). Más aún se

considera que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biopelículas y tan sólo 1% vive en estado planctónico (Nazar, 2007).

La matriz extracelular de las biopelículas está constituida por una compleja red de estructuras llamadas sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que está formada por un 97% de agua y el resto está compuesto principalmente por exopolisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos (Castelijm, 2013).

Las EPS protegen a los microorganismos dentro de la biopelícula, contra agentes antimicrobianos, previenen el acceso de biocidas, quelantes, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes, lo que ocasiona que sean muy difíciles de eliminar (Navia *et al.*, 2010).

Los componentes de la matriz extracelular varían considerablemente según la superficie y las condiciones ambientales en que se establezca. Dentro de los componentes estructurales trascendentales en la formación de biopelículas en *Salmonella* se describen las fimbrias curli, flagelos, celulosa, ácido colánico, capsula O-antigénica y ácidos grasos (Steenackers *et al.*, 2012). La expresión de estas estructuras resultan en una red hidrófoba de células estrechamente empaquetadas (Castelijm, 2013).

Las biopelículas de *Salmonella* son clasificadas en cuatro diferentes morfotipos (Tabla Nro. 1) según el tipo de polisacárido extracelular extracelular (EPS) que expresan en la matriz cuando se cultivan en placas de agar que contienen Rojo Congo y Azul de Comassie brillante G. (Vestby *et al.*, 2009).

**Tabla Nro. 1:** Morfotipos

Morfotipo	Expresión
RDAR (roja, seca y rugosa)	Fimbrias curli y celulosa
BDAR (café, seca y rugosa)	Fimbrias curli
PDAR (rosada, seca y rugosa)	Celulosa
SAW (lisa y blanca)	Sin fimbrias curli ni celulosa

Dentro de estos morfotipos, el más estudiado es RDAR (roja, seca y rugosa) el cual está formado por fimbrias curli, proteína BpaA, Ag capsular-O, celulosa, otros polisacáridos capsulares y lipopolisacáridos (Steenackers *et al.*, 2012).

### **Formación de biopelículas**

En la formación de biopelículas están implicados factores como el medio ambiente físico y químico y la interacción entre células; las que determinarán la estructura, función y composición de éstas (Lianou y Koutsoumanis *et al.*, 2012).

Las superficies de la mayoría de las células bacterianas están cargadas negativamente, lo que genera una condición desfavorable para la adhesión bacteriana debido a la fuerza de repulsión electrostática. Sin embargo, las fimbrias y flagelos le otorgan a la bacteria la propiedad de hidrofobicidad y la capacidad de movimiento a la célula, reduciendo así la fuerza de repulsión al enfrentarse a otra superficie; mientras que los lipopolisacáridos (LPS) confieren propiedades hidrófilas a la célula, características importante para la unión a los materiales hidrofílicos (Shi y Zhu, 2009).

Posterior a esta primera unión a la superficie, las bacterias comienzan la producción de la matriz extracelular formada por un conglomerado de diferentes biopolímeros (EPS), los que permitirán la adhesión a la superficie y la cohesión de las células del *biofilm* (Fleming y Wingender, 2010).

En cuanto al ambiente físico, se ha demostrado que *Salmonella* tiene la habilidad de formar biopelículas en múltiples superficies abióticas fuera del hospedero, como en el plástico, la goma, el cemento, el vidrio y el acero inoxidable y es comúnmente encontrada en granjas, mataderos, cocinas, plantas procesadoras de alimento y baños (Steenackers *et al.*, 2012). Los parámetros ambientales físico-químicos que influyen en la formación de biopelículas de *S. enterica* son múltiples, e incluyen la composición del medio, la temperatura de incubación, la osmolaridad, el pH y la atmosfera (Lianou y Koutsoumanis *et al.*, 2012), desempeñando un papel importante en el cambio fenotípico de las células planctónicas al estado sésil (Lianou y Koutsoumanis *et al.*, 2012).

De los estudios realizados en biopelículas de *Salmonella*, una gran cantidad se han centrado en investigar la forma de adhesión bacteriana, así como los procesos que están involucrados

en la formación de las biopelículas (Díez-García *et al.*, 2012; Lianou y Koutsoumanis *et al.*, 2012; Steenackers *et al.*, 2012; Shi y Zhu, 2009). Sin embargo, pocas investigaciones se han enfocado en cuantificar y caracterizar la formación de biopelículas de *S. enterica* según el serotipo y el hospedero, menos aún se ha estudiado la relación entre las características fenotípicas de las biopelículas y la capacidad de resistir a diferentes condiciones de estrés, lo que podría brindar características específicas a las bacterias, contribuyendo con la capacidad de sobrevivir en diferentes ambientes y por ende, con su patogenicidad.

Estos conocimientos contribuirán al desarrollo de mejores técnicas de prevención y control contra la formación de biopelículas de *Salmonella*.

## **HIPÓTESIS**

La calidad y cantidad de formación de biopelículas en *S. enterica* varía dependiendo del serotipo y el hospedero de origen de los aislados, y se correlaciona positivamente con la capacidad de supervivencia a condiciones de estrés de estas bacterias.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la formación de biopelículas de las diferentes serotipos de *S. enterica* aisladas de distintos hospederos en Chile.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Detectar y cuantificar la formación de biopelícula en cepas de *S. enterica*.
2. Determinar la asociación existente entre la formación de biopelículas, el hospedero de origen y el serotipo en cepas de *S. enterica*
3. Determinar la correlación existente entre la formación de biopelículas y la supervivencia a condiciones de estrés en cepas de *S. enterica* Ser. Enteritidis.
4. Determinar el tipo de sustancia polimérica extracelular constituyente de biopelículas formadas por cepas de *S. enterica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas

En este estudio se utilizaron ochenta cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes a distintos serotipos (Tabla Nro. 2). Estas fueron aisladas desde humanos, aves comerciales y aves acuáticas en diferentes regiones de Chile. Los aislados se encuentran disponibles en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET, almacenadas en el sistema Microbank a -80°C.

**Tabla Nro. 2:** Cepas utilizadas

Serotipo	Origen de las cepas aisladas			Total
	Humanos	Aves silvestres	Aves de corral	
<i>S. Enteritidis</i>	15	14	16	45
<i>S. Infantis</i>	2	3	2	7
<i>S. Heidelberg</i>	2	4		6
<i>S. Anatum</i>	2	1	1	4
<i>S. Havana</i>		5		5
<i>S. Agona</i>	2	4		6
<i>S. Senftenberg</i>	2	5		7

### Cuantificación de biopelículas

Las cepas fueron crecidas mediante inoculación en 10 mL de caldo Luria Bertani a 37°C por 24 horas. Posterior a esto, se tomó 1 mL del cultivo fresco y se inocularon en 10 mL de caldo LB los cuales fueron incubados a 37°C hasta que alcanzaron una densidad óptica (OD<sub>600</sub>) de  $0,27 \pm 0,32$  lo que representa  $5 \times 10^8$  bacterias/mL.

Las biopelículas se formaron en dos placas de poliestireno de 96 pocillos (Steenackers *et al.*, 2012) agregando en cada pocillo 200 µL de la suspensión bacteriana diluida a  $4-5 \times 10^{-4}$  UFC/mL utilizando 3 pocillos (ensayo en triplicado). Se incubó una placa a 37°C y la otra a 28°C por 24 hrs. Al finalizar este periodo se midió la absorbancia de la muestra (OD<sub>600</sub>)

mediante el lector Inmunoskan Plus, y la cuantificación de biopelículas se realizó mediante el método colorimétrico de microtitulación en placa, basado en la medición de la absorbancia de la biopelícula teñida con cristal violeta, sobre una placa de poliestireno con una densidad óptica de 550nm (Lianou, 2012; Díez-García, 2012).

Para ello se eliminó el contenido de las placas de cultivo y se lavó cada pocillo con 250  $\mu$ L de agua destilada. Para fijar las bacterias adheridas se utilizaron 200  $\mu$ L de metanol y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Al eliminar el metanol se dejaron secando las placas al aire.

Se agregó a cada pocillo 200  $\mu$ L de cristal violeta y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se lavó cada pocillo con agua corriente para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar al aire. Para resolubilizar las biopelículas se depositaron 200  $\mu$ L de ácido acético glacial al 33% y como último paso se leyó la absorbancia ( $OD_{550}$ ) de cada pocillo.

Las cepas fueron agrupadas en cuatro categorías según la densidad óptica de corte ( $OD_c$ ), la que se define como la densidad óptica promedio alcanzada por los pocillos control negativo (medio LB sin sembrar) de cada placa, más tres desviaciones estándar. Estas categorías son:

- No formadoras de biopelículas, cuando la densidad óptica sea menor o igual a la  $OD_c$
- Formadoras débiles de biopelículas, cuando la densidad óptica sea mayor a la  $OD_c$  pero menor o igual a dos veces la  $OD_c$  ( $2 \times OD_c$ )
- Formadoras moderadas de biopelículas, cuando la densidad óptica sea mayor a dos veces la  $OD_c$  ( $2 \times OD_c$ ) pero menor a cuatro veces la  $OD_c$  ( $4 \times OD_c$ )
- Formadoras fuertes de biopelículas, cuando la densidad óptica sea mayor a cuatro veces la  $OD_c$  ( $4 \times OD_c$ )

**Determinar la asociación existente entre la formación de biopelículas, los serotipos y el hospedero de origen en cepas de *S. enterica*.**

La asociación entre el hospedero y el serotipo de cepas de *S. enterica* se determinó agrupando los valores de cuantificación de la biopelícula según el hospedero (humanos,

aves comerciales y aves acuáticas) y el serotipo de la cepa (*S. enterica* Ser. Enteritidis, *S. enterica* Ser. Agona, *S. enterica* Ser. Anatum, *S. enterica* Ser. Havana, *S. enterica* Ser. Heidelberg, *S. enterica* Ser. Infantis, *S. enterica* Ser. Senftenberg) y se analizaron mediante la prueba de ANOVA.

### **Determinar la correlación existente entre la formación de biopelículas y la supervivencia a condiciones de estrés en cepas de *S. enterica* Ser. Enteritidis**

En un estudio previo (Fresno, 2011) los aislados de *S. enterica* Ser. Enteritidis fueron evaluados con respecto a su supervivencia a condiciones de estrés, la evaluación incluyó la sobrevivencia bacteriana a pH3, supervivencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15nM), supervivencia a NaNO<sub>2</sub> (10nM), supervivencia a condiciones de hambruna por 40 días y resistencia a los antibióticos tales como ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima, gentamicina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino, cefradina, ceftiofur y enrofloxacin, mediante el método de difusión en disco según el protocolo del CLSI (normas de funcionamiento para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos) (2005).

Se usó el coeficiente de correlación de Pearson's para establecer si las características de expresión fenotípica de las biopelículas tenían relación con la capacidad de supervivencia de las cepas. De acuerdo con las reglas de Colton para la interpretación del coeficiente de correlación (Dawson-Saunders y Trapp, 1997), un valor superior a 0,75 se considera excelente. Las pruebas estadísticas fueron calculadas con el programa v2010 Infostat ®.

### **Determinar el tipo de sustancia polimérica extracelular constituyente de biopelículas formadas por cepas de *S. enterica***

Se evaluó la presencia de enlaces  $\beta$ 1-3, y  $\beta$ 1-4 encontrados en polisacáridos de la matriz extracelular de las biopelículas, como la celulosa y el ácido colánico, polisacárido capsular necesario para crear las biopelículas sobre células epiteliales (Steenackers *et al.*, 2012). Para esto se incubaron los aislados en caldo LB a 37°C por una noche. Se tomaron 5 $\mu$ L de este cultivo y se sembrarán por plaqueo en agar LB sin NaCl, suplementado con 200 $\mu$ g/mL de calcofluor (fluorescent brightener 28; Sigma- Aldrich, St. Louis, MO). Las placas fueron incubadas a 28°C y 37°C por 4 y 2 días respectivamente. Se revisó la fluorescencia de las

colonias usando una lámpara U.V. La presencia de fluorescencia fue indicador de la producción de ácido colánico y celulosa (Dong *et al.*, 2011).

Se usó controles positivos y negativos, desde un cultivo de *S. Typhimurium* ATCC 14028, las que resultan positivas cuando crecen a 28°C y negativas cuando crecen a 37°C (Bonafonte, 2000).

La capacidad de producción de celulosa y fimbrias curli se evaluó en agar rojo Congo y Azul de comassie brillante G. Se tomó 10µl de cada aislado incubado en medio LB a 37°C durante toda la noche, y se sembraron por extensión en agar LB sin NaCl, suplementado con 40µg/ml de Rojo Congo (sigma) y 20µg/ml de Azul de Comassie brillante G (Sigma). Todas las placas se incubaron a 28°C por 48h y posteriormente se evaluó la morfología de cada serotipo (Steenackes *et al.*, 2012; Vestby *et al.*, 2009; Solano *et al.*, 2002).

Los morfotipos de los aislados de *Salmonella* se clasificaron dentro de 4 categorías:

- a. Rojo, seco y rugoso (RDAR), indicando producción de celulosa y curli
- b. Café, seco y rugoso (BDAR), indicando que no hay producción de celulosa
- c. Rosado, seco, y rugoso (PDAR), indicando que no hay expresión de curli
- d. Suave y blanco (SAW), indicando que no se produce ni curli ni celulosa.

### **Normas de bioseguridad**

*Salmonella* está clasificada como agente de riesgo intermedio (CONICYT, 2008) y sus medidas de contención son de nivel de aislamiento tipo II. Los protocolos de manejo de muestras se realizarán en una cabina de bioseguridad nivel IIA y en el mesón alrededor de un mechero encendido. Se utilizaron implementos de bioseguridad como guantes, delantal, alcohol 70% para la desinfección de manos y lentes de protección UV para cuando fue necesario. El acceso a los laboratorios fue restringido y se utilizaron contenedores para material contaminado, que fue autoclavado antes de su eliminación.

## RESULTADOS

### Detección y cuantificación de la formación de biopelícula en cepas de *S. enterica*.

La formación de biopelículas de las ochenta cepas de *Salmonella* fue evaluada a dos temperaturas; a 28°C y a 37°C.

Al medir la absorbancia (DO<sub>550</sub>) de las biopelículas solubilizadas se hallaron valores desde 0.065 a 1.156 los que posteriormente fueron clasificados según la DOc (densidad óptica promedio alcanzada por los pocillos control negativo de cada lectura) en no formadoras, formadoras débiles, moderadas y fuertes de biopelículas (Tabla Nro. 3).

El 83% de las cepas cultivadas a 28°C fue capaz de formar biopelículas sobre placas de poliestireno. Resultados similares se evidenciaron al incubar las placas a 37°C, en las que el 81% de las cepas fue eficaz en la formación de biopelículas.

**Tabla Nro. 3:** Clasificación de los aislados de *S. enterica* de acuerdo a su capacidad de generar biopelículas a 28°C y 37°C.

Serotipos	Formación de biopelículas 28°C			
	No formadoras	Débiles	Moderadas	Fuertes
<i>Salmonella</i>	Nro. (%)	Nro. (%)	Nro. (%)	Nro. (%)
<i>S. Agona</i> (n=6)	2 (33%)	1 (17%)	1 (17%)	2 (33%)
<i>S. Anatum</i> (n=4)	1 (25%)	2 (50%)	0 (0%)	1 (25%)
<i>S. Enteritidis</i> (n=45)	7 (16%)	14 (31%)	13 (29%)	11 (24%)
<i>S. Havana</i> (n=5)	3 (60%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (20%)
<i>S. Heidelberg</i> (n=6)	1 (17%)	3 (50%)	2 (33%)	0 (0%)
<i>S. Infantis</i> (n=7)	0 (0%)	0 (0%)	3 (43%)	4 (57%)
<i>S. Senftenberg</i> (n=7)	0 (0%)	0 (0%)	3 (43%)	4 (57%)
Total	14 (17%)	20 (25%)	23 (29%)	23 (29%)

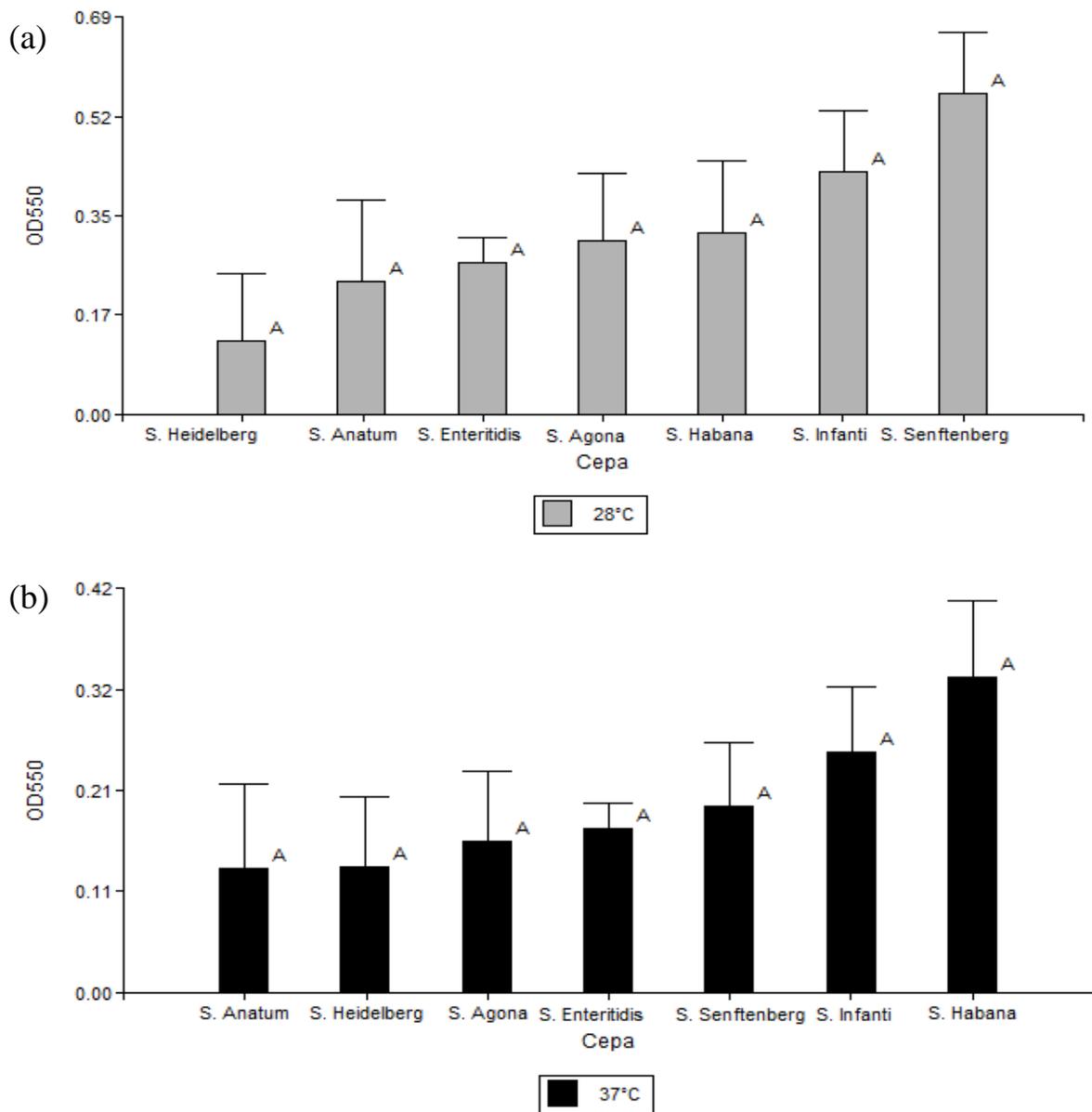
Serotipos	Formación de biopelículas 37°C			
	No formadoras	Débiles	Moderada	Fuertes
<i>Salmonella</i>	Nro. (%)	Nro. (%)	Nro. (%)	Nro. (%)
<i>S. Agona</i> (n=6)	2 (33%)	3 (50%)	1 (17%)	0 (0%)
<i>S. Anatum</i> (n=4)	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	0 (0%)
<i>S. Enteritidis</i> (n=45)	7 (16%)	18 (40%)	18 (40%)	2 (4%)
<i>S. Havana</i> (n=5)	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)
<i>S. Heidelberg</i> (n=6)	1 (17%)	4 (66%)	1 (17%)	0 (0%)
<i>S. Infantis</i> (n=7)	1 (14%)	3 (43%)	2 (29%)	1 (14%)
<i>S. Senftenberg</i> (n=7)	2 (29%)	2 (29%)	2 (29%)	1 (14%)
Total	15 (19%)	33 (41%)	27 (34%)	5 (6%)

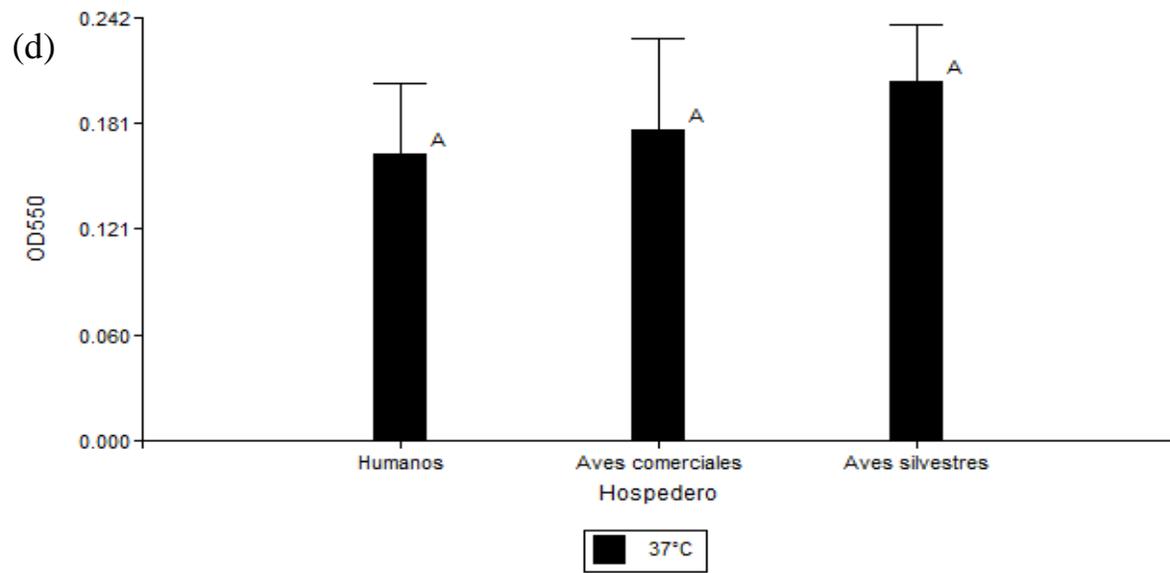
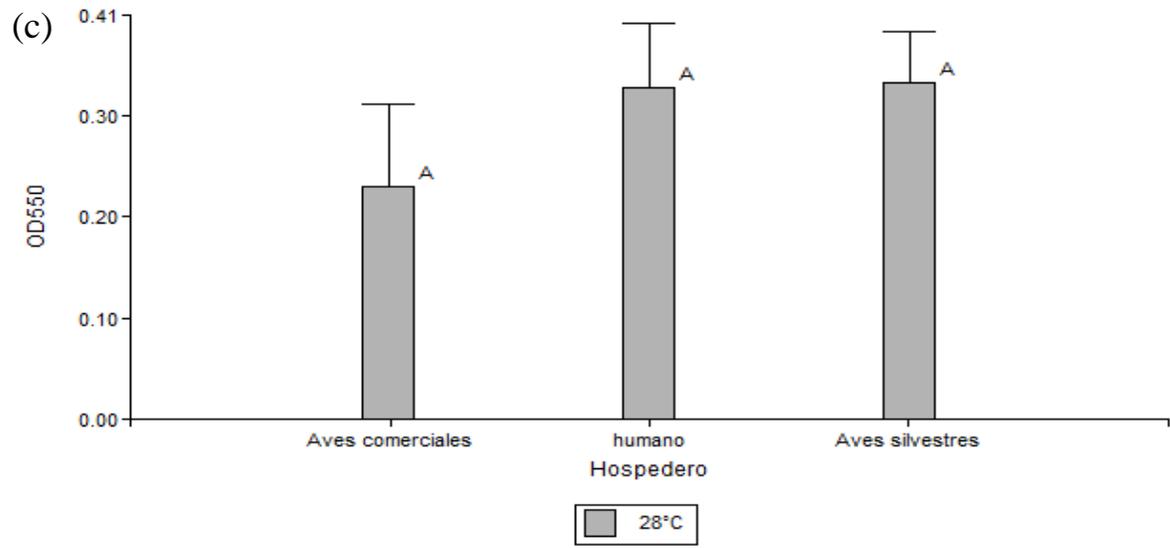
**Determinar la asociación existente entre la formación de biopelículas, el hospedero de origen y el serotipo en cepas de *S. enterica*.**

No se encontró una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en la formación de biopelículas según el serotipo ni el hospedero de origen de los aislados a 28°C y 37°C (Figura Nro. 1).

**Figura Nro. 1:** Formación de biopelículas (OD<sub>550</sub>) según el serotipo de *Salmonella* a 28°C (a) y 37°C (b) y según el hospedero de origen a 28°C (c) y 37°C (d).

Barras con igual letra no poseen una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).





**Determinar la correlación existente entre la formación de biopelículas y la supervivencia a condiciones de estrés en cepas de *S. enterica* Ser. Enteritidis.**

La producción de biopelículas de las cepas analizadas resultó ser independiente ( $p > 0,05$ ) de las características de supervivencia a condiciones de estrés de las cepas de *S. enterica* Ser. Enteritidis. Los valores de supervivencia a condiciones de estrés fueron adquiridos de un estudio previo (Fresno, 2011) en el que se desafiaron las cepas de *S. enterica* Ser. Enteritidis a condiciones como, sobrevivencia bacteriana a pH3, supervivencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15nM), supervivencia a NaNO<sub>2</sub> (10nM), supervivencia a condiciones de hambruna por 40 días (Anexo 1) y resistencia a los antibióticos, en los que se evaluó la ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxima, gentamicina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino, cefradina, ceftiofur y enrofloxacina (Anexo 2).

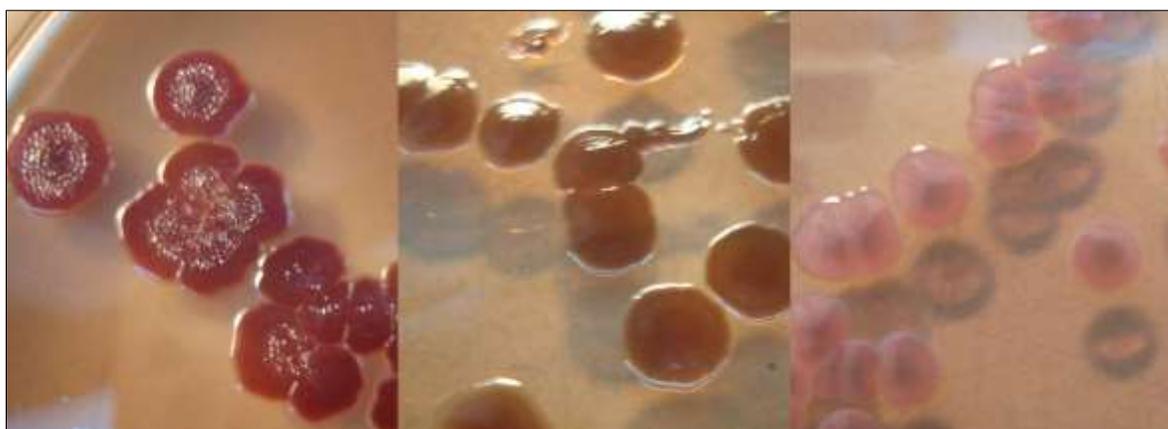
**Determinar el tipo de sustancia polimérica extracelular constituyente de biopelículas formadas por cepas de *S. enterica*.**

### Morfotipos

El 100% de las cepas estudiadas expresó un morfotipo de tipo rugoso y seco (Figura Nro. 2). El morfotipo rojo, seco y rugoso (RDAR) que expresa fimbrias curli y celulosa, fue el predominante en *S. enterica* Ser. Enteritidis, *S. enterica* Ser. Anatum y *S. enterica* Ser. Senftenberg, mientras que el Morfotipo café, seco y rugoso (BDAR) formado por fimbrias curli sin celulosa fue dominante en *S. enterica* Ser. Agona, *S. enterica* Ser. Havana, *S. enterica* Ser. Heidelberg y *S. enterica* Ser. Infantis.

Solo los serotipos *S. enterica* Ser. Agona, *S. enterica* Ser. Enteritidis y *S. enterica* Ser. Infantis expresaron el morfotipo rosado, seco y rugoso (PDAR) indicador de producción de celulosa sin fimbrias curli (Tabla Nro. 4).

**Figura Nro. 2:** Morfotipos expresados en agar LB sin NaCl con rojo congo y azul de comassie. (a) Rojo, seco y rugoso; (b) Café, seco y rugoso y (c) Rosado, seco y rugoso.



(a)

(b)

(c)

**Tabla Nro. 4:** Morfotipos expresados por los ochenta serotipos de *Salmonella* en agar LB con Rojo Congo y Azul de Comassie incubados a 28°C por dos días.

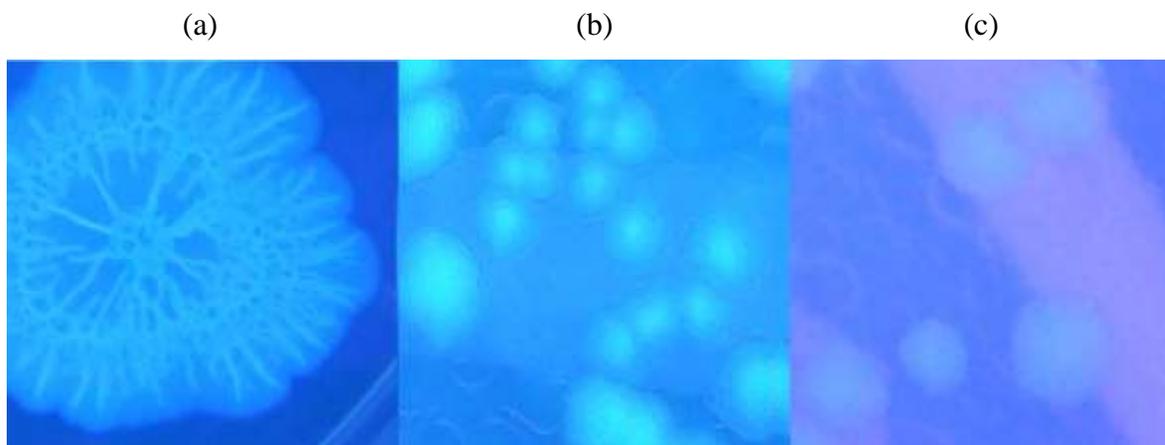
Serotipo	Morfotipos		
	RDAR	BDAR	PDAR
<i>Salmonella</i>	Nro. (%)	Nro. (%)	Nro. (%)
<i>S. Agona</i> (n=6)		5 (83%)	1 (17%)
<i>S. Anatum</i> (n=4)	3 (75%)	1 (25%)	
<i>S. Enteritidis</i> (n=45)	39 (87%)	2 (4%)	4 (9%)
<i>S. Havana</i> (n=5)	2 (40%)	3 (60%)	
<i>S. Heidelberg</i> (n=6)	1 (17%)	5 (83%)	
<i>S. Infantis</i> (n=7)	2 (29%)	4 (57%)	1 (14%)
<i>S. Senftenberg</i> (n=7)	4 (57%)	3 (43%)	
Total	51 (64%)	23 (29%)	6 (7%)

#### Ácido colánico

Al observar las placas se encontró cepas tanto negativas como positivas a fluorescencia. Las positivas se expresaron de dos formas, una en que la fluorescencia abarcaba la colonia por completo y otra que solo era visible en el centro de la colonia, al igual que el control positivo (Figura Nro. 3).

Si se analiza la fluorescencia obtenida en base al morfotipo expresado por cada cepa, se encontró que a 28°C los morfotipos RDAR y PDAR expresan en su mayoría fluorescencia fuerte, el morfotipo BDAR, en cambio, muestra un mayor número de fluorescencia media y negativa. A 37°C los tres morfotipos generaron, casi por completo, fluorescencias de mediana intensidad (Tabla Nro. 5 y 6).

**Figura Nro. 3:** Fluorescencias encontradas en placas de LB sin sal con tinción de calcofluor. (a) Fluorescencia en toda la colonia (b) Fluorescencia en el centro de la colonia y (c) Negativo a fluorescencia.



**Tabla Nro. 5:** Fluorescencia expresada por las cepas sembradas en agar LB incubadas a 28°C por 4 días en relación al morfotipo.

Serotipo	RDAR			BDAR			PDAR		
	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+/-	-
<i>S. Agona</i> (n=6)	0	0	0	4	1	0	1	0	0
<i>S. Anatum</i> (n=4)	3	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i> (n=45)	33	6	0	1	0	1	4	0	0
<i>S. Havana</i> (n=5)	2	0	0	2	1	0	0	0	0
<i>S. Heidelberg</i> (n=6)	1	0	0	1	4	0	0	0	0
<i>S. Infantis</i> (n=7)	2	0	0	1	2	1	0	0	1
<i>S. Senftenberg</i> (n=7)	3	1	0	0	0	3	0	0	0
Total	44	7	0	9	9	5	5	0	1

\*(+) = fluorescencia fuerte, (+/-) fluorescencia intermedia y (-) negativo a fluorescencia

**Tabla Nro. 6:** Fluorescencia expresada por las cepas sembradas en agar LB incubadas a 37°C por 2 días en relación al morfotipo.

Serotipo	RDAR			BDAR			PDAR		
	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+/-	-
<i>S. Agona</i> (n=6)	0	0	0	0	5	0	0	1	0
<i>S. Anatum</i> (n=4)	1	2	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. Enteritidis</i> (n=45)	0	39	0	0	2	0	0	4	0
<i>S. Havana</i> (n=5)	0	2	0	0	3	0	0	0	0
<i>S. Heidelberg</i> (n=6)	0	1	0	0	5	0	0	0	0
<i>S. Infantis</i> (n=7)	0	2	0	0	4	0	0	2	0
<i>S. Senftenberg</i> (n=7)	1	3	0	0	0	3	0	0	0
Total	2	49	0	0	20	3	0	6	0

\*(+) = fluorescencia fuerte, (+/-) fluorescencia intermedia y (-) negativo a fluorescencia

## DISCUSIÓN

### Formación de biopelículas

El método de cuantificación de biopelículas a través de microtitulación en placas de poliestireno con tinción cristal violeta ha sido validada por numerosos autores (Díez-García *et al.* 2012; Linau *et al.*, 2012; Steenackers *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2011) como una técnica exitosa a la hora de obtener resultados cuantitativos, sobre la formación de biopelículas. En este trabajo los resultados obtenidos a partir de esta técnica revelaron que todos los serotipos analizados a 28°C y 37°C fueron capaces de formar biopelícula sobre placas de poliestireno, no así todas las cepas analizadas. Resultados similares fueron publicados por autores como Linaou *et al.* (2012) y Agarwal *et al.* (2011), en donde se demostró la alta variabilidad de producción de biopelículas que poseían las cepas de los serotipos evaluados, encontrándose desde cepas no formadoras a formadoras fuertes dentro de un mismo serotipo.

En este estudio no se encontró una relación entre la habilidad de formar biopelículas, el serotipo y el hospedero de origen de los aislados de *S. enterica*. Del mismo modo, en un ensayo llevado a cabo por Lianou *et al.* (2012) se concluyó que no existía un efecto específico del serotipo en la formación de biopelícula en 60 cepas de *Salmonella* pertenecientes a 9 serotipos diferentes; similares resultados fueron obtenidos por Agarwal *et al.* (2011) en donde no se encontró una relación entre el serotipo y la formación de biopelículas en 151 cepas de *S. enterica* pertenecientes a 69 serotipos. Sin embargo, autores como Díez-García *et al.* (2012) y Oliveira *et al.* (2006) publicaron resultados que indicarían que el serotipo si está involucrado en la formación de biopelículas de *Salmonella*, siendo *S. Agona* el serotipo con mayor producción de biopelículas en comparación con los serotipos *S. Montevideo*, *S. Seftenberg*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Typhi*, *S. Derby* y *S. Newport*.

La ambigüedad en los resultados podría estar dada por la falta de un método de análisis estandarizado, ya que la formación de biopelículas de los microorganismos está influenciada por varios factores, como el nivel de nutrientes, pH, temperatura, periodo de incubación, concentración del cultivo, etc. Encontrando parámetros desiguales usados en

los distintos ensayos, con mayores diferencias en el tiempo y el medio de incubación de las placas.

En un estudio llevado a cabo por Agarwal *et al.* (2011) se describió la manera óptima de cuantificar la formación de biopelículas con el método de microtitulación en placas para *Salmonella*, concluyendo que la mayor expresión de biopelículas estaría dada en un cultivo en medio LB, con una duración de 48 horas mínimo. Junto a esto, se recomienda la tinción con cristal violeta en una concentración de 0,5%, ya que revelaba mejores resultados que una de 0,1%. Aun así, no se ha podido establecer una prueba *Gold standard* para este tipo de estudio.

Junto a estos factores, los resultados pudieron verse afectados por el número de cepas analizadas en cada investigación, en donde muchos de los serotipos estudiados estaban constituidos por un bajo número de cepas.

Dentro de este estudio, el serotipo con mayor número de cepas analizadas fue *S. enterica* Ser. Enteritidis, al que se le otorgó mayor importancia por ser el principal implicado en las infecciones por salmonelosis en seres humanos, además de ser el serotipo aislado con mayor frecuencia desde humanos, animales, alimentos y el medio ambiente (Diez-García *et al.* 2012).

La evaluación de la capacidad de formación de biopelículas por *Salmonella spp.* reveló que estas bacterias poseen una alta capacidad para formar biopelículas en superficies de plástico, con un 83% de cepas formadoras de biopelículas a 28°C y un 81% a 37°C. Estos resultados confirman hallazgos anteriores (Steenackers *et al.* 2012; Diez-García *et al.* 2012; Argawal *et al.* 2011). Se piensa que esta capacidad está dada por la naturaleza hidrófoba no polar de la superficie del plástico, mientras que otros materiales como el vidrio, el acero inoxidable y mica poseen características hidrófilas con carga negativa lo que dificultaría la unión de estas bacterias (Argawal *et al.* 2011).

Estos antecedentes deberían estar presentes a la hora de generar programas de limpieza y desinfección dentro de la industria alimentaria, ya que el plástico es un material común dentro de cocinas, empresas procesadoras de alimentos y mataderos.

Conjuntamente, se concluyó que no existía relación entre la formación de biopelículas y la supervivencia a las condiciones de estrés de las mismas cepas en estado planctónico, evaluadas anteriormente por Fresno (2011) en las cepas pertenecientes a *S. enterica* Ser. Enteritidis, existiendo pocos estudios que se refieran a este tema. Autores como Mikkelsen *et al.* (2007) han demostrado que la forma de crecimiento de los microorganismos al interior de una biopelícula difiere ampliamente del de una bacteria de vida libre. En su investigación reveló que en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* las biopelículas no expresan un estado estacionario durante la curva de crecimiento, incluso después de 5 días de incubación. Posterior a esto, Díez-García *et al.* (2012) compraron curvas de crecimiento de *Salmonella* en estado libre contra *Salmonella* en estado de biopelícula no encontrando relación entre las cinéticas de crecimiento de las cepas probadas y su capacidad de producción de biopelículas.

Es necesario tener presente que la unión de *Salmonella* en superficies abióticas ocurre dentro de 12 h de incubación en caldo de cultivo. Aun así es posible que después de unas pocas horas de incubación, la superficie se sature y el aumento de células planctónicas no implicaría un mayor número de células unidas (Díez-García *et al.*, 2012). Junto a esto, se ha visto que las propiedades de resistencia a condiciones inhóspitas, así como la resistencia a antibióticos que poseen los microorganismos al interior de una biopelícula, están dadas por un conjunto de interacciones complejas entre los microorganismos presentes en la biopelícula, así como por la superficie en que se encuentran. Como conclusión se puede inferir que no es posible extrapolar las características que poseen las bacterias en su estado planctónico, a las bacterias que se encuentran en estado de biopelícula.

### **Matriz extracelular de las biopelículas**

Recientes estudios (Steenackers *et al.* 2012) indicarían que para la fijación y formación de una biopelícula se requieren diferentes componentes según la estructura que colonice la bacteria, observándose disimilitud en los elementos que conforman la matriz extracelular de biopelículas sobre tejido animal, plantas y superficies abióticas (vidrio, plástico, acero inoxidable). Es más, se ha llegado a considerar que una biopelícula formada bajo un

conjunto específico de parámetros puede llegar a ser única para ese ambiente (Solano *et al.*, 2002).

Estos antecedentes suponen un problema para el análisis dentro del laboratorio, en donde los parámetros se ven manipulados por el investigador, obteniendo resultados que escaparían ampliamente a lo observado en ambiente natural.

Es más, dentro del mismo laboratorio se han observado discrepancias entre los morfotipos; la comparación entre el morfotipo RDAR (rojo, seco y rugoso) expresado en agar, y un sistema a base de caldo de cultivo, ha resultado en una diferencia de casi 30% del genoma funcional del serotipo estudiado (Steenackers *et al.* 2012)

Por esto, los componentes de la matriz extracelular expuestos por las cepas en este estudio, bajo condiciones de agar LB, deben ser tomados como potenciales estructuras que podrían expresar las bacterias en un medio ambiente natural, al generar biopelículas.

Dentro de los componentes de la matriz estudiados; la celulosa, un polímero  $\beta$ -1-4-D-glucosa, es una sustancia de gran importancia dentro de la biopelículas, por lo general es el compuesto que se encuentra en mayor cantidad en la matriz extracelular, siendo responsable de la unión entre los microorganismos dentro de la biopelícula y de la textura pegajosa de ésta (Steenackers *et al.* 2012).

Autores como Solano *et al.* (2002) demostraron que existe una función específica de la celulosa durante la maduración de las biopelículas en la superficie de células epiteliales (tejido intestinal de aves y células HEP-2). Otras investigaciones (Steenackers *et al.* 2012) han señalado que la celulosa es necesaria para adherencia en vidrio y plantas, mientras que Vestby *et al.* (2009) revelaron que la celulosa no era uno de los mayores constituyentes de la matriz extracelular en cepas de *S. enterica* Ser. Agona y *S. enterica* Ser. Typhimurium aisladas desde la industria alimentaria. Así como tampoco es necesario su expresión para la adherencia a placas de poliestireno (Steenackers *et al.* 2012).

Junto con la celulosa, las fimbrias curli son otro de los componentes significativos en la matriz de la biopelícula, siendo su presencia, junto a celulosa, la que determinaría el morfotipo de una biopelícula. Las fimbrias curli en *Salmonella* son importantes durante la unión inicial a la superficie y posteriormente en la interacción entre células (Steenackers *et*

*al.* 2012), otorgándole a la bacteria la propiedad de hidrofobicidad y la capacidad de movimiento a la célula. En la naturaleza las fimbrias curli forman un complejo junto a la celulosa y la capsula Ag-O que mantiene unida las células. Solano *et al.* (2002) destacaron la importancia de las fimbrias curli para generar biopelículas estrechas bajo condiciones de cultivo en agar LB.

Esto indicaría que los morfotipos RDAR (expresión de celulosa y fimbrias curli) tendrían mayor potencial de unión a células epiteliales, vidrio y plantas que las de tipo BDAR (café, seco y rugoso). Las cepas con mayor formación de morfotipo RDAR en este ensayo, provinieron de *S. Enteritidis* (87%) y *S. Anatum* (75%). El predominio de este morfotipo en *S. Enteritidis* ya ha sido descrito por otros autores, como Solano *et al.* (2002), quienes estudiaron 204 cepas, de las cuales un 71% fueron capaces de formar biopelículas en medio LB y un 66% de estas expresó el morfotipo RDAR. No se ha encontrado bibliografía que se refiera al morfotipo expresado por *S. Anatum*. Aun así es difícil llegar a concluir de forma certera el predominio de RDAR para este serotipo, por el bajo número de cepas analizadas (4 cepas).

Hoy en día *S. Enteritidis* es el serotipo causante de la mayor cantidad de infecciones zoonóticas transmitidas por aves de corral en la industria alimentaria. Por esto, es necesario estudiar más a fondo la relevancia del morfotipo RDAR para la formación de biopelículas en el tejido intestinal de aves, la unión a plantas y el vidrio, ya que esto podría explicar porque existe gran diseminación de este patógeno durante el procesamiento de las carnes.

A lo largo de los años, en el campo de la investigación de biopelículas, se ha dado poca relevancia al estudio del morfotipo BDAR, probablemente porque se cree que es relativamente raro en la naturaleza. Sin embargo, este estudio evidenció su presencia en 29% de las cepas estudiadas y un 60% de las cepas no *S. Enteritidis*. Además se descubrió que existe un gran predominio del morfotipos BDAR en los serotipos *S. Agona* (83%), *S. Havana* (60%), *S. Infantis* (57%) y *S. Heidelberg* (83%). Otros autores han encontrado resultados similares, por ejemplo Vestby *et al.* (2009) observaron un 61% de *Salmonella* ser. *Agona* con morfología BDAR.

La presencia de celulosa en las biopelículas de *Salmonella* ha sido vinculada a la protección contra el estrés ambiental y los efectos bactericidas de los desinfectantes. Sin embargo, la

gran cantidad de morfotipos BDAR encontrados en este estudio, en serotipos con alta prevalencia en el ambiente, podría señalar que la celulosa no es un componente fundamental para esta cualidad. Sumado a esto, un estudio llevado a cabo por Vestby *et al.* (2009) reveló que tras enfrentar cepas obtenidas en fábricas de alimento con morfotipo RDAR y BDAR a hipoclorito o cloruro de benzalconio, no se observó diferencias significativas en la susceptibilidad.

En cuanto a la cuantificación de biopelículas, no se observó diferencias significativas entre los diferentes morfotipos, como lo señalan Vestby *et al.* (2009) donde la cuantificación de las biopelículas en cepas que expresaron morfotipos BDAR y RDAR mostró que ambos eran buenos formadores de biopelículas.

Dentro de los componentes analizados, se evaluó la presencia de ácido colánico, un polisacárido capsular común en las *Enterobacteriaceae*.

Un estudio llevado a cabo por Ledebøer y Jones (2005) señaló que el ácido colánico en *Salmonella* estaría implicado en la formación de extensas estructuras tridimensionales sobre células epiteliales (HEp-2), así como en la constitución de biopelículas maduras en tejido intestinal de pollo. Junto a esto se concluyó que los genes de biosíntesis de ácido colánico están involucrados en el desarrollo de estructuras de biopelícula en la superficie de las células de cultivo de tejidos de mamíferos y en el epitelio intestinal de pollo.

Sumado a esto, algunos autores (Ledebøer y Jones, 2005; Prouty y Gunn, 2003) han expuesto que la producción de ácido colánico no estaría implicada en la formación de biopelículas sobre superficies abióticas, cálculos ni semillas de alfalfa.

En este trabajo se usó la tinción con blanco de calcofluor el que se une a enlaces  $\beta$ 1-3, y  $\beta$ 1-4 de los polisacáridos como la celulosa y el ácido colánico encontrados en la matriz extracelular de las biopelículas; este compuesto exhibe fluorescencia cuando se expone a luz ultravioleta. Podemos observar en los resultados que existen cepas con fluorescencia alta e intermedia, resultados similares fueron obtenidos por Solano *et al.* (2002) en donde los morfotipos BDAR presentaron solamente intensidades medias de fluorescencia, en cambio las de tipo RDAR obtuvieron en su totalidad fluorescencias de alta intensidad. En base a esto podemos interpretar que las cepas que expresaron un morfotipo BDAR con fluorescencia intermedia presentan una deficiencia de polisacáridos en su estructura, y

como ya sabemos un morfotipo BDAR no contiene celulosa, por ende la fluorescencia necesariamente debe estar revelando la expresión de ácido colánico. A 37°C todas las cepas BDAR de los serotipos *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Enteritidis*, *S. Havana*, *S. Heidelberg* y *S. Infantis* expresaron fluorescencia intermedia coincidente con la presencia de ácido colánico. El único serotipo con morfotipo BDAR que no mostro fluorescencia fue *S. Senftenberg*, lo que indicaría que este serotipo no tendría la capacidad de producir este polisacárido. Por ende presentaría menor capacidad de unión a células epiteliales.

Aun es necesaria la investigación en la expresión de ácido colánico, pues sería interesante abordar su formación a temperaturas corporales de las aves, para saber si este componente tendría alguna implicancia en la formación de biopelículas al interior del tracto digestivo de estos animales.

## CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvo que la gran mayoría de las cepas aisladas estudiadas, sin importar su origen, fueron capaces de formar biopelículas.

Se evidenció que la capacidad de formar biopelículas no estaría relacionado con el serotipo ni el hospedero de origen de *Salmonella*.

No se encontró relación entre las características de supervivencia a condiciones de estrés y resistencia a antibióticos de las cepas en estado libre versus la capacidad de formación de biopelículas.

En relación al análisis de los polímeros extracelulares que conforman la matriz de las biopelículas en las cepas estudiadas *in vitro*, *S. Enteritidis* expresó de forma predominante el morfotipo RDAR en sus cepas, lo que indicaría que este serotipo tendría mayor potencial para unirse a células epiteliales, plantas y vidrio.

Junto a esto, se constató que el morfotipo BDAR es expresado en gran cantidad por los serotipos *S. Agona*, *S. Havana*, *S. Infantis* y *S. Heidelberg*; esto podría indicar que este morfotipo, relativamente poco estudiado, puede estar siendo expresado ampliamente por las cepas de *Salmonella* en el medio ambiente.

En cuanto a la presencia de ácido colánico, se observó una gran cantidad de cepas BDAR positivas a la expresión de este polisacárido capsular, lo que indicaría una mayor capacidad de estas para formar biopelículas sobre células epiteliales. Es necesario investigar de forma más específica la presencia de este polisacárido en las biopelículas.

## **BIBLIOGRAFIA**

**AGARWAL, R.; SINGH, S.; BHILEGAONKAR, K.; SINGH, V.** 2011. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. 18(4): 1493-1498.

**BONAFONTE, A.; SOLANO, C.; SESMA, B.; ALVAREZ, M.; MONTUENGA, L.; GARC-ROS, D.; GAMAZO, C.** 2000. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*. FEMS Microbiol. Letters. 191(1): 31-36.

**CASTELIJN, G.** 2013. *Salmonella* biofilms. Thesis for the degree of doctor. Wageningen, Países Bajos. Wageningen University. 171 p.

**COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (CONICYT).** 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2ª ed. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 139p.

**DAWSON-SAUNDERS, B.; TRAPP, R.** 1997. Compilación de datos en investigación médica. In: Bioestadística médica, 2ª ed. DF, Mexico. pp. 49-75.

**DÍEZ-GARCÍA, M.; CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C.** 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. Food Microbiol. 31:(2) 173-180.

**DONG, H.; PENG, D.; JIAO, X.; ZHANG, X.; GENG, S.; X. LIU.** 2011. Roles of the *spiA* gen from *Salmonella enteritidis* in biofilm formation and virulence. Microbiol. 157 (6): 1798-1805.

**FICA, A.; ALEXANDRE, M.; PRAT, S.; FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ, J.; HEITMANN, I.** 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Enteritidis. Infect. al día. 18 (2): 85-93.

**FICA, A.; ACOSTA, G.; DABANCH, J.; PERRET, C.; TORRES, M.; LÓPEZ, J.; JOFRÉ, L.; WEITZEL.** 2012. Brotes de salmonelosis y el tamaño y rol del Estado en Chile. Rev. Chil. Infect. 29 (2): 207-214.

- FLEMMING, H.; WINGENDER, J.** 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 623-633.
- FRESNO, M.** 2011. Determinación de la supervivencia a condiciones de estrés de cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis aisladas desde humanos, gaviotas y aves comerciales. Memoria para optar al título profesional de médico veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias. 18p.
- INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE (ISP).** 2012. *Salmonella spp.* Vigilancia regional por Red PulseNet. [en línea]. Boletín laboratorio y vigilancia al día. N° 15: s.p. <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2012/06/BOLETIN%2015.pdf>> [consulta: 19-02-2014]
- LEDEBOER, A.; JONES, D.** 2005. Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* Ser. Typhimurium on hep-2 cells and chicken intestinal epithelium. *J. Bacteriol.* 187(9): 3214–3226.
- LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K.** 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 160 (2): 171–178.
- MIKKELSEN, H.; DUCK, Z.; LILLEY, K.; WELCH, M.** 2007. Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189(6): 2411–2416.
- NAVIA, P.; VILLADA, H.; MOSQUERA, S.** 2010. Las biopelículas en la industria de alimentos. *Facd. Cs. Agr.* 8 (2): 118-128.
- NAZAR, J.** 2007. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 67 (1): 161-172.
- OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.** 2006. Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella* Enteritidis serotypes to materials used in kitchens. *J. Food Prot.* 69: 2352-2356.

**PROUTY, A.; GUNN, J.** 2003. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infect. Immun.* 71(12): 7154-7158.

**SHI, X.; ZHU, X.** 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Nat. Safe Foods.* 20(9): 407-4013.

**SOLANO, C.; GARCÍA, B.; VALLE, J. BERASAIN, C.; GHIGO, JM.; GAMAZO, C.; LASA, I.** 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43: 793-808.

**STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.** 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45: 502-5031.

**VESTBY, L.; MORETRO, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L.** 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. *BMC Vet. Res.* 20(5).

## ANEXOS

### 1.- Resistencia de las cepas frente a condiciones de estrés

Cepa	Serotipo	Ranking	Fenotipo	R pH	R H2O2	R NaNO2	R H10	RH20
SARB 16	S. enteritidis			15	37	49	24	42
SEN 1	S. enteritidis	12	sensible	7	44	42	4	11
SEN 100	S. enteritidis	15	sensible	8	45	48	21	27
SEN 101	S. enteritidis	20	sensible	10	18	26	36	28
SEN 102	S. enteritidis	54	intermedio	27	22	44	13	17
SEN 103	S. enteritidis	81	resistente	40	8	20	17	16
SEN 104	S. enteritidis	35	intermedio	18	6	37	19	21
SEN 15	S. enteritidis	82	resistente	41	40	28	7	4
SEN 16	S. enteritidis	9	sensible	6	39	32	2	7
SEN 17	S. enteritidis	48	intermedio	24	19	38	8	5
SEN 18	S. enteritidis	21	sensible	13	20	29	1	1
SEN 2	S. enteritidis	45	intermedio	23	34	40	12	13
SEN 20	S. enteritidis	40	intermedio	19	38	33	28	8
SEN 24	S. enteritidis	10	sensible					
SEN 25	S. enteritidis	5	sensible	2	31	38	30	23
SEN 3	S. enteritidis	49	intermedio	25	29	43	6	10
SEN 4	S. enteritidis	8	sensible	5	23	45	11	9
SEN 49	S. enteritidis	73	resistente	37	10	1	18	15
SEN 5	S. enteritidis	6	sensible	13	27	27	26	44
SEN 50	S. enteritidis	84	resistente	43	14	15	25	20
SEN 51	S. enteritidis	44	intermedio	22	16	18	34	36
SEN 52	S. enteritidis	83	resistente	42	11	31	31	18
SEN 6	S. enteritidis	7	sensible	20	46	46	16	41
SEN 7	S. enteritidis	32	intermedio	17	47	39	20	38
SEN 72	S. enteritidis	66	resistente	32	13	19	38	25
SEN 73	S. enteritidis			26	49	23	42	24
SEN 74	S. enteritidis	18	sensible	11	33	2	45	29
SEN 75	S. enteritidis	60	intermedio	30	32	21	44	33
SEN 76	S. enteritidis	67	resistente	33	4	3	49	34
SEN 77	S. enteritidis	88	resistente	47	15	10	46	30
SEN 78	S. enteritidis	68	resistente	34	5	4	37	37
SEN 79	S. enteritidis	16	sensible	9	43	5	35	32
SEN 8	S. enteritidis	4	sensible	1	42	43	3	12
SEN 85	S. enteritidis	59	intermedio	29	35	13	32	43
SEN 86	S. enteritidis	86	resistente	45	2	6	23	40
SEN 87	S. enteritidis	57	intermedio	28	3	11	40	39

Cepa	Serotipo	Ranking	Fenotipo	R pH	R H2O2	R NaNO2	R H10	RH20
SEN 88	S. enteritidis	91	resistente	49	30	12	39	46
SEN 89	S. enteritidis	85	resistente	44	24	17	43	47
SEN 90	S. enteritidis	61	resistente	31	17	14	41	45
SEN 91	S. enteritidis	69	resistente	35	12	16	47	48
SEN 92	S. enteritidis	90	resistente	48	25	8	48	49
SEN 95	S. enteritidis	31	intermedio	16	41	9	9	6
SEN 96	S. enteritidis	75	resistente	38	7	7	10	2
SEN 97	S. enteritidis	76	resistente	39	21	24	14	31
SEN 98	S. enteritidis	22	sensible	14	28	36	15	26

## 2.\_ Resistencia a antibióticos

Cepas	Enrofloxacino	Amp-Ac clav	Cefotaxima	Gentamicina	Tetraciclina	Trim-Sulfa	Ceftiofur	Cefradina	Ampicilina	Cefadroxilo
SARB 16										
SEN 1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
SEN 100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SEN 101	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SEN 102	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
SEN 103	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
SEN 104	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
SEN 15	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
SEN 16	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
SEN 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 18	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
SEN 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
SEN 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
SEN 49	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
SEN 5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
SEN 7	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
SEN 72	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Cepas	Enrofloxacino	Amp-Acclav	Cefotaxima	Gentamicina	Tetraciclina	Trim-Sulfa	Ceftiofur	Cefradina	Ampicilina	Cefadroxilo
SEN 73	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
SEN 74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 75	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
SEN 76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 79	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
SEN 8	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
SEN 85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 86	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
SEN 87	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
SEN 88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
SEN 92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEN 95	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
SEN 96	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
SEN 97	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
SEN 98	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0

\*(0): Sensible, (1): Resistente