



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

***Salmonella* spp. EN REPTILES EN CAUTIVERIO DE LA REGIÓN
METROPOLITANA: PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA
ASOCIADOS A INVASIVIDAD**

Francisco Javier Carmona Balbontín

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO
Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

SANTIAGO, CHILE
2015



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

***Salmonella* spp. EN REPTILES EN CAUTIVERIO DE LA REGIÓN
METROPOLITANA: PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA
ASOCIADOS A INVASIVIDAD**

Francisco Javier Carmona Balbontín

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

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESORA GUÍA:	CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CONSEJERO:	CARLOS NAVARRO V.
PROFESOR CONSEJERO:	CRISTOBAL BRICEÑO U.

SANTIAGO, CHILE

2015

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVO ESPECIFICO.....	14
MATERIAL Y METODO.....	15
Cepas Bacterianas.....	15
a) Viabilidad y pureza.....	15
b) Identificación bioquímica y serológica.....	15
c) Confirmación genómica de <i>Salmonella</i>	16
d) Genes a detectar.....	16
i. Obtención del ADN bacteriano.....	16
ii. Mezcla de reacción de PCR.....	16
iii. Amplificación del ADN.....	16
iv. Visualización de productos de PCR.....	17
Análisis de datos.....	18
Bioseguridad.....	18
RESULTADOS.....	19
Cepas bacterianas.....	19
Detección de genes de virulencia.....	20
a) Detección del gen <i>spiA</i>	20
b) Detección del gen <i>sseG</i>	21
c) Detección del gen <i>ssaB</i>	22
d) Detección del gen <i>sscB</i>	23
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIÓN.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXOS.....	33

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla Nro. 1. Partidores a utilizar y tamaño del amplicón para los genes <i>spiA</i> , <i>sseG</i> , <i>sscB</i> , <i>ssaB</i>	17
Tabla Nro. 2. Protocolos de PCR para la amplificación de los genes seleccionados.....	18
Tabla Nro. 3. Porcentaje de detección de genes de virulencia asociados a invasividad en cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde reptiles en cautiverio de la Región Metropolitana.....	24
Tabla Nro. 4. Perfiles, frecuencia y porcentaje de genes de virulencia detectados en cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde reptiles en cautiverio	25

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura Nro. 1. Mecanismos de ingreso de <i>Salmonella</i> spp. desde el lumen intestinal hacia la submucosa.....	6
Figura Nro. 2. Sistema de secreción tipo 3 (SST3).....	7
Figura Nro. 3. <i>Salmonella</i> al interior de las vacuolas contenedoras de <i>salmonella</i> (VCS) en un enterocito y las funciones de las diferentes proteínas efectoras.....	8
Figura Nro. 4. Ingreso de <i>Salmonella</i> al interior de un macrófago mediante VCS y la activación de un segundo SST3.....	9
Figura Nro. 5. Activación del sistema de secreción tipo 3 (SST3) por parte de las islas de patogenicidad 1, 2 y 5.....	10
Figura Nro. 6. Regulación de la SPI-2 por parte de los operones.....	11
Figura Nro. 7. Visualización de los amplificadores del gen <i>invA</i> (1.070 pb) en cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.....	20
Figura Nro. 8. Visualización de los amplificadores del gen <i>spiA</i> (550 pb) en cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.....	21
Figura Nro. 9. Visualización de los amplificadores del gen <i>sseG</i> (690 pb) en cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.....	22
Figura Nro. 10. Visualización de los amplificadores del gen <i>ssaB</i> (402 pb) en cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.....	23
Figura Nro. 11. Visualización de los amplificadores del gen <i>sscB</i> (435 pb) en cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.....	24

RESUMEN.

Las mascotas exóticas, especialmente los reptiles -ampliamente distribuidos por el mundo representan un alto riesgo para la Salud Pública, debido principalmente a su condición de portadores intestinales de *Salmonella* spp., estimándose que del total de casos de salmonelosis un 7% se asocia al contacto con reptiles (SAR). Del total de SAR un 15% aproximadamente presenta un cuadro invasivo, los cuales incluyen septicemia, meningitis, infección en cartílagos e inclusive la muerte.

La invasividad de *Salmonella* se encuentra asociada a genes de virulencia, que se organizan principalmente en la isla de Patogenicidad 2 (SPI-2) de su genoma. En consideración a lo anterior el propósito de este estudio fue detectar genes de virulencia asociados a invasividad, en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio de la Región Metropolitana. En este estudio se seleccionaron cuatro genes de virulencia (*spiA*, *sseG*, *ssaB*, *sscB*) asociados a invasividad, específicamente a la sobrevivencia de esta bacteria al interior de macrófagos y su diseminación sistémica.

De las 34 cepas analizadas, el perfil más frecuente encontrado fue *spiA/sscB/sseG* (35,2%), seguido por *sscB/sseG/ssaB* (8,8%), siendo los genes mayormente detectados *sseG* (91%), *ssaB* (71%) y *sscB* (61%), mientras que el gen *spiA* fue menor su detección (31%).

Estos resultados constituyen la primera aproximación molecular de la potencial virulencia de cepas de *Salmonella* aislada desde reptiles en Chile. Se discuten los resultados con la variabilidad genética en cepas de diferentes fuentes animales y el hombre.

Palabras claves: reptiles, *Salmonella*, isla de Patogenicidad 2, genes de virulencia.

ABSTRACT

Exotic pets, especially reptiles, are widely distributed throughout the world, particularly in Chile, where a high percentage are intestinal carriers of *Salmonella* spp. (About 50%), representing a risk to public health. Thus, it is estimated that of all cases of salmonellosis in humans, about 6-7% is associated with contact with reptiles (RAS). Of total RAS, about 15% has a box-invasive, which include septicemia, meningitis, infection in cartilage and even death. *Salmonella* invasiveness is encoded in virulence genes that are organized primarily in Pathogenicity Island 2 (SPI-2). The purpose of this study was to detect genes associated with invasiveness virulence in *Salmonella* strains, isolated from reptiles in captivity in the Metropolitan Region. In this study, four virulence genes (*spiA*, *sseG*, *ssaB*, *sscB*) associated with invasiveness, and therefore, belonging to the pathogenicity island 2 were selected. These genes are related to the survival of the bacteria within macrophages and their systemic dissemination.

Of the 34 strains tested, the most common profile was *spiA/ sscB/ sseG* (35.2%), followed by *sscB/sseG/ssaB* (8.8%), the most prevalent genes *sseG* (91%), *ssaB* (71%) and *sscB* (61%), while the *spiA* obtained a lower prevalence (31%).

These results provide the first molecular approach of potential virulence of *Salmonella* strains isolated from reptiles in Chile. The results with the genetic viability in different strains of animals and humans sources are discussed.

Key Words: reptiles, *Salmonella*, pathogenicity island two, virulence genes.

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una enfermedad infectocontagiosa producida por enterobacterias del género *Salmonella*. Comprende un conjunto de cuadros clínicos cuya principal manifestación es la gastroenteritis aguda y su vía de transmisión de mayor importancia son los alimentos, razón por la cual se le clasifica como una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA). Esta es una de las enfermedades zoonóticas más comunes y ampliamente distribuida en el mundo, con millones de casos en humanos anualmente.

Muchos animales son considerados reservorios y fuente de transmisión de esta bacteria, encontrándose reportes de detección en aves, mamíferos, anfibios, peces y reptiles. *Salmonella* spp. es un habitante que se puede encontrar frecuentemente en el tracto digestivo de los reptiles sin causar enfermedad, por lo que pueden ser considerados como portadores sanos, y por ende de riesgo para la Salud Pública. La salmonelosis asociada a reptiles (SAR) ha aumentado en el último tiempo, por la mayor presencia de estos animales como mascotas. Por ello, varios países han presentado campañas educativas, como en Estados Unidos donde el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), ha creado campañas preventivas sobre los riesgos asociados a la tenencia de reptiles como mascotas, con la finalidad de prevenir esta enfermedad, especialmente en menores de edad.

En Chile, existen antecedentes de transmisión de *Salmonella* spp. desde reptiles a humanos, como también se ha detectado esta bacteria en un alto porcentaje de reptiles en cautiverio de dos centros de la Región Metropolitana y en tortugas de oreja roja en Valdivia

En este estudio se pretende identificar cuatro genes asociados a virulencia en cepas de *Salmonella* spp. aisladas en reptiles confinados en dos centros de la Región Metropolitana de Chile, durante el año 2004. Los resultados constituyen la primera descripción de aspectos asociados a virulencia en cepas de reptiles en cautiverio en Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa producida por enterobacterias del género *Salmonella*. Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos peritricos. Este género consta de dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*. Dentro de *S. enterica* se encuentran seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). En la especie *S. enterica* se encuentran más de 2.500 serotipos (Garrity *et al.*, 2004).

Aunque la salmonelosis corresponde principalmente a una enfermedad transmitida por alimentos (ETA), posee otras vías de transmisión, como la transplacentaria, la conjuntival y por contacto directo tanto entre humanos como con animales (Herrera y Jabib, 2015). Esta última vía comenzó a tomar relevancia en las últimas décadas, describiéndose la participación de una mayor variedad de especies animales que pueden transmitir este patógeno al hombre, entre ellas las mascotas exóticas, aumentando así la incidencia de salmonelosis por contacto con animales (Wikström *et al.*, 2014).

Durante el 2014, se realizó un estudio donde se estimó que existieron alrededor de 93,8 millones de casos de salmonelosis a nivel mundial, de los cuales 80,3 millones (85,6%) correspondieron a ETA y 13,5 millones (14,4%) de casos transmitidos por otras vías. Dentro de las otras vías de transmisión se destaca el contacto directo, entre personas o entre ellos y animales (Herrera y Jabib, 2015).

En Chile, las instituciones gubernamentales encargadas del control y prevención de esta enfermedad son dos: el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), relacionado con el control y prevención de esta enfermedad en animales y el Instituto de Salud Pública (ISP), que se encarga del control y prevención en humanos. El ISP notifica la detección de cepas de *Salmonella*, mayoritariamente de casos de ETA y aislamientos clínicos, sin hacer mención de los casos ocurridos por otras fuentes de transmisión. En Chile no existe información oficial de salmonelosis asociadas con animales.

Salmonella coloniza el tracto intestinal de mamíferos, aves, peces, anfibios y reptiles. Estos últimos alcanzan importancia por su presencia cada vez más habitual como mascotas, aumentando el riesgo de contagio para las personas (Herrera y Jabib, 2015).

***Salmonella* en Reptiles**

1) Presencia de *Salmonella* en reptiles.

La presencia de *Salmonella* spp. en reptiles ha sido ampliamente estudiada en varios países, en los cuales se encuentra generalmente una prevalencia superior al 50%. En Suecia, durante el 2014 se detectó un 63% de positividad a *Salmonella* en reptiles en cautiverio, en muestras cloacales provenientes de 63 reptiles individuales pertenecientes a 14 familias distintas (Emydidae, Leptotyphlopidae, Boidae, entre otras) y de 62 de sus camas (principalmente terrarios). La subespecie *enterica* fue la mayormente aislada con sus serotipos Java, Fluntern y Tennessee como los más prevalentes sin embargo, también se encontraron aislados de otras subespecies como *S. salamae*, *S. diarizonae*, *S. arizonae* y *S. houtenae* (Wikström *et al.*, 2014).

En Alemania y Austria, el 2002 se encontró un 88,9% de los aislamientos positivos a *Salmonella* en muestras cloacales provenientes de reptiles (Testudines y Squamata), comprados en tiendas de mascotas y un 58,8% en muestras de animales silvestres; en el caso de las tortugas (Testudines) se encontró un menor número de positividad comparado al orden Squamata, donde *Salmonella enterica* subespecie *enterica* fue mayormente aislada. Los serotipos *S. Newport* y *S. Othmarschen* fueron los más prevalentes, por otro lado, también se encontraron aislados de otras subespecies como son: *diarizonae*, *salamae*, *arizonae* y *houtenae* (Geue y Loschner, 2002). En Japón, durante el año 2004 se informó un 62,5% de positividad a *Salmonella* spp. en muestras cloacales de reptiles pertenecientes a tiendas de mascotas, donde se analizaron muestras provenientes de tortugas, lagartos y serpientes, encontrando los serotipos *S. Newport*, *S. Bardo* y *S. Panama* como los más prevalentes (Nakadai *et al.*, 2004).

En Chile Sobarzo (2004) obtuvo resultados similares, con un 60,4% de muestras cloacales positivas a *Salmonella* en reptiles en cautiverio, de tres órdenes de reptiles (Testudines, Squamata y Crocodylia), encontrando una mayor positividad en el orden Squamata (serpientes y lagartos); por otro lado en el orden Crocodylia no se encontró ninguna muestra positiva. Otro estudio realizado en Chile, específicamente en la ciudad de Valdivia, se analizaron muestras cloacales y de acuarios provenientes de tortugas de oreja roja

(*Trachemys scripta elegans*), de tiendas de mascotas, encontrando un 13% de positividad a *Salmonella spp.* (Toledo, 2009).

De acuerdo al SAG y su último informe de cuarentenas de reptiles en el periodo 1998-2008 (considerando 37 cuarentenas y 6.079 reptiles), el 70,3% de los reptiles analizados resultaron positivos a *Salmonella*, siendo *Salmonella enterica*, subespecie *enterica* la más prevalente (82,6%) (SAG, 2010) De acuerdo a los antecedentes publicados por el SAG, el último informe de las cuarentenas de reptiles en el periodo 1998-2008 (con 37 cuarentenas y un total de 6.079 reptiles analizados), siendo un 70,3% de los 6.079 reptiles analizados positivos a *Salmonella*, siendo *Salmonella enterica*, subespecie *enterica* la más prevalente (82,6%), aislándose el serotipo Montevideo en un 13%, como el más prevalente, seguida por Kiambu y Enteritidis, ambos con un 8,7%. Pudieron destacar la heterogeneidad de los serotipos encontrados y, por lo tanto, la inexistencia de un serotipo mayoritario (SAG, 2010). Recientemente en noviembre del 2014, el SAG dejó de realizar esta cuarentena, manteniendo los reptiles por 5 días sólo para verificaciones documentales¹, sin realizar ningún tipo de exámenes microbiológicos. Por otro lado, SERNAPESCA, institución encargada del ingreso de reptiles acuáticos, no realiza ningún tipo de pruebas diagnósticas de los animales que ingresan a Chile, situación que en su conjunto podría aumentar el riesgo para la salud pública y la salud de los ecosistemas.

2) Salmonelosis en humanos asociadas a reptiles

En Suecia, el año 2014 se estimó que el 6% de todos los casos reportados de salmonelosis en humanos desde 1998 hasta el 2000, tuvieron asociación con reptiles (Wikström *et al.*, 2014). Por otra parte, en Estados Unidos se reportó que alrededor de un 7% (93.000 casos) de los casos de salmonelosis que se reportan anualmente al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) está asociado a reptiles (CFSPH, 2013). En Suiza el 2013, se realizó un estudio donde se analizaron 182 casos pediátricos de salmonelosis asociada a reptiles (SAR), concluyendo que la principal manifestación clínica fue gastrointestinal (85% de los casos) y el resto de los casos presentaron un cuadro invasivo

¹ Osorio, Mónica. 2015. [Comunicación personal]. Estación Cuarentenaria Pecuaria, Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

que incluía meningitis, septicemia, infección en cartílagos y hueso, incluso muerte. Además pudieron encontrar ciertos factores de riesgo en la presentación de un cuadro invasivo, el primero fue la edad, ya que se observó que la gran mayoría de los casos de SAR invasivo fueron en lactantes menores de 6 meses de edad y el segundo factor de riesgo, fue la asociación a ciertos reptiles como son las iguanas, dragones barbudos, serpientes, camaleones y geckos; las tortugas se asociaron a cuadros gastrointestinales más que invasivo (Meyer *et al.*, 2013). En Inglaterra, durante el año 2014, se realizó un estudio donde se analizaron los casos de SAR en menores de cinco años de edad y los compararon con salmonelosis no asociadas a reptiles, encontrando que en SAR había un mayor número de casos que requieren hospitalización, donde se encontraban pacientes con septicemia y meningitis. Este estudio permitió concluir que las SAR tienen mayor probabilidad de generar un cuadro más complicado e invasivo que las salmonelosis no asociadas a reptiles (Murphy y Oshin, 2014)

En relación a SAR en Chile, durante el 2012 una menor de seis meses fue confirmada como el primer caso positivo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariedad Fluntern, serotipo asociado principalmente a reptiles. Lamentablemente, el informe no hace mención al cuadro clínico ni al proceso de recuperación de la menor (ISP, 2012). Otro caso descrito en 2013, relata que tanto una menor de 2 años como un perro, habitantes de la misma casa en que coexistían tortugas de oreja roja (*Trachemys scripta elegans*) presentaron diarrea, aislándose *Salmonella* Poona, lo cual sugeriría infección por SAR. (Vargas, 2013). Además, durante el 2015 se reportaron tres casos de SAR en lactantes (contacto con tortugas de oreja roja) y los serotipos que se aislaron correspondieron a *S. Montevideo*, *S. Newport* y *S. Pomona*, tanto en los menores como en las tortugas. Los lactantes presentaron SAR gastrointestinal, pero uno de los casos fue derivado a la Unidad de Cuidado Intensivos: fiebre, deshidratación y acidosis metabólica (Braun *et al.*, 2015).

3) Patogenia de *Salmonella*.

Salmonella en humanos puede generar dos cuadros, el primero corresponde a uno limitado al sistema gastrointestinal y el segundo a un cuadro invasivo, donde puede haber septicemia albergándose esta bacteria en diferentes órganos.

Salmonella ingresa al organismo principalmente vía oral, avanzado por el tracto gastrointestinal hasta llegar al intestino, donde se adhiere a los enterocitos o a las células M de la mucosa intestinal, pero también puede ser capturada, por células dendríticas, con su posterior difusión sistémica (figura 1).

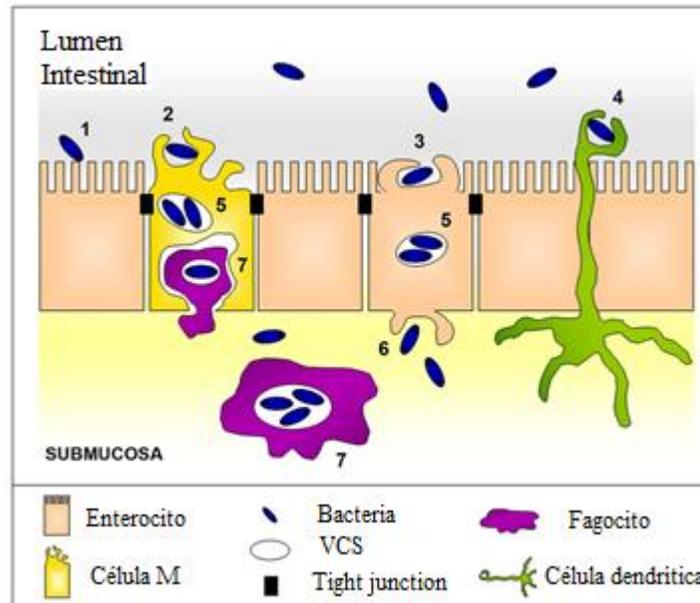


Figura 1. Mecanismos de ingreso de *Salmonella* spp. desde el lumen intestinal hacia la submucosa. (Fàbrega y Vila, 2013; Modificado).

Una vez en el lumen intestinal, el pH neutro, la alta osmolaridad y el ambiente rico en nutrientes, activa en la bacteria un sistema especializado de secreción de proteínas llamado Sistema de Secreción Tipo III (SST3), el cual es utilizado como mecanismo de activación “trigger” de adherencia e invasión (figura 2).

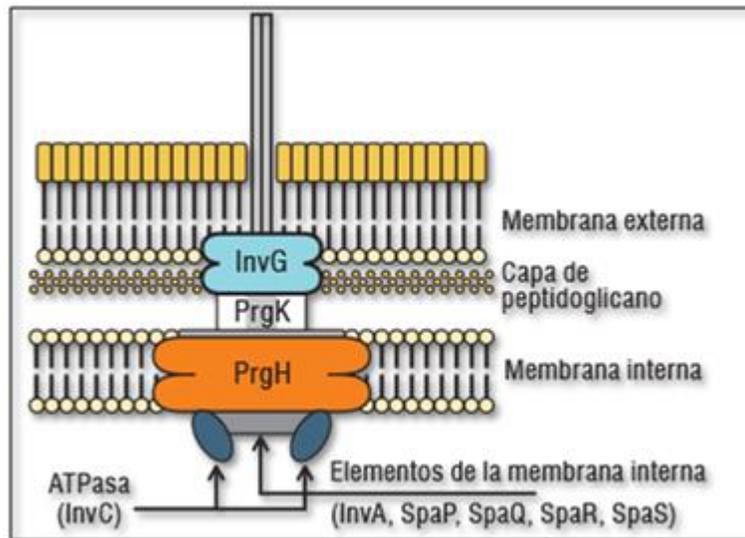


Figura 2. Sistema de secreción Tipo III (SST3).

(Lloyd, 2002).

Este sistema le permite a la bacteria inyectar proteínas efectoras al citosol del enterocito, las cuales son capaces de interferir con vías de señalización, resultando en una reorganización del citoesqueleto de actina. Este proceso permite un ondulamiento de membrana (“ruffling”) y con ello la internalización de la bacteria, ingresando al citoplasma en las denominadas vacuolas contenedoras de *Salmonella* (VCS).

Las VCS comienzan a tener contacto con lisosomas, a través de las proteínas de membranas asociadas a lisosomas LAMP, las cuales provocan una disminución del pH al interior de las vacuolas; por otro lado comienza a disminuir la osmolaridad y los nutrientes, activando un segundo SST3, el cual permite la liberación de diversas proteínas efectoras hacia el citosol de la célula hospedera, cuyas funciones son las siguientes (Figura 3):

- i) Posicionamiento de las VCS cerca del aparato de Golgi, facilitando la llegada de nutrientes al interior de ellas.
- ii) Dinámica de la membrana de las VCS que permite la formación de filamentos, integridad de las VCS, esterificación del colesterol, lo que otorga una mayor firmeza a estas vacuolas.

Cabe destacar que en el caso de los macrófagos, la acidificación de las VCS es mediante los receptores Toll Like (TLR) y sus moléculas de asociación (Figura 4) (Spano y Galan, 2012).

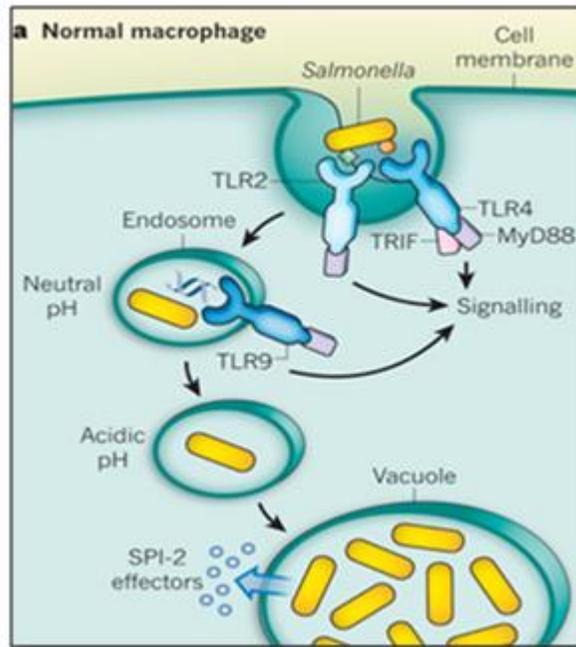


Figura 4. Ingreso de *Salmonella* al interior de un macrófago mediante VCS y la activación de un segundo SST3. (Spano y Galan, 2012).

Salmonella al llegar al torrente sanguíneo, puede viajar y albergarse en distintos órganos, como hígado, bazo, médula ósea y vesícula biliar. Generan de esta manera un cuadro invasivo y sistémico, donde se destacan las infecciones generalizadas (septicemia), meningitis, infección en cartílago y huesos (Figueira y Holden, 2012).

3.1) Patogenia Molecular

Actualmente se sabe que los genes de virulencia de *Salmonella* se encuentran organizados en islas de patogenicidad (SPI) a nivel cromosomal. Esta bacteria cuenta con más de 16 SPI, siendo dos de ellas las más estudiadas: SPI-1 y SPI-2. Respecto a SPI-2 está ausente

en *Salmonella bongori*, encontrándose solamente en la especie *S. enterica*, con sus respectivas subespecies y serotipos (Figueira y Holden, 2012).

Dentro de las funciones de las islas 1 y 2 se pueden mencionar:

SPI-1: Contiene 31 genes que codifican proteínas involucradas en la translocación de moléculas efectoras y sus chaperonas dentro del citoplasma de la célula hospedera. Estos genes permiten el ingreso de *Salmonella* a los enterocitos, codificando adhesinas fimbriales y no fimbriales y el SST3 (Figura 5).

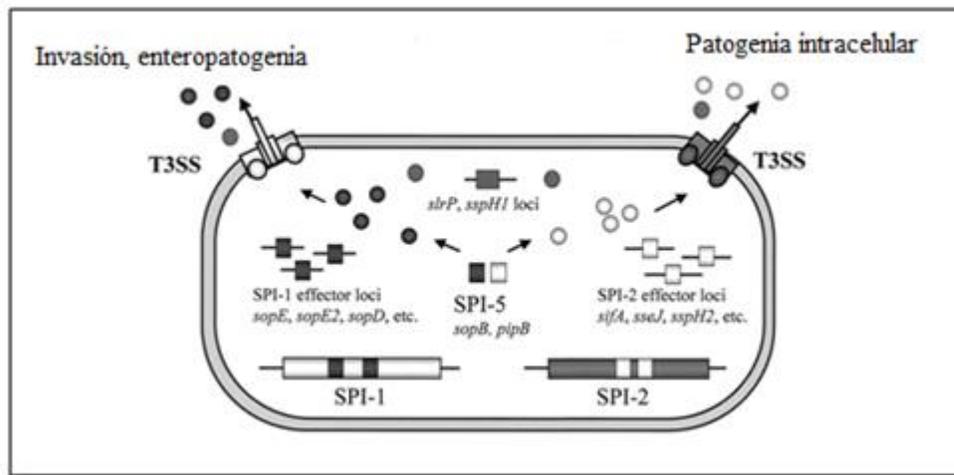


Figura 5. Activación del sistema de secreción tipo 3 (SST3) por parte de las islas de patogenicidad 1, 2 y 5. (Schmidt y Hensel, 2004; Modificado).

SPI-2: Consta de 32 genes que regulan un segundo SST3 (Figura 5), el cual facilita la infección sistémica, aumentando la sobrevivencia de *Salmonella* al interior de macrófagos permitiendo su multiplicación y ayudando a su diseminación.

Como se aprecia en la Figura 5, *Salmonella* posee dos los sistemas de secreción tipo 3, el primero lo utiliza para ingresar al enterocito y es regulado por genes que se encuentran presentes en la SPI-1 y SPI-5, mientras que el segundo SST3, es para liberar proteínas efectoras desde la VCS al citoplasma, permitiendo que esta bacteria sobreviva, se multiplique y se disemine a nivel sistémico. Este sistema está regulado por genes que están presentes en la SPI-2 y en menor proporción por la SPI-5 (Schmidt y Hensel, 2004).

En *Salmonella* las SPI están reguladas por operones, los cuales son unidades genéticas funcionales formadas por un complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interaccionan las proteínas codificadas por sus genes. Estos complejos están formados por genes estructurales que codifican para la síntesis de proteínas (generalmente enzimas), que participan en vías metabólicas cuya expresión generalmente está regulada por otros 3 factores de control, denominados:

- a) Factor promotor: zona que controla el inicio de la transcripción del operón (Champoux, 2005).
- b) Operador: zona de control que permite la activación/desactivación del promotor a modo de "interruptor génico" por medio de su interacción con un compuesto inductor (Champoux, 2005).
- c) Gen regulador: alguno de los genes del operón pueden codificar factores de transcripción que se unan al promotor, regulando así la propia expresión del operón (Champoux, 2005).

SPI-2 posee cuatro operones que regulan su expresión: operón regulador, dos operones estructurales y un operón efector/chaperona. El operón regulador regula los otros tres operones y dependen del complejo PhoQ/PhoP y del complejo OmpR-EnvZ, que a su vez están regulados por el pH, concentración de Mg, péptidos antimicrobianos, entre otros. Los operones estructurales, tienen como función principal formar el SST3, mientras que el operón efector/chaperona, regula la formación de proteínas efectoras y chaperonas (Figura 6).

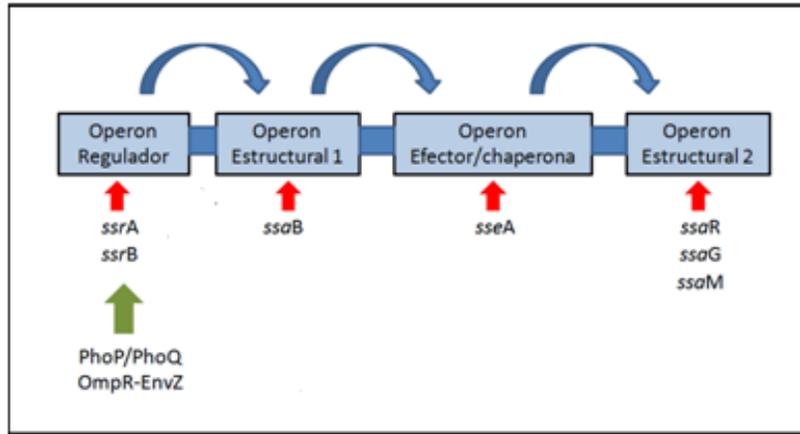


Figura 6. Esquema de regulación de la SPI-2, por parte de los operones.
(Esquema propio).

Los genes que se encuentran en la SPI-2, se pueden agrupar en cuatro tipos, de acuerdo a los operones:

- a) Los genes *ssa* (operón estructural 1 y 2), que codifican para el sistema de secreción tipo 3, de los cuales se encuentran *ssa*: U, T, S, R, Q, P, O, N, V, M, L, K, J, I, H, G, E, D, C y B.
- b) Los genes *ssr* (operón regulador) que codifican para el sistema de secreción-regulador, de los cuales se tiene los genes *ssr*: A y B.
- c) Los genes *ssc* (operón chaperona) que codifican para chaperonas, de los cuales se tiene *ssc*: A y B.
- d) Los genes *sse* (operón efector) que codifican para proteínas efectoras, de los cuales se tiene *sse*: G, F, D, C, B y A.

Adicionalmente, existen los genes *spi*, los cuales no están regulados por estos operones sin embargo, se encuentran en la isla de patogenicidad 2, siendo su función determinar la sobrevivencia de *Salmonella* al interior de los macrófagos, de los cuales se tiene *spi*: A, B y C (Figueira y Holden, 2012).

De todos los genes asociados a la SPI-2, cuatro de ellos llaman la atención por su rol fundamental en la sobrevivencia de *Salmonella* dentro de las VCS, multiplicación y diseminación sistémica:

- a) *ssaB*: es un promotor de uno de los dos operones estructurales que contiene SPI-2 (Figueira y Holden, 2012).
- b) *sseG*: codifica una proteína efectora SseG, que controla el posicionamiento perinuclear de las VCS, cercanas al aparato de Golgi, para facilitar la llegada de nutrientes (Figueira y Holden, 2012).
- c) *sscB*: codifica una chaperona que facilita la secreción y función dentro de las células del hospedero de la proteína efectora SseF, que también participa en el posicionamiento perinuclear de las VCS (Figueira y Holden, 2012).
- d) *spiA*: es un gen determinante para la sobrevivencia de la bacteria dentro de los macrófagos, ya que aleja los lisosomas de las VCS, a través de los citoesqueletos, previniendo la formación de fagolisosoma y de esta manera facilitando la diseminación de la bacteria por el organismo, pudiendo generar un cuadro invasivo (Figueira y Holden, 2012).

Se ha descrito que las islas de patogenicidad contribuyen a la macroevolución. Estas se han adquirido en bloque desde una fuente externa y son identificadas por su diferencia en el porcentaje de contenido de G+C en relación a la media del cromosoma y por otras características, que sugieren su adquisición a través de elementos genéticos móviles. En el caso de *Salmonella*, el ancestro en común entre *S. enterica* y *S. bongori* no presentaba SPI-2, sin embargo, *S. enterica* la habría adquirido vía horizontal, mejorando la eficiencia infectiva, la sobrevivencia al interior de células y su diseminación sistémica. Además las SPI de *Salmonella*, son excepcionales dentro de las islas de patogenicidad de otras bacterias Gram negativas: son específicas de serotipo e inespecíficas para cepas. El genoma de un patógeno usualmente representa un mosaico entre estas islas recién adquiridas y un ADN relativamente antiguo, desarrollando variantes patogénicas. Además, los procesos de reordenamiento, delección y transferencia de genes pueden ser parte de una mutación, tienen un fuerte impacto en la microevolución y adaptación de los microorganismos patógenos durante el proceso de infección, siendo esto una particularidad de serotipos o de una cepa en específico (Herrera y Jabib, 2015). En este contexto, resulta interesante estudiar los genes de virulencia de SPI-2 asociados a invasividad en cepas de *Salmonella* aisladas desde reptiles y, posteriormente sería útil en un futuro, poder compararlas con los genes presentes en cepas de *Salmonella* aisladas de distintos orígenes.

OBJETIVO GENERAL

Identificar genes de virulencia asociados a invasividad en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio de la Región Metropolitana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar genes presentes en la Isla de Patogenicidad 2 en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio de la Región Metropolitana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades fueron realizadas en los laboratorios de Bacteriología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile

- Cepas bacterianas:

Se trabajó con un cepario de 58 cepas de *Salmonella* spp aisladas por Sobarzo (2004) desde 96 reptiles en confinamiento de dos centros de la Región Metropolitana de Chile. La caracterización de las especies de reptiles analizadas se encuentra en el Anexo 1.

a) Viabilidad y pureza

A cada tubo del cepario se le realizó: siembra en placas de agar Tripticasa de Soya (TSA, Difco®) y en agar selectivo indicador Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD, Difco®), las que se incubaron por 24 horas a 37° C. Se analizó el crecimiento bacteriano en ambas placas, determinando su pureza según el tipo de colonias y seleccionando colonias sospechosas (colonia transparente con centro negro) desde el agar XLD.

b) Identificación de *Salmonella* spp.

A cada colonia sospechosa se le realizó una prueba de aglutinación con el antisuero poli A-I y Vi (Difco®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En breve:

1. A partir de un cultivo en medio no selectivo, se transfirió una asada de cultivo a una gota de solución salina estéril al 0,85% en un portaobjetos limpio.
2. Homogenizar, esperar 1 minuto y luego observar para determinar si se ha producido aglutinación.
3. Si ocurre la aglutinación (autoaglutinación), el cultivo es rugoso y no se podrá analizar. Si no ocurre ningún tipo de aglutinación, realizar el análisis del organismo agregando una gota del suero polivalente A-I-Vi, esperar un minuto y observar si hay reacción de aglutinación.

Complementariamente, a todas las colonias sospechosas, se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas: desaminación de la fenilalanina, crecimiento en agar Citrato de

Simmons, determinación de la producción de indol y fermentación de glucosa, lactosa y producción de H₂S en agar hierro de Kligler (KIA, BBL®). Una vez sembrado los medios diferenciales, se incubaron a 37° C por 24 horas. Las reacciones esperables para *Salmonella* son: indol negativo, fenilalanina negativo, citrato positiva y en agar hierro kligler se puede ver presencia de H₂S, presencia de gas por fermentación de la glucosa y ausencia de fermentación de la lactosa (Caffer y Terragno, 2001).

c) Confirmación genómica de *Salmonella* spp.

Como método confirmatorio de género bacteriano se realizó la detección del gen *invA* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de cada cepa (Skyberg *et al.*, 2006). Los partidores y el protocolo de PCR que se utilizó para la amplificación de este gen se detallan en las tablas 1 y 2.

- PCR para detección de genes asociados a virulencia, incluyendo el gen *invA*:

a) Obtención del ADN bacteriano

Para la extracción del ADN, se realizó un protocolo por ebullición, el cual consistió en recolectar 5 colonias de *Salmonella* y suspenderlas en 400µl de agua libre de nucleasas en un tubo Eppendorf (2 mL), posteriormente se incubaron en un baño termorregulado (Menmert®), por 15 minutos a 100° C, para luego centrifugar en una centrífuga (microspin 245 (Sorvall®)), por 5 minutos a 12.000 rpm y se extrajo el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf. El tubo con el ADN extraído, se almacenó a temperatura de congelación (-18°C), hasta su uso.

b) Mezcla de reacción de PCR

Se utilizó PCR Master Mix 2X (Thermo scientific®), el cual incluye la enzima *Taq* DNA polimerasa (0,05 U/µL), los desoxinucleótidostrifosfatos(dNTPs) (0,4mM), el buffer de reacción y MgCl₂ (0,4mM). En un tubo Eppendorf se depositaron 15 µL de Master Mix (2X), 5 µL de cada uno de los partidores (1µmol) (Tabla 1) y 5 µL de la muestra del ADN extraído.

c) Amplificación del ADN

Se utilizó un termociclador Apollo, modelo ATC201 (Instruments®, CLP, USA) y el protocolo de amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito para cada gen a detectar según Skyberg *et al.* (2006) y Bhowmick *et al.* (2011) (Tabla 2). Como control positivo se utilizó la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028S, ya que contiene los cinco genes a detectar (incluido el gen *invA*) y como control negativo la cepa *E. coli* ATCC 25922.

d) Visualización de los productos del PCR.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Bioline®) en buffer Tris acetato EDTA (Fermentas®) a 90 V por 90 minutos. Para ello, 6 µL de producto de PCR se mezclaron con 2 µL de un producto comercial de carga (6X Mass Ruler Loading Dye Solution, Fermentas®). Se utilizó un marcador de peso molecular (Invitrogen®) que contiene fragmentos de ADN entre 50 y 1000 pb.

Luego, el gel se incubó en Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) (Sigma®) por 40 minutos. Posteriormente, las bandas obtenidas se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminador UVP®) y fotografiaron digitalmente.

Tabla 1: Partidores y tamaño de amplicón esperado para cada gen seleccionado.

Gen	Partidor	Referencia
<i>invA</i>	F*: CTGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCTCTATT R*: AGTTTCTCCCCCTTTCATGCGTTACCC	Skyberg <i>et al.</i> , 2006
<i>ssaB</i>	F: ATGTCTGAGGAGGGATTTCAT R: TTATACCCACCCGAATAAA	Bhowmick <i>et al.</i> , 2011
<i>spiA</i>	F: CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG R: CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	Skyberget <i>al.</i> , 2006
<i>sseG</i>	F: ATGAAACCTGTTAGCCCAA R: TTACTIONCGGCGCACGTTGTT	Bhowmick <i>et al.</i> , 2011
<i>sscB</i>	F: ATGATGATGAAAGAAGATCA R: TTAAGCAATAAGAGTATCAA	Bhowmick <i>et al.</i> , 2011

* F: forward *R: reverse *pb: pares de bases.

Tabla 2: Protocolos de PCR para la amplificación de los genes en análisis.

Gen	Desnaturación inicial	N° de Ciclos	Desnaturación	Hibridación	Elongación
<i>invA</i>	95°C 5 minutos	25	94° C 30 segundos	66,5 30 segundos	72° C 120 segundos
<i>ssaB</i>	95°C 10 minutos	45	95°C 15 segundos	60°C 45 segundos	72°C 30 segundos
<i>spiA</i>	95°C 5 minutos	25	94° C 30 segundos	66,5 30 segundos	72° C 120 segundos
<i>sseG</i>	95°C 10 minutos	45	95°C 15 segundos	60°C 45 segundos	72°C 30 segundos
<i>sscB</i>	95°C 10 minutos	45	95°C 15 segundos	60°C 45 segundos	72°C 30 segundos

- Análisis de datos:

Los resultados se presentaron en forma descriptiva como porcentaje de genes de virulencia, sin hacer relación al tipo de reptil, ya que no hay información asociada al cepario.

- Bioseguridad

Las medidas de bioseguridad utilizadas, correspondieron al nivel 2 de bioseguridad para *Salmonella* no tíficas, según el manual de Conicyt (2008). Se utilizó delantal manga larga, mangas plásticas desechables, guantes de látex y gabinete de bioseguridad para realizar el trabajo con las cepas. Los geles de agarosa incubados en Bromuro de Etidio se eliminaron por incineración, ya que corresponde a una sustancia mutagénica, irritante a los ojos, piel y mucosas. Como medida de bioseguridad para utilizar el transiluminador de luz UV, se utilizó una placa de acrílico y gafas con filtro UV

RESULTADOS

- **Cepas bacterianas:**

Viabilidad y pureza:

De las 58 cepas pertenecientes al cepario de Sobarzo (2004), sólo fueron viables 34 de ellas.

- **Identificación de *Salmonella* spp.:**

Aglutinación:

Se observó que de las 34 cepas viables, catorce (41%) de ellas aglutinaron con el antisuero poli A-I-Vi (Anexo 2).

Batería bioquímica:

De las 34 cepas, veintisiete (79%) de ellas tuvieron una batería bioquímica típica y siete (22%) de ellas fueron atípicas (Anexo 2). Cuatro de ellas fueron indol positivo, dos citrato negativos y una cepa fermentadora de la lactosa. Esta última se corroboró mediante un tubo Durham Lactosa.

- **Confirmación genómica de *Salmonella* spp.:**

El gen *invA* fue detectado en las 34 cepas (100%), cabe señalar que 11 cepas sospechosas de ser *Salmonella* spp., fueron negativos a este gen, además de no aglutinar con el suero polivalente y tener una bioquímica no del todo concordante, se eliminaron por no asegurar ser *Salmonella* (Figura 7).

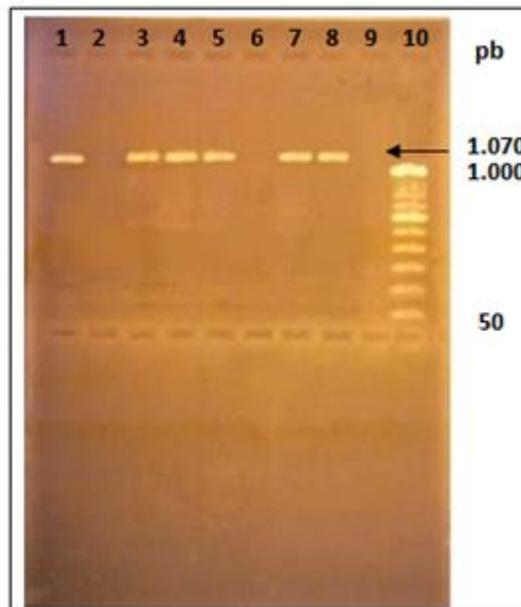


Figura 7. Visualización de los amplificadores del gen *invA* (1.070 pb*) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio. Carril 1: control positivo (*S. Typhimurium* ATCC 14028S); carril 2: control negativo (*E. coli* ATCC 25922); carril 3: cepa 3; carril 4: cepa 5; carril 5: cepa 6; carril 6: sin carga; carril 7: cepa 11; carril 8: cepa 12; carril 9: control de reactivo (agua libre de nucleasa); carril 10: Marcador de tamaño molecular (50-1.000 pb); * pb: pares de bases.

- **Detección de genes asociados a virulencia en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.**

a) Detección del gen *spiA*.

Se logró amplificar el fragmento buscado para el gen *spiA* en trece de las 34 muestras procesadas (35%), mientras que en diecinueve de ellas (65%) no se detectó (Tabla 3). Las bandas obtenidas se ubicaron entre los 500 y 600 pb, siendo estas bandas nítidas y de un grosor considerable (Figura 8).

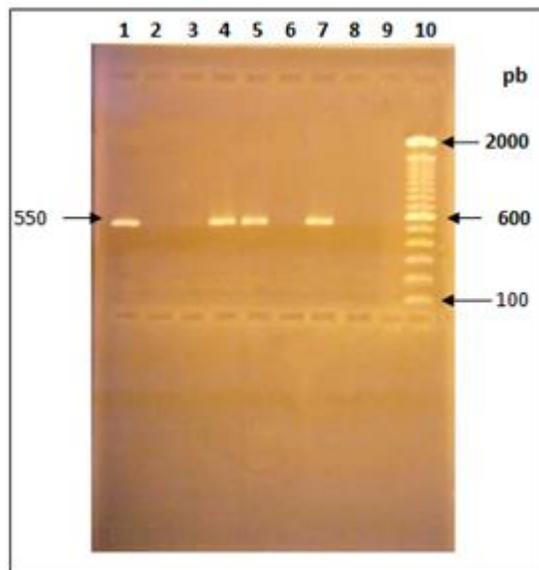


Figura 8. Visualización de los amplificadores del gen *spiA* (550 pb*) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio. Carril 1: control positivo (*S. Typhimurium* ATCC 14028S); carril 2: control negativo (*E. coli* ATCC 25922); carril 3: cepa 3; carril 4: cepa 5; carril 5: cepa 6; carril 6: cepa 9; carril 7: cepa 10; carril 8: cepa 11; carril 9: control de reactivo (agua libre de nucleasa); carril 10: Marcador de tamaño molecular (100-2.000 pb); * pb: pares de bases

b) Detección del gen *sseG*.

El gen *sseG* fue detectado en veintinueve (91%) de las 34 muestras procesadas, mientras que solo tres de ellas (9%) no se observó un amplificado (Tabla 3). Las bandas obtenidas se ubicaron entre los 600 y 700 pb, con una clara inclinación hacia los 700 pb, ya que el producto amplificado es de un tamaño de los 690 pb (Figura 9).

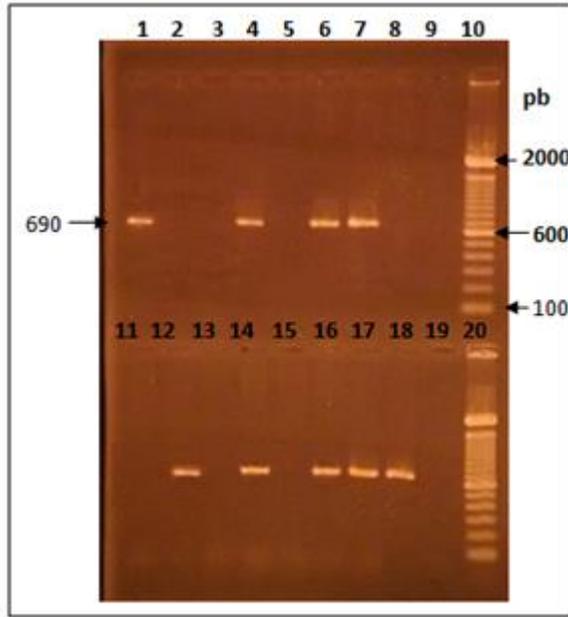


Figura 9. Visualización de los amplificadores del gen *sseG* (690 pb*) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio. Carril 1: control positivo (*S. Typhimurium* ATCC 14028S); carril 2: control negativo (*E. coli* ATCC 25922); carril 3: cepa 3; carril 4: cepa 5; carril 5: cepa 6; carril 6: cepa 9; carril 7: cepa 10; carril 8: cepa 11; carril 9: cepa 12; carril 10: marcador de tamaño molecular (100-2.000 pb); carril 11: cepa 13; carril 12: cepa 14; carril 13: cepa 15; carril 14: cepa 18; carril 15: cepa 19; carril 16: cepa 20; carril 17: cepa 21; carril 18: cepa 22; carril 19: control de reactivo (agua libre de nucleasa); carril 20: Marcador de tamaño molecular; * pb: pares de bases.

c) Detección del gen *ssaB*.

El gen *ssaB* fue detectado en veinticuatro (71%) de las 34 muestras procesadas, mientras que diez de ellas (29%) no tuvieron un amplificado (Tabla 3). Las bandas obtenidas se ubicaron en los 400 pb (Figura 10).

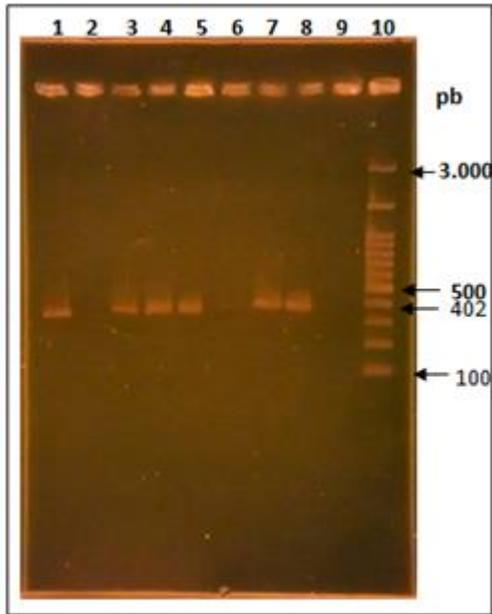


Figura 10. Visualización de los amplificadores del gen *ssaB* (402 pb) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio. Carril 1: control positivo (*S. Typhimurium* ATCC 14028S); carril 2: control negativo (*E. coli* ATCC 25922); carril 3: cepa 3; carril 4: cepa 5; carril 5: cepa 6; carril 6: cepa 9; carril 7: cepa 10; carril 8: cepa 11; carril 9: control de reactivo (agua libre de nucleasa); carril 10: Marcador de tamaño molecular (100-3.000 pb); pb: pares de bases.

d) Detección del gen *sscB*.

El gen *sscB* fue detectado en veintiuno (61%) de las 34 muestras procesadas, mientras que trece de ellas (39%) no tuvo un amplificador (Tabla 3). Las bandas obtenidas se ubicaron entre los 400 y 500 pb, ya que el amplificador para este gen es de 435 pb (Figura 11).

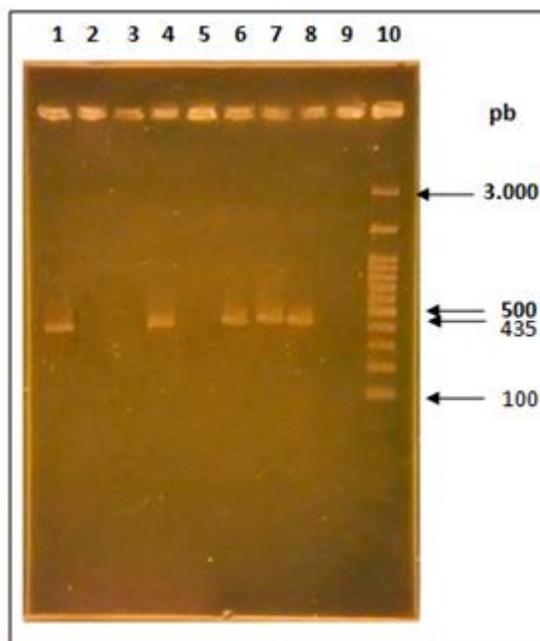


Fig. 11. Visualización de los amplificadores del gen *sscB* (435 pb*) en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio. Carril 1: control positivo (*S. Typhimurium* ATCC 14028S); carril 2: control negativo (*E. coli* ATCC 25922); carril 3: cepa 3; carril 4: cepa 5; carril 5: cepa 6; carril 6: cepa 9; carril 7: cepa 10; carril 8: cepa 11; carril 9: control de reactivo (agua libre de nucleasa); carril 10: Marcador de tamaño molecular (100-3.000 pb); * pb: pares de bases

Tabla 3: Porcentaje de detección de genes de virulencia asociados a invasividad en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio de la Región Metropolitana.

Gen	N° de cepas	Porcentaje
<i>spiA</i>	13	38
<i>sseG</i>	29	85
<i>ssaB</i>	24	71
<i>sscB</i>	21	62

Todas las cepas presentaron al menos uno de los genes en estudio. El porcentaje y frecuencia del perfil de genes detectado por cepa se resume en la Tabla 4.

Tabla 4: Perfiles, frecuencia y porcentaje de genes de virulencia detectados en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.

Perfiles	N° de cepas.	Porcentaje
<i>spiA; ssab.; sseG; sscB</i>	5	15
<i>spiA; sscB; sseG</i>	3	9
<i>sscB; sseG; ssab</i>	12	35
<i>spiA; sscB</i>	1	3
<i>spiA; sseG</i>	4	12
<i>sseG; ssab</i>	4	12
<i>sseG; sscB</i>	1	3
<i>ssab</i>	2	6
<i>sseG</i>	2	6

DISCUSIÓN

Aunque todos los serotipos de *S. enterica* son actualmente considerados patógenos para humanos, la distribución de genes de virulencia en la mayoría de los serotipos es controversial, encontrando presencia de algunos genes particulares en determinados serotipos (Figueira y Holden, 2012). Es por ello que de las 16 SPI descritas en *Salmonella*, SPI-1, SPI-2 y SPI-4 son consideradas conservadas en todos los serotipos, mientras que otras SPI son específicas para determinados serotipos (Figueira y Holden, 2012).

Está descrito que los serotipos de *Salmonella* presentan cierta asociación de genes de virulencia pertenecientes a SPI-2. Por el ejemplo, en el serotipo Weltevreden casi el 100% de sus aislados presenta el gen *sseC* (Bhowmick *et al*, 2011).

Una de las causas de la ausencia de un gen perteneciente a SPI-2 en *Salmonella* se podría explicar porque el serotipo no presenta el gen en forma constitutiva o bien por lo ha perdido por delección natural (mutación) (Figueira y Holden, 2012).

En este contexto parece interesante haber realizado una serotipificación de estas cepas, para encontrar diferencias respecto a lo descrito para cada serotipo y lo que se encontró en el estudio.

En la identificación serológica de *Salmonella* spp., mediante aglutinación, cabe recordar que el antisuero utilizado es el polivalente A-I-Vi, el cual aglutina a 19 serogrupos (A, B, C1, C2, C3, C4, D1, D2, D3, E1, E2, E3 E4, F, G1, G2, H, I y Vi) los cuales albergan a los serotipos que se aíslan principalmente en humanos como son *S. Enteritidis* y *S. Typimurium* (Grimont y Weill, 2007). Sin embargo son más de 50 los serogrupos que posee *Salmonella* (Grimont y Weill, 2007), lo más probable respecto de las 20 cepas que no aglutinaron el suero polivalente A-I y Vi, es que pertenezcan a otros serogrupos.

En la caracterización bioquímica parcial, el 21% de las cepas fueron atípicas, las cuales tuvieron variaciones en tres pruebas, que fueron la producción de indol, crecimiento en agar citrato y fermentación de la lactosa. En el “Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*” de Caffer y Terragno (2001), se informó que hay variaciones en la fermentación de la lactosa dependiendo de la subespecie de *Salmonella* que se trate. Por ejemplo, en *S. enterica* subesp. *arizonae* y *S. enterica* subesp. *diarizonae*, se observa un 75% de cepas fermentadoras de la lactosa. Otro estudio (Inungaray *et al.*,

2013), identificaron fenotípicamente cepas de *Salmonella* spp aisladas desde carne molida y encontraron variaciones en las mismas pruebas bioquímicas aplicadas en este estudio (producción de indol, crecimiento en agar citrato y fermentación de la lactosa.). Así, encontrar un 21% de cepas atípicas respecto de la caracterización bioquímica no resultaría un hallazgo, más bien es un resultado esperable.

La caracterización molecular realizada involucró la utilización de la técnica de PCR tanto para la pertenencia al género *Salmonella* de las cepas mediante la detección del gen *invA*, (específico del género *Salmonella*) como también la detección de otros cuatro genes asociados a virulencia de esta bacteria.

En este estudio se encontró un 100% de detección del gen *invA*, en las cepas que se confirmaron que fueron *Salmonella*, habiendo 11 cepas negativas a *invA* que no se confirmaron que fuesen esta bacteria. Esta misma determinación en cepas de *Salmonella* aisladas desde aves acuáticas silvestres (Krawiec *et al.*, 2015) encontró un 99,6% de positividad del gen y por otro lado Skyberg y colaboradores (2006) detectaron un 100% al mismo gen en *Salmonella* aisladas desde aves de corral. Por lo tanto, la incorporación de este gen o su utilización en esta memoria de título constituiría una elección acertada

Utilizando la misma metodología, el gen *spiA*, cuya función es evitar la unión de los lisosomas a las vacuolas contenedoras de *Salmonella*, fue detectado en el 35% de las cepas analizadas. Esto difiere bastante en lo que respecta a otros estudios realizados en diferentes especies animales. Por ejemplo, en aves de corral se detectó un 100% de positividad (Skyberg *et al.*, 2006), en cerdos se encontró un 96% (Tamang *et al.*, 2014) y en aves acuáticas un 94% (Krawiec *et al.*, 2015) Este resultado podría indicar que estas cepas de *Salmonella* aisladas desde reptiles podrían utilizar otros genes para sobrevivir al interior de macrófagos como son el *spiB* y *spiC* (Marcus *et al.*, 2000), de lo contrario estas cepas podrían ser incapaces de sobrevivir al interior de macrófagos y generar un cuadro invasivo, haciéndolas menos virulentas.

Otro de los genes estudiados, el gen *ssaB*, fue detectado en el 71% de las cepas, valor que no difiere mucho al obtenido por Bhowmick y colaboradores (2011), donde encontraron un 100% de positividad en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde productos hidrobiológicos. El gen *ssaB* es fundamental para *Salmonella*: puede activar el SST3 y de esta manera sobrevivir al interior de las células. Klein y Jones (2001), realizaron mutaciones en este gen

de virulencia y compararon dosis letal 50 (DL50) entre cepas con y sin la mutación ($3,6 \times 10^6$ versus $1,0 \times 10^2$ unidades formadoras de colonias) concluyendo que este aumento en la DL50 asociado a la mutación del gen era importante para la infección de *Salmonella*. Este hecho podría significar en el presente estudio, que el 29% de las cepas en que no se detectó este gen serían menos virulentas, necesitando mayor dosis para lograr producir la enfermedad en una población animal.

El gen *sseG* se encontró en el 91% de las muestras, lo cual es concordante con la literatura consultada. Así, Bhowmick y colaboradores (2011), detectaron el gen *sseG* en un 96% de las cepas aisladas en muestras provenientes de productos hidrobiológicos al analizar genes de virulencia pertenecientes a SPI-2 de *Salmonella*. Adicionalmente, Núñez-Hernández y colaboradores (2014), realizaron mutaciones de diversos genes de virulencia en cepas de *Salmonella* Typhimurium, concluyendo que los genes *sseG* y *sseF* eran necesarios para la sobrevivencia de *Salmonella* al interior de las vacuolas, mientras que los genes *sifA* y *sifB* no lo eran. Cabe señalar que hay otro gen que realiza la misma función que *sseG*, el gen *sseF*, el cual codifica para la proteína efectora SeeF, cuya función es movilizar las VCS hacia la región perinuclear y cercano al aparato de Golgi, lo cual podría explicar el 9% de nula detección (Figueira y Holden, 2012).

Finalmente, el gen *sscB* cuya función es codificar para una proteína chaperona SscB de la proteína SseF (semejante a SseG), la cual facilita su secreción y función se detectó en el 62% las cepas. Los resultados del presente estudio difieren a lo encontrado en la literatura, pues Bhowmick y colaboradores (2011), analizaron la presencia del gen *sscB* en *Salmonella* spp. aisladas desde productos hidrobiológicos, encontrando un 100% de positividad en las cepas. Sin embargo, el 38% de las cepas en que no se detectó el gen, podría ser amortiguado por el gen *sseG*, ya que 21 de las cepas presentaron ambos genes, 9 de ellas presentaron al menos uno de los dos genes (principalmente *sseG*) y solo 4 cepas no presentaban ninguno de ellos, pudiendo de esta manera movilizar las VCS a la región perinuclear de las células.

En relación a este último punto, y considerando que en los estudios que se muta el gen *sscB*, se observa una disminución significativa en la sobrevivencia de *Salmonella* al interior de las VCS, siendo estas cepas menos virulentas en comparación con las que poseen el gen

(Dai y Daoguo, 2004) se podría sugerir que el 38% de cepas en que no se detectó el gen podrían poseer un mecanismo alternativo o simplemente son menos virulentas.

No abundan los estudios que analizan genes de virulencia en cepas de *Salmonella* aisladas desde reptiles. Sin embargo, Pasmán y colaboradores (2005), analizaron la presencia de cinco genes de virulencia (*agfA*, *shdA*, *spvR*, *pefA* y *sopE*) mediante PCR en 44 cepas de *Salmonella* aisladas desde lagartos y se compararon con cepas provenientes de aislados clínicos humanos (*S. Enteritidis* y *S. Amsterdam*). Al analizar el grado de invasión en células Caco-2, los resultados indicaron una mayor capacidad de invasividad en los serotipos provenientes de lagartos respecto de los pertenecientes a humanos. El gen *agfA* fue detectado en todas las cepas; el gen *pefA* fue detectado solo en un serotipo de reptil y en todos los serotipos de *S. Enteritidis* humanos; el gen *spvR* fue detectado en todas las cepas del serotipo *Enteritidis* y en el 33% de las cepas de la subespecie IV; el gen *shdA* fue detectado en todas las cepas provenientes de humanos y en el 86% de las subespecies I. Finalmente, el gen *sopE* se encontró en el 17% de las cepas provenientes de humanos, en el 24% de las cepas de lagartos pertenecientes a la subespecies I y en todas las cepas de la subespecies IV. La conclusión posible es que los lagartos pueden ser reservorios de *Salmonella* que infecte a humanos y que estas cepas podrían generar un cuadro clínico en las personas.

Los estudios realizados por Sobarzo (2004) y Toledo (2009) demuestran el riesgo inminente en Chile de contraer SAR al demostrar un alto aislamiento de *Salmonella* en reptiles con serogrupos que afectan a humanos. Siendo más alarmante aun, la desinformación que existe entre las personas y la falta de políticas públicas del país, para prevenir y educar a la población respecto de esta enfermedad.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten concluir que la mayoría de las cepas de *Salmonella* aisladas desde reptiles en cautiverio presentan los genes *ssaB*, *sseG* y *sscB*, lo que podría sugerir su potencialidad de generar un cuadro invasivo tanto en animales como en el ser humano. Este es el primer estudio donde se realiza una caracterización genómica en cepas de *Salmonella* aisladas desde reptiles en cautiverio en el país y es uno de los pocos estudios a nivel mundial, aportando así una valiosa información sobre los mecanismos de patogenicidad y la posibilidad de generar un cuadro invasivo en personas.

BIBLIOGRAFÍA

BHOWMICK, P.; DEVEGOWDA, D.; RUWANDEEPIKA, D.; KARUNASAGAR, I. 2011. Presence of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes in seafood-associated *Salmonella* serovars and the role of the *sseC* gene in survival of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in epithelial cells. *Microbiol.* 157: 160–168.

BRAUN, S.; SPALLONI, W.; FERRECCIO, F.; POSTIGO, J.; FERNÁNDEZ, A.; PORTE, L.; SALDIVIA, A.; WIGANT, W.; TRIANTAFILO, V. 2015. Gastroenteritis por *Salmonella* spp. en tres lactantes asociada a contacto con tortugas acuáticas. *Rev Chilena infectol*; 32 (3): 334-338.

CÁRDENAS-PEREA, M.; CRUZ, O.; LÓPEZ, J.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M. 2014 Actores de virulencia bacteriana. [En línea] <<http://www.elementos.buap.mx/num94/htm/35.htm>> [Consultado: 17, 11, 2015].

CAFFER, M.; TERRAGNO, R. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina. Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriología. Servicio de Enterobacterias.

CFSPH. THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. 2013. Salmonelosis asociada a los reptiles. [En línea] <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/salmonellosis_asociada_a_los_reptiles.pdf> [consultado: 25, 04, 2015].

CHAMPOUX, J. 2005. Sherris microbiología médica: una introducción a las enfermedades infecciosas. K. J. Ryan, C. G. Ray, & J. C. Sherris (Eds.). McGraw-Hill Interamericana. 776p.

CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGIA. 2008. Manual de normas de bioseguridad. [En línea] <http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2008/05/articles-28551_manual.pdf> [Consultado: 23, 03, 2015]

DAI, S.; DAOGUO, Z. 2004. Secretion and function of *Salmonella* SPI-2 effector SseF require its chaperone, SscB. *J Bacteriol*, 186: 5078-5086.

FÀBREGA, A.; VILA, J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*, 26: 308-341.

FIGUEIRA, R.; HOLDEN, D. 2012. Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiol.* 158: 1147–1161.

GARRITY, G.; BELL, J.; LILBURN, T. 2004. Taxonomic outline of the procaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., Springer-Verlag. New York, USA. 5v.

GEUE, L.; LOSCHNE, U. 2002. *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian ORIGIN. *VET MICROBIOL.* 84:79–91.

GRIMONT, P.; WEILL, F. 2007. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France.

HERRERA, B.; JABIB, R. 2015. Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. Redvet. [En línea] <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010115.html>> [consultado: 04, 02, 2015].

HERRERA-LEÓN, S.; SACO, M.; ECHEITA, A.; MARTÍNEZ, A.; USERA, M.; SILVEIRA, L. 2005. Molecular characterization of a new serovar of *Salmonella bongori* 13,22:z39:- isolated from a lizard. Microbiol. 156: 597–602.

INUNGARAY, M.; GONZÁLEZ, R.; SÁNCHEZ, B.; CRUZ, L 2013. identificación fenotípica y molecular de salmonella spp. en carne molida. Revista reciteia: 17.

ISP. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. 2012. Instituto de Salud Pública confirma primer caso de *Salmonella* serovariedad Fluntern en el país [En línea] <<http://www.ispch.cl/noticia/15685>> [Consultado: 17, 02, 2015].

KRAWIEC, M.; KUCZKOWSKI, M.; KRUSZEWICZ, A; WIELICZKO, A. (2015). Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. BMC Vet Res, 11: 15.

KLEIN, J.; JONES, B. 2001. *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. Infect Immun, 69: 737-743.

LAROCK, D.; CHAUDHARY, A.; MILLER, S. 2015. Salmonellae interactions with host processes. Nat Rev Microbiol, 13: 191-205.

LLOYD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ANDERSSON, S.; WOLF-WATZ, H. 2002. Molecular characterization of the type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. Mol Microbiol 43: 51-59.

MARCUS, S.; BRUMELL, J.; PFEIFER, C.; FINLAY, B. 2000. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect, 2: 145-156

MEYER, P.; RELLY, C.; HUG, M.; WITTENBRINK, M.; BERGER, M. 2013. Risk Factors for Invasive Reptile-Associated Salmonellosis in Children. VBZD.13:419–21.

MURPHY, D.; OSHIN F. 2014. Reptile-associated salmonellosis in children aged under 5 years in South West England. Arch Dis Child. 100: 364-5

NAKADAI, A.; KUROKI, T.; KATO, Y.; SUZUKI, R.; YAMAI, S.; YAGINUMA, C.; SHOPTANI, R.; YAMANOUCHI, A.; HAYASHIDANI, H. 2004. Prevalence of *Salmonella* spp. in Pet Reptiles in Japan. Vet. Med, Sci. 67:97-101.

NÚÑEZ-HERNÁNDEZ, C.; ALONSO, A.; PUCCIARELLI, M.; CASADESÚS, J.; GARCÍA-DEL PORTILLO, F. 2014. Dormant intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium discriminates among *Salmonella* pathogenicity island 2 effectors to persist inside fibroblasts. Infect Immun, 82(1), 221-232.

SAG. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 2010. Estudio retrospectivo de presencia de *Salmonella* spp. en reptiles ingresados a Chile a través de la Estación Cuarentenaria Pecuaria, 1997 – 2008. [En línea] <http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_12_II_semestre_2010/PDF_articulos/estudio_salmonella_lab.pdf> [Consultado: 17, 02, 2015].

SPANÒ, S.; GALÁN, J. 2012. A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella* typhi host restriction. *Science*, 338: 960-963.

PASMANS, F.; WYBO, I.; MARTEL, A.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R.; BOYEN, F.; HEYNDRICKX, M.; HAESBROUCK, F.;VANDEKERCHOVE, D.; MARC COLLARD, J. 2005. Characterization of *Salmonella* isolates from captive lizards. *Vet Microbiol*, 110: 285–291.

SOBARZO, G. 2004. Detección y sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. de reptiles y aves exóticas en cautiverio. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 48 p.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 17: 14-56.

SKYBERG, J.; LOGUE, C.; NOLAN, L. 2006. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. *Avian Dis.* 50:77-81.

TAMANG, M.; GURUNG, M.; NAM, H.; MOON, D.; JANG, G.; JUNG, S.; LIM, S. 2014. Antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from healthy and diseased pigs in Korea. *Journal of Food Protection.* 9:1481-1486.

TOLEDO, F. 2009. Detección de *Salmonella* spp. en tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) en la ciudad de Valdivia. Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Médico Veterinario. Valdivia. Chile. U. Austral de Chile, Fac. Ciencias Veterinarias. 36 p.

VARGAS, G. 2013. Zoonosis en el hogar. *Rev Chilena Infectol*, 30: 689.

WIKSTRÖM, V.; FERNSTRÖM, L.; MELIN, L.; BOQVIST, S. 2014. *Salmonella* isolated from individual reptiles and environmental samples from terraria in private households in Sweden. *Acta VetScand*, 56:1-7.

ANEXOS

Anexo 1: Reptiles en cautiverio de la Región Metropolitana positivos a *Salmonella* spp. según especie animal (Sobarzo, 2004).

ESPECIE ANIMAL	NÚMERO DE ANIMALES	POSITIVOS
Orden Testudines		
<i>Trachemys scripta</i>	7	1
<i>Geochelone chilensis</i>	4	1
<i>Geochelone denticulata</i>	3	2
<i>Chelus fimbriatus</i>	1	0
<i>Platemys platicephala</i>	2	2
<i>Chelydra serpentina</i>	5	3
Total (%)	22 (100%)	9 (40,9%)
Orden Squamata		
Sub Orden Sauria		
<i>Tiliqua scincoides</i>	1	0
<i>Varanus exanthematicus</i>	2	2
<i>Pogona vitticeps</i>	1	1
<i>Tupinambis merinae</i>	4	4
<i>Tupinambis rufescens</i>	6	6
<i>Tupinambis teguixin</i>	2	1
<i>Iguana iguana</i>	22	18
<i>Callopistes palluma</i>	3	0
<i>Callopistes spp.</i>	2	0
Total (%)	43 (100%)	32 (74,4%)
Sub Orden Ophidia		
<i>Philodryas baroni</i>	5	3
<i>Philodryas chamisoni</i>	2	0
<i>Philodryas chilena</i>	1	0
<i>Phyton molurus</i>	1	1
<i>Philodryas trilineatus</i>	3	0
<i>Phyton regius</i>	2	2
<i>Boa occidentalis</i>	3	2
<i>Boa constrictor</i>	5	5
<i>Epicrates Cenchria</i>	1	0
<i>Hydrodynastes gigas</i>	3	3
<i>Elaphe obsoleta</i>	2	0
<i>Lampropeltis getula</i>	2	1
Total (%)	30 (100%)	17 (54,8%)
Orden Crocodylia		
<i>Caiman crocodylus</i>	1	0
Total (%)	1 (100%)	0 (0%)

Anexo 2: Resultados de cada cepa, para aglutinación y batería bioquímica.

Cepa	Aglutinación	Indol	kliger	Fenilalanina	Citrato
3	+	-	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
5	-	-	H_2S , G+	-	+
6	-	-	H_2S , L-, G+, CO_2	-	+
9	+	-	H_2S , CO_2	-	+
10	-	-	H_2S , G+	-	+
11	-	-	H_2S , G+, L-	-	+
12	-	+	H_2S , G+	-	+
13	-	+	H_2S , G+	-	+
14	-	-	H_2S ,	-	+
15	+	-	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
16	+	+	H_2S , G+, L-, CO_2	-	-
18	+	+	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
19	+	-	H_2S , CO_2	-	+
20	-	-	H_2S , G+	-	+
21	-	-	H_2S , G+, L-	-	+
22	-	-	H_2S , G+, L-	-	-
23	+	-	H_2S , G+, L+, CO_2	-	+
24	+	-	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
26	+	-	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
29		-	H_2S , G+, L-	-	+
30	-	-	H_2S , G+, CO_2 , L-	-	+
31	-	-	H_2S , G+, L-	-	+
33	-	-	H_2S , G+, L-	-	+
35	-	-	H_2S , G+	-	+
36	-	-	H_2S ,	-	+
37	-	-	H_2S , G+, L-	-	+
38	+	-	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
39	+	-	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
40	-	-	H_2S , G+, L-	-	+
42	+	-	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
43	+	-	H_2S , CO_2	-	+
46	+	-	H_2S , G+, L-, CO_2	-	+
47	-	-	H_2S , G+, CO_2	-	+
48	-	-	H_2S ,	-	+

H_2S : ácido sulfhídrico, G+: fermentación de glucosa, L -: no fermentación de lactosa, CO_2 : presencia de gas.

Anexo 3: Resultados de las 34 cepas de *Salmonella* aisladas desde reptiles, con sus genes en interés.

Cepa	<i>spiA</i>	<i>sseG</i>	<i>ssaB</i>	<i>sscB</i>	Cepa	<i>spiA</i>	<i>sseG</i>	<i>ssaB</i>	<i>sscB</i>
3	+	-	+	-	24	-	+	-	+
5	+	+	+	+	26	-	+	+	+
6	+	+	-	-	29	-	+	-	-
9	-	-	+	-	30	-	+	+	+
10	+	+	-	+	31	-	+	+	-
11	-	+	+	+	33	+	+	-	+
12	-	+	+	+	35	-	+	+	-
13	-	-	+	-	36	-	+	+	+
14	-	+	+	+	37	+	+	-	-
15	-	+	+	+	38	+	+	+	+
16	-	+	+	+	39	-	+	-	-
18	+	+	+	+	40	-	+	+	+
19	-	+	+	-	42	-	+	+	-
20	+	+	-	+	43	+	+	-	-
21	-	+	+	+	46	-	+	+	+
22	+	+	+	+	47	+	+	-	-
23	+	+	+	+	48	-	+	+	+