



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

**PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A LA
INVASIÓN DE ENTEROCITOS EN CEPAS DE *Salmonella* spp.
AISLADAS DE REPTILES EN CAUTIVERIO EN LA REGIÓN
METROPOLITANA**

Javier Esteban Masías Castro

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

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO

SANTIAGO, CHILE
2015



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

**PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A LA
INVASIÓN DE ENTEROCITOS EN CEPAS DE *Salmonella* spp.
AISLADAS DE REPTILES EN CAUTIVERIO EN LA REGIÓN
METROPOLITANA**

Javier Esteban Masías Castro

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

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO

PROFESOR CORRECTOR: CARLOS NAVARRO VENEGAS

PROFESOR CORRECTOR: CRISTOBAL BRICEÑO URZÚA

SANTIAGO, CHILE
2015

ÍNDICE DE CAPITULOS	Página
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVO ESPECÍFICO	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Cepas bacterianas	11
Prueba de aglutinación	11
Propiedades bioquímicas	11
Identificación genómica	11
Detección de genes asociados a invasión	12
Normas de bioseguridad	13
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIÓN	24
BIBLIOGRAFÍA	25
ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS		Página
Tabla 1	Partidores específicos para los genes <i>invA</i> , <i>orgA</i> , <i>sopB</i> , <i>sipB</i> , <i>hilA</i> y <i>sopE</i> y tamaño del amplificado.	13
Tabla 2	Protocolos de PCR para los genes <i>invA</i> , <i>orgA</i> , <i>sopB</i> , <i>sipB</i> , <i>hilA</i> y <i>sopE</i> .	14
Tabla 3	Perfiles genotípicos de virulencia detectados en cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.	15
Tabla 4	Resultados de detección de genes de virulencia en cepas de <i>Salmonella</i> asiladas de reptiles en cautiverio	30

ÍNDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1	Estructura del inyectosoma.	5
Figura 2	Cambios inducidos por <i>Salmonella</i> en la célula hospedadora.	7
Figura 3	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen <i>sopB</i> , de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile.	16
Figura 4	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen <i>orgA</i> , de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile.	16
Figura 5	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen <i>hilA</i> , de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile.	17
Figura 6	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen <i>sipB</i> , de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile.	17
Figura 7	Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen <i>sopE</i> , de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile.	18

RESUMEN

Salmonella spp., es un agente bacteriano patógeno que -a través de diferentes rutas de transmisión- causa gran variedad de cuadros clínicos en animales y humanos, incluyendo cuadros gastroentéricos e invasivos. Si bien la transmisión por consumo de alimentos contaminados es la vía más frecuente, aquella que ocurre mediante el contacto directo o indirecto con animales es hoy una realidad. Un ejemplo de lo anteriormente mencionado lo constituyen los reptiles -una de las especies exóticas que cada vez ganan más popularidad- pues es común encontrarlos como animales de compañía y a pesar de ser reconocidos como reservorios de *Salmonella*, esta tendencia sigue en aumento, acompañándose de un mayor número de casos de salmonelosis humanas asociadas a estos animales, confirmándose al menos en Chile cuatro casos en menores de edad, desde el año 2012 al 2015.

En consideración a lo mencionado precedentemente, el objetivo de esta Memoria de título fue detectar genes de virulencia asociados a invasión en cepas de *Salmonella* spp, ubicados en la isla de patogenicidad uno y cinco, en muestras aisladas de reptiles mantenidos en cautiverio en la Región Metropolitana de Chile. Así, se utilizó un cepario de treinta y cuatro cepas de *Salmonella* spp. Los genes *invA* e *hilA* fueron detectados en el 100% de las cepas, mientras que los genes *orgA*, *sopE*, *sopB* y *sipB* fueron detectados en el 47%, 23%, 85% y 97% de las cepas respectivamente, siendo resultados similares a lo observado en cepas de *Salmonella* aisladas de aves, huevos, cerdos, muestras ambientales, aislados de humanos y alimentos, entre otros. Llama la atención el bajo porcentaje de cepas que presentaron el gen *orgA*, situación que podría ser explicada debido a que -en reptiles- *Salmonella* se limita a una infección intestinal intraluminal. En este estudio se pudo concluir que al estar presentes algunos de los genes que codifican factores de virulencia asociados a la migración transepitelial, estas cepas representarían un potencial riesgo para la comunidad.

Palabras Clave: *Salmonella*, reptiles, virulencia, islas de patogenicidad.

ABSTRACT

Salmonella spp., is a pathogenic bacterial agent that –through different routes of transmission- causes a variety of gastroenteric and invasive manifestations. Although transmission by means of contaminated food is the most frequent route, transmission by direct or indirect contact with animals is now a reality. Reptiles, an exotic species increasing in popularity, represent an example of the above mentioned. It is common to find these animals as pets despite having been recognized as reservoirs for *Salmonella*. This tendency continues to grow, bringing with it a greater number of human salmonellosis associated with the reptile, confirming at least four cases in minors in Chile, from 2012 to 2015.

Taking into consideration the above, the objective of this thesis was to detect six virulence genes associated with invasion in strains located on the pathogenic islands one and five in *Salmonella* spp., isolated from reptile kept in captivity in the Metropolitan Region of Chile. To achieve this objective, a strain collection of thirty-four strains of *Salmonella* spp., was used. The genes *invA* and *hilA* were detected in 100% of the strains, while the *orgA*, *sopE*, *sopB* and *sipB* were detected in 47%, 23%, 85% and 97% of the strains accordingly; these being similar results to those observed in *Salmonella* strains isolated from birds, eggs, pigs, environmental samples and human and food samples, among others. The low percentage of strains that presented the *orgA* gene is noteworthy, a situation that could be explained by considering that *Salmonella* is limited to intraluminal intestinal infection in reptiles. In this study it was possible to conclude that, due to the presence of some genes that encode virulence factors associated with trans epithelial migration, these strains could represent a potential risk for the community.

Keywords: *Salmonella*, reptile, virulence, pathogenicity islands.

INTRODUCCIÓN

Salmonella spp., es un agente bacteriano patógeno responsable de una gran variedad de cuadros clínicos en animales y humanos, incluyendo cuadros de tipo gastroentéricos e invasivos, a través de diversas rutas de transmisión, ya sea en mamíferos, aves, peces, anfibios, insectos y reptiles.

En el caso de los reptiles, son una de las especies exóticas común de encontrar como animal de compañía, ganando cada vez más popularidad a pesar de ser reconocidos como reservorio de *Salmonella*. Junto con esto se ha observado un mayor número de casos de salmonelosis humana asociada a estos animales.

En reptiles, la especie de *Salmonella* principalmente asociada es *S. bongori*, junto con las subespecies *arizonae*, *houtanae*, *salamae* y *enterica* de la especie *S. enterica*. Los principales reptiles relacionados a casos de salmonelosis en humanos son los Ophidios (serpientes), Saurios (lagartos), Quelonios (tortugas) y Rhynchocephalios (iguanas), animales que son comúnmente mantenidos como mascotas.

La salmonelosis humana asociada a reptiles se manifiesta con diferentes cuadros, pudiendo ser exclusivamente gastrointestinal o presentándose con cuadros invasivos. Algunos autores han asociado el tipo de manifestación clínica con la exposición a distintos tipos de reptiles, aunque no se han investigado los factores de virulencia presentes en dichas cepas. En *Salmonella*, actualmente se reconoce la existencia de una organización de genes de virulencia en sectores cromosomales, denominados islas de patogenicidad (IP), donde se asocian varios factores que dan cuenta de la enfermedad gastrointestinal (IP-1) o invasiva (IP-2). Es por esto, que la identificación de los factores de virulencia en *Salmonella* spp. es importante para la caracterización del agente, más aún, frente al hecho de que en Chile existen reptiles que portan esta bacteria y que no han sido caracterizados más allá de su perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana.

En este estudio, se determinará la presencia de algunos genes de virulencia asociados a la invasión de enterocitos, en cepas de *Salmonella* aisladas de reptiles mantenidos en cautiverio en la Región Metropolitana de Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Salmonella spp., es una enterobacteria patógena, intracelular facultativa, causante de graves infecciones. Este género bacteriano se divide en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongorii*, siendo posible encontrar más de 2400 serotipos, dentro de los cuales se encuentran serotipos adaptados a un hospedador específico, como por ejemplo *S. Typhi* y *S. Gallinarum* que pueden afectar solo a humanos o a aves, respectivamente o por el contrario, se puede encontrar otros serotipos que pueden afectar a un amplio rango de hospedadores, como es el caso de *S. Enteritidis* (Álvarez *et al.*, 2013).

El tipo de enfermedad causada por estos microorganismos depende no sólo del serotipo, sino también de la especie animal y del estado inmunológico del hospedador infectado. Los individuos más susceptibles a estas infecciones son los inmunodeprimidos, embarazadas, niños y ancianos. *Salmonella* representa una causa importante de diarrea en la comunidad, manifestándose principalmente con una enterocolitis aguda, con aparición repentina de cefalea, dolor abdominal, diarrea, náuseas y a veces vómitos, evolucionando en ocasiones a septicemia o infección localizada (CFSPH, 2005; Álvarez *et al.*, 2013).

Además de esto, *Salmonella* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, aves, insectos y reptiles, causando un amplio espectro de enfermedades, como son la fiebre tifoidea o fiebre paratifoidea en humanos o la pullorosis, tifosis aviar y paratifosis aviar en aves de corral (CFSPH, 2005; Álvarez *et al.*, 2013).

En el caso de las mascotas exóticas se ha visto que también pueden presentar salmonelosis, o actuar como reservorios de este patógeno, situación común en el caso de los reptiles. Frente a esto, se ha observado que el aumento en la popularidad de los reptiles como mascota coincide con un mayor número de casos de salmonelosis humanas asociadas a éstos (Mermin *et al.*, 2004).

En un estudio retrospectivo realizado por el Servicio Agrícola Ganadero (2010), entre los años 1997-2008, se analizó la presencia de *Salmonella* spp. en reptiles importados mantenidos en cuarentena. Para esto se analizaron 6.079 reptiles, de los cuales el 70,3% fue positivo a la presencia de *Salmonella*, el 16% fue negativo y al 13,3% no se le realizó

exámenes. Como única especie se aisló *Salmonella enterica*, predominando la subespecie *enterica*, con una frecuencia de 82,6%. La incidencia en el periodo fue mayor al 50% en los reptiles importados, durante cada año de este periodo, excepto el año 2005. De los resultados obtenidos destaca la heterogeneidad de los serotipos encontrados, junto con que el 43% de estos fueron considerados como exóticos para Chile, encontrando los serotipos Adelaide, Cubana, Kiambu, Teddington y Urbana y las subespecies *arizonae*, *houtenae* y *salamae* (SAG, 2010).

En reptiles, a diferencia de lo que ocurre en aves y mamíferos, la infección se encuentra limitada al tracto intestinal. Esto se debería a un factor térmico y a uno tisular. Con respecto al factor térmico, se debe a que la relativamente baja temperatura corporal de los reptiles (30°C) inhibe la expresión de los factores de virulencia (fimbrias y antígeno Vi) de *Salmonella* que son responsables de la adhesión, invasión, multiplicación intracelular y/o evasión leucocitaria. En este sentido, algunos estudios como el realizado por Pasmans *et al.* (2003) confirman la importancia de la temperatura en la invasividad de *Salmonella* a las células intestinales. Los autores estudiaron la interacción entre *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Muenchen y explantes intestinales de la tortuga *Trachemys scripta* a 30 y 37°C, observando que la baja temperatura de las tortugas promueve la adhesión de *Salmonella* al mucus, mientras que la temperatura alta promueve la invasividad.

El factor tisular se relaciona con el hecho de que los reptiles no poseen tejido linfoide organizado en nódulos o folículos asociados a la mucosa intestinal, como sí ocurre en mamíferos con las placas de Peyer, y en aves con la bursa de Fabricio; estas organizaciones linfoides favorecen el ingreso de los patógenos, particularmente de *Salmonella*, debido a la fagocitosis realizada por células especializadas ubicadas en estos sitios, limitando de esta forma la infección al tracto gastrointestinal (Álvarez *et al.*, 2013).

La diseminación de *Salmonella* en los reptiles, es intermitente y se asocia a factores estresantes como la cautividad, el transporte, cambio de dietas y ambiente, los que permiten la multiplicación de la bacteria a tal nivel que es detectable por métodos bacteriológicos tradicionales. Por otra parte, los animales que no están sometidos a estos factores albergan *Salmonella* en cantidades pequeñas que dificultan su aislamiento y por esta razón es difícil

asegurar que un reptil esté libre de este enteropatógeno, aumentando el riesgo de contraer esta infección y producir un cuadro ya sea de tipo gastrointestinal o invasivo (CDC, 2008).

En relación a los casos de salmonelosis humana asociada a reptiles, se puede ver que existen ciertas diferencias entre los cuadros que se pueden presentar. En un estudio realizado por Meyer *et al.* (2013) se analizaron 182 casos humanos de salmonelosis asociada a reptiles, notificados entre 1965 y el 2012 en Suiza. El 85% presentó signología exclusivamente gastrointestinal mientras que, el 15% restante presentó salmonelosis invasiva, observándose además, que los casos de salmonelosis por exposición principalmente a tortugas presentaban signología gastrointestinal, mientras que la exposición a iguanas se mostraba más prevalente con cuadros invasivos. En este estudio no se investigaron los factores de virulencia presentes entre cepas aisladas. La diferencia de cuadros clínicos asociados a cepas aisladas de distintas especies de reptiles, supone que existirían distintos factores de virulencia que permitirían el desarrollo de un cuadro gastrointestinal y/o invasivo.

Por otro lado, Murphy y Oshin (2014), analizaron los casos de salmonelosis en niños menores de cinco años en el sudeste de Inglaterra. En este estudio se observó que el 27% de los casos se asociaba a exposición previa con reptiles, con mayor grado de hospitalización en pacientes menores de un año, que presentaban cuadros invasivos, sin embargo, no se tiene información sobre el tipo de reptil asociado a estos cuadros ni tampoco sobre el fenotipo de virulencia de las cepas en cuestión.

En el caso de Chile, durante el año 2012 el Instituto de Salud Pública detecta *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Fluntern, desde un aislamiento clínico de una menor de seis meses de edad, confirmándose así como el primer caso positivo de este serotipo, el cual se asocia principalmente a reptiles, y es capaz de afectar a humanos pero no a otros animales necesariamente (ISP, 2012). En esta notificación no existe información sobre el tipo de reptil involucrado, ni tampoco si la menor tuvo o no contacto directo con el animal, ni el tipo de cuadro clínico que presentó. Posteriormente Braun *et al.* (2015), informan tres casos de salmonelosis asociada a reptiles en el Hospital Militar de Santiago de Chile. Estos casos se relacionaron a contacto previo con *Trachemys scripta elegans* (tortuga de oreja roja), mantenidas como mascotas en los hogares. Los menores afectados

tenían cuatro meses, once meses y un menor de un año y tres meses de edad. Dentro de los síntomas que presentaron los menores destacan la diarrea líquida con hematoquecia de un día de evolución, vómitos, fiebre y deshidratación; en dos de estos casos hubo familiares afectados con signología de un cuadro gastrointestinal. Dentro de los serotipos aislados se encontró *S. Montevideo*, *S. Newport* y *S. Pomona*. En solo una de las tortugas no fue posible detectar *Salmonella* por medio de coprocultivo, mientras que en los otros dos casos si fue posible, encontrando un 100% de nexo genético entre los aislados provenientes de los menores y sus mascotas.

Estos cuadros clínicos producidos por *Salmonella*, inician con la ingestión del patógeno, variando en la cantidad de inóculo necesario para desarrollar la enfermedad, la forma de contraer la bacteria (directo o indirecto) y el tipo de alimento asociado a su consumo. Factores propios de la bacteria y el estado fisiológico del hospedero, pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad (Álvarez *et al.*, 2013).

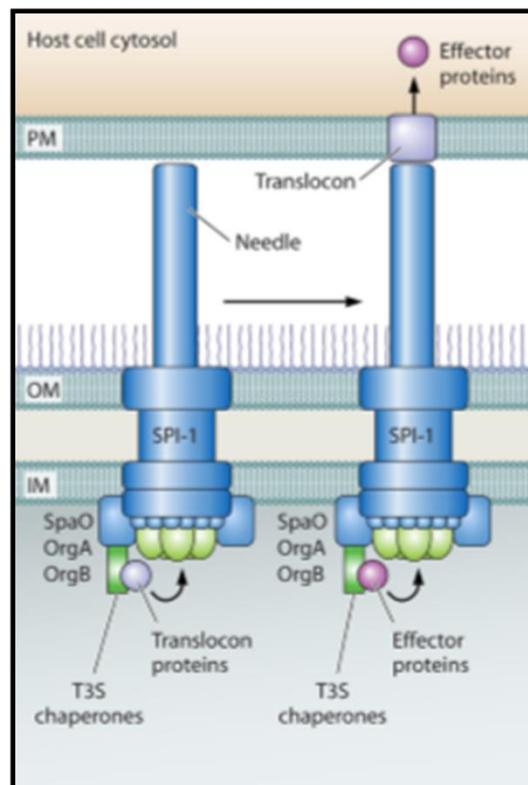


Figura 1 Estructura del inyectosoma (Büttner, 2012).

Al ser ingerida, *Salmonella* se multiplica en el intestino delgado, en aparente competición con la flora normal. En este nivel la bacteria tendrá diferentes formas de ingresar a nivel sistémico, una vía es a través de la captura luminal realizada por células dendríticas, las cuales envían proyecciones citoplasmáticas a través de los enterocitos y de esta forma serían capaces de capturar patógenos a nivel del lumen intestinal. Otra vía es a través de endocitosis realizada por células especializadas M que se encuentran recubriendo las placas de Peyer. En el caso de las células no fagocíticas (enterocitos), es necesario que la bacteria presente un sistema que induzca su propia fagocitosis, desarrollando así una migración transepitelial. Para ello, *Salmonella* utiliza el mecanismo “Trigger”, el cual presenta un sistema de secreción tipo 3 (SST3), el que sólo se expresa si el pH y la osmolaridad del medio son adecuadas. El SST3 forma una verdadera aguja (Figura 1), cuyos componentes estructurales son codificados por al menos 29 genes ubicados en la isla de patogenicidad uno de *Salmonella* (IP-1), regulando su expresión a través del activador transcripcional *hilA*.

Dentro de los componentes estructurales de este sistema de secreción, destaca el gen *orgA*, quien codifica para una proteína estructural encargada de servir de anclaje para la proteína translocadora (complejo formado por las proteínas SipB y SipC) que permitirá la unión y penetración en la membrana citoplasmática del enterocito. De igual forma, este complejo servirá de anclaje para proteínas efectoras, las cuales cumplirán diversas funciones que llevarán a la formación de proyecciones citoplasmáticas en el enterocito, y por medio de estas se logrará la internalización de la bacteria.

El gen *hilA* es un activador transcripcional codificado en la IP-1 y se autorregula de forma negativa. Este regulador desempeña un papel central y, de hecho, una delección del gen *hilA* es equivalente a la delección completa de la IP-1, además de esto actúa como un activador transcripcional del operón IP-4 y del gen *sopB* (ubicado en la IP-5), junto con tener un efecto represor sobre la expresión de los genes de la IP-2. Este sistema permite que proteínas bacterianas efectoras penetren en el citosol de las células intestinales, forzando la entrada del patógeno mediante la polimerización del citoesqueleto de actina en el sitio de contacto con la bacteria (Figura 2). Las proteínas SipA y SipC, contribuyen en la acumulación de filamentos de actina en el punto de contacto con la bacteria; SopE, SopE2 y

SopB son proteínas activadoras de ciertas GTPasas, que estimulan la polimerización de los filamentos de actina y llevarán a la formación de proyecciones (“ruffles”) en la membrana de la célula hospedera, que engloban e internalizan a la bacteria en una vacuola que contiene *Salmonella* (VCS).

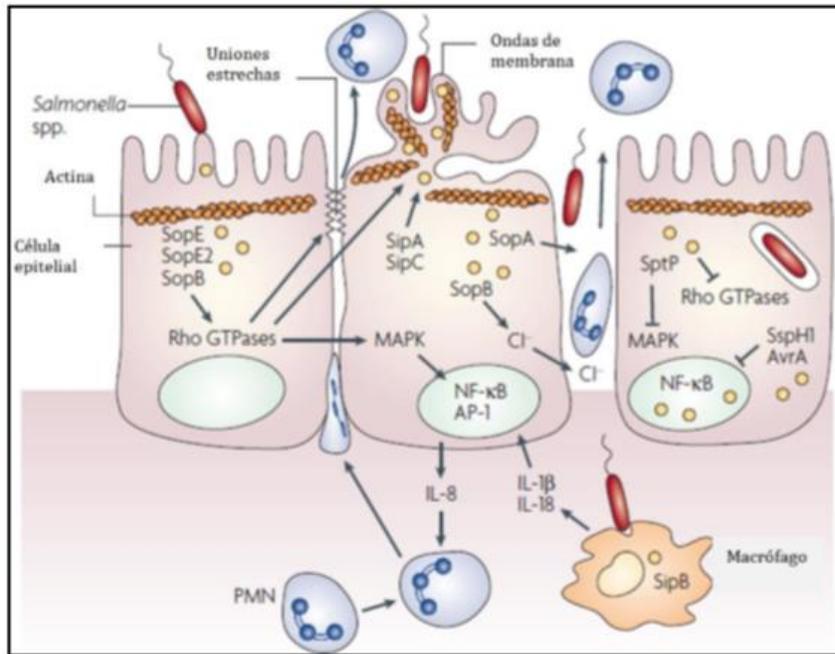


Figura 2: Cambios inducidos por *Salmonella* en la célula hospedera (modificado de Haraga *et al.*, 2008).

Una vez terminado este proceso, se inicia la despolimerización de la actina, mediada por la translocación de la proteína efectora SptP, la cual inhibe la actividad de la GTPasa, desapareciendo el “*ruffling*” de membrana. Estas proteínas efectoras, son también las encargadas de atraer polimorfonucleares, estimulando así la reacción inflamatoria, que da cuenta del cuadro gastrointestinal (Álvarez *et al.*, 2013).

Una vez que *Salmonella* se encuentra dentro de la VCS es necesario que se exprese un segundo sistema de secreción tipo tres, codificado en la isla de patogenicidad dos (IPS-2), el cual le permitirá sobrevivir y multiplicarse dentro de la VCS. Este sistema se activa, una vez que los receptores específicos de *Salmonella* reconocen que se encuentra dentro de la vacuola y permite la inyección, al citosol de la célula hospedera, de una serie de proteínas efectoras que interfieren con el tráfico vesicular, impidiendo la fusión de la VCS con los

lisosomas y la destrucción de la bacteria. Además, controlan la formación de extensiones filamentosas de su membrana, asociándola a microtúbulos y permitiéndole atraer vesículas que contienen lípidos y aminoácidos necesarios para el metabolismo de *Salmonella*, junto con componentes estructurales que permitan aumentar el tamaño de la VCS (Álvarez *et al.*, 2013). Luego de esto, si *Salmonella* logra atravesar la mucosa intestinal, alcanza los folículos linfoides mesentéricos donde se multiplica. La mayoría de las infecciones no pasan más allá de estos nódulos linfáticos locales, donde las bacterias van a ser controladas por células polimorfonucleares que llegan a esta zona, reclutadas gracias a la respuesta inflamatoria local que se produce. En algunos casos, los macrófagos permiten a la bacteria diseminarse a otros órganos del sistema reticuloendotelial, logrando la infección del hígado, el bazo y vesícula biliar, produciendo el cuadro invasivo, con ayuda de la proteína efectora SipB (codificada en la IP-1) quien activará la apoptosis de los macrófagos a través de la vía de la caspasa-1 (Álvarez *et al.*, 2013).

Para el desarrollo de la enfermedad, es necesaria la localización de la bacteria en un ambiente adecuado para su establecimiento, replicación y expresión de sus factores de virulencia (Figueroa y Verdugo, 2005). Frente a este hecho, los factores de virulencia toman gran importancia, ya que permiten la sobrevivencia del microorganismo y que causen la enfermedad, ya sea local o invasiva.

A nivel mundial son múltiples las investigaciones en que se han realizado estudios de diversidad genética utilizando estos factores de virulencia en cepas de *Salmonella*, aislados de aves, huevos, bovinos, mariscos, muestras ambientales y muestras clínicas humanas. Estos estudios han sido realizados ya sea para comparar la patogenicidad de cepas de distinto origen o para comparar sus perfiles genotípicos de virulencia, entre otras (Skyberg *et al.*, 2006; Craciunas *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010; Akiyama *et al.*, 2011; Borges *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013).

La identificación de los factores de virulencia en cepas de *Salmonella* spp., aisladas de reptiles, es importante para la caracterización del agente, más aún, frente al hecho de que en Chile existe un estudio que señala un alto nivel de portación a nivel intestinal (60,4%) en distintos tipos de reptiles (Sobarzo, 2004), sin existir estudios relacionados con factores de virulencia. Tomando en cuenta el importante reservorio de *Salmonella* spp. que los reptiles

albergan, es interesante comenzar a investigar el genotipo asociado a virulencia que presentan con el fin de aportar en la caracterización de este patógeno y tener en cuenta estos aspectos para futuros análisis epidemiológicos que los relacionen con el ser humano.

Por tal motivo, en este estudio se detectó la presencia de cinco genes de virulencia de *Salmonella* spp., asociados a la invasión de enterocitos, en cepas aisladas de reptiles mantenidos en cautiverio en la Región Metropolitana de Chile. Los genes fueron seleccionados debido a que son algunos de los más estudiados en cepas de *Salmonella*, además de su rol crítico en la invasión de enterocitos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar genes de virulencia asociados a la invasión de enterocitos en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles en cautiverio.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Detectar genes de virulencia ubicados en la isla de patogenicidad uno y cinco, asociados a la migración transepitelial, en cepas de *Salmonella* spp., aisladas de reptiles en la Región Metropolitana de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas:

Se utilizó un cepario constituido por 58 cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles mantenidos en cautiverio en la Región Metropolitana de Chile (Sobarzo,2004; Anexo 1).

Para comprobar la pureza y viabilidad del cepario, se procedió a realizar aislamiento mediante siembra en agar Trypticase de Soya (TSA, Difco®) y agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD, Difco®). Una vez comprobada la viabilidad y pureza según el aspecto de las colonias en TSA, a las colonias sospechosas obtenidas en XLD (colonias transparente con centro negro) se procedió a la identificación a través de:

- i) Prueba de aglutinación: Se utilizó un antisuero Poly A-I & Vi (Difco®), según lo indicado por el fabricante. Para ello se mezcló en un portaobjeto, una gota de suero fisiológico estéril, con una pequeña cantidad de la cepa; una vez homogeneizada se agregó una gota del antisuero y se homogeneizó por un minuto. Se dieron por positivas aquellas muestras en que se observó un puntillado (reacción de aglutinación) luego de un minuto, mientras que en las que no se observó dicha reacción, fueron dadas por negativas.
- ii) Propiedades bioquímicas: Todo el cepario fue sometido a una batería bioquímica corta que incluyó crecimiento en agar citrato (positivo para *Salmonella*), producción de indol (negativo para *Salmonella*), desaminación de fenilalanina (negativo para *Salmonella*) y metabolización de la glucosa y lactosa en medio Kligler (producción de H₂S, fermentación de glucosa y no de lactosa).
- iii) Identificación genómica: A la totalidad de las cepas se les realizó la técnica de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, sigla en inglés) para detectar el gen *invA* (Skyberg *et al.*, 2006). La extracción de ADN se realizó utilizando un protocolo de extracción por ebullición, mezclando cinco colonias en 400 µL de agua libre de nucleasas, e hirviendo durante 15 minutos a 100° C en un baño termostático (Mermet®), para luego centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm, (Centrifuga Microspin 245 (Sorvall®), y recolectar el sobrenadante. Una vez obtenido el material genético, en un tubo Eppendorf de 0,2 µL se mezclaron 15

μL de 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 MgCl_2 (0,4mM)), con 5 μL de DNA y 5 μL de cada partidor específico para *invA* (1 μmol ; Tabla 1). Para realizar el PCR se utilizó un termociclador Apollo Instruments®, modelo ATC201, programado para realizar los siguientes ciclos: cinco minutos a 95° C, luego 25 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 66,5° C y dos minutos a 72° C y una extensión final a 72° C durante 10 minutos. Como control positivo se utilizó la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028S, ya que esta cepa contiene el gen *invA* y como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922. Luego de realizar el PCR, se llevó a cabo la electroforesis (a 90 V), durante 90 minutos, en gel de agarosa (Bioline®) al 2% en buffer Tris acetato EDTA (Fermentas®), utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 3000 Pb (Invitrogen®). El gel de agarosa fue incubado en Bromuro de Etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma®) durante 40 minutos, para poder visualizar el amplificado de alrededor de 1000 pb bajo luz UV.

Detección de genes asociados a invasión:

Para detectar la presencia de los genes *hila*, *orgA*, *sopB*, *sipB* y *sopE* se realizó un PCR, siguiendo los protocolos utilizados por Craciunas *et al.*, (2010) para el gen *hila*; Skyberg *et al.* (2006) para los genes *orgA*, *sopB* y *sipB*, y Hopkins y Threlfall (2004) para el gen *sopE*. La extracción de ADN se realizó de la misma forma señalada para la detección genómica del gen *invA*. Una vez obtenido el material genético, se mezcló 15 μL de PCR Master Mix 2X (Thermo scientific®), 5 μL de DNA y 5 μL de cada partidor (1 μmol), que se detallan en la Tabla N° 1. Para realizar el PCR se utilizó un termociclador Apollo Instruments®, modelo ATC201, programado para realizar los protocolos detallados en la Tabla 2. Como control positivo se utilizó la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028S, ya que esta cepa contiene los cinco genes a detectar y como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922. Luego de realizar el PCR, se llevó a cabo la electroforesis (a 90 V), durante 90 minutos, en gel de agarosa (Bioline®) al 2% en buffer Tris acetato EDTA

(Fermentas®), utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 3000 pb (Invitrogen®). Los geles de agarosa fueron incubados en Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) (Sigma®) durante 40 minutos, visualizando los fragmentos de ADN mediante exposición a luz UV.

Normas de bioseguridad:

Para llevar a cabo el estudio, los procedimientos se realizaron bajo las normas correspondientes al nivel de bioseguridad N° 2, en el que está clasificada *Salmonella* Enteritidis, de acuerdo al Manual de Bioseguridad de Conicyt (2008). Dentro de estas medidas se encuentran el uso obligatorio de guantes, mangas, delantal y gabinete de bioseguridad para la manipulación de la bacteria. Por otra parte, todos los medios de cultivo y el instrumental fueron autoclavados en dependencias del laboratorio de bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET). Para el caso particular de la visualización de los productos de PCR, se utilizaron guantes desechables (para evitar contacto con el Bromuro de Etidio) y gafas protectoras (para proteger al operador de la luz UV). Finalmente, los geles de agarosa incubados en Bromuro de Etidio, fueron incinerados en dependencias del laboratorio de bacteriología de FAVET.

Tabla 1: Partidores específicos para los genes *invA*, *orgA*, *sopB*, *sipB*, *hilA* y *sopE* y tamaño del amplificado.

Gen	Secuencia de partidores *	Tamaño, referencia
<i>invA</i>	F5'-CTGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCTCTATT-3' R5'-AGTTTCTCCCCCTCTTCATGCGTTACCC-3'	1070 pb, Skyberg <i>et al.</i> , 2006
<i>orgA</i>	F5'-TTTTTGGCAATGCATCAGGGAAC-3' R5'-GGCGAAAGCGGGACGGTATT-3'	255 pb, Skyberg <i>et al.</i> , 2006
<i>sopB</i>	F5'-CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG-3' R5'-TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT-3'	220 pb, Skyberg <i>et al.</i> , 2006
<i>sipB</i>	F5'-GGACGCCGCCGGGAAAACTCTC-3' R5'-ACACTCCCGTCGCCGCTTCACAA-3'	875 pb, Skyberg <i>et al.</i> , 2006
<i>hilA</i>	F5'-GCGAGATTGTGAGTAAAAACACC-3' R5'-CTGCCCGGAGATATAATAATCG-3'	413 pb, Craciunas <i>et al.</i> , 2010
<i>sopE</i>	F5'-TCAGTTGGAATTGCTGTGGA-3' R5'-TCCAAAACAGGAAACCACAC-3'	642 pb, Hopkins y Threlfall, 2004

*F: forward (hacia adelante); R: reverse (inversa).

Tabla 2: Protocolos de PCR para los genes *invA*, *orgA*, *sopB*, *sipB*, *hila* y *sopE*.

Gen	Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
<i>orgA</i>	95° C por cinco minutos	25	94° C por 30 segundos	66,5° C por 30 segundos	72° C por dos minutos	72° C por 10 minutos
<i>sopB</i>	95° C por cinco minutos	25	94° C por 30 segundos	66,5° C por 30 segundos	72° C por dos minutos	72° C por 10 minutos
<i>sipB</i>	95° C por cinco minutos	25	94° C por 30 segundos	66,5° C por 30 segundos	72° C por dos minutos	72° C por 10 minutos
<i>hila</i>	94° C por cuatro minutos	30	94° C por un minuto	63° C por 1 minuto	72° C por dos minutos	72° C por 10 minutos
<i>sopE</i>	95° C por 10 minutos	45	95° C por 10 segundos	64° C por 5 segundos	72° C por 30 segundos	-----

RESULTADOS

Del cepario de 58 cepas de *Salmonella* spp. aisladas de reptiles en cautiverio en la Región Metropolitana, por Sobarzo (2004), se obtuvieron 34 cepas viables.

El 41% de las cepas aglutinaron al antisero poly A-I & Vi (Difco®). El relación a la identificación bioquímica, el 78% de las cepas presentó una batería bioquímica típica de *Salmonella*, dentro del 22% restante se encontró cuatro cepas indol positivas, una cepa fermentadora de lactosa y dos cepas citrato negativo. En el caso de la identificación genómica de género se logró detectar el gen *invA* en el 100% de las cepas.

Como se desprende de la Tabla 4 (Anexo 2), el gen *sopB* se detectó en el 85% de las cepas, el gen *orgA* se detectó en el 47% de las cepas, el gen *hilA* se detectó en el 100% de las cepas, el gen *sipB* se detectó en el 97% de las cepas y el gen *sopE* se detectó en el 23% de las cepas. Detectándose en catorce cepas los cuatro genes de virulencia. En términos globales los perfiles de virulencia que se detectaron se presentan en la Tabla N° 3. En las figuras 3, 4, 5, 6 y 7 se presentan el registro fotográfico de los geles correspondientes a las electroforesis de cada gen analizado.

Tabla 3: Perfiles genotípicos de virulencia detectados en cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde reptiles en cautiverio.

Genes presentes	Número de cepas
<i>sopB, orgA, hilA, sipB, sopE</i>	2
<i>sopB, orgA, hilA, sipB</i>	11
<i>sopB, hilA, sipB, sopE</i>	6
<i>sopB, hilA, sipB</i>	9
<i>sopB, orgA, hilA</i>	1
<i>orgA, hilA, sipB</i>	2
<i>hilA, sipB</i>	3

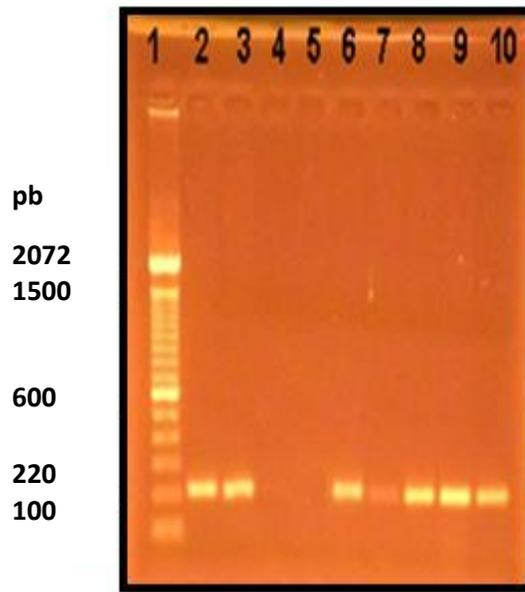


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen *sopB* (220 pb), de cepas de *Salmonella* aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2, 6, 7, 8, 9, 10: Cepas de *Salmonella* de reptil; Carril 3: Control positivo, *S. Typhimurium* ATCC 14028S; Carril 4: Control negativo, *E. coli* ATCC 25922; Carril 5: Control de reactivos, agua libre de nucleasas.

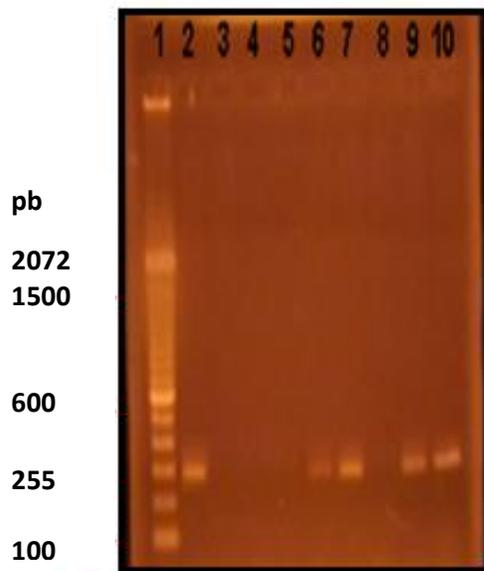


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen *orgA* (255 pb), de cepas de *Salmonella* aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Control positivo, *S. Typhimurium* ATCC 14028S; Carril 3: Control negativo, *E. coli* ATCC 25922; Carril 4: Control de reactivos, agua libre de nucleasas; Carril 5, 6, 7, 8, 9, 10: Cepas de *Salmonella* de reptil.

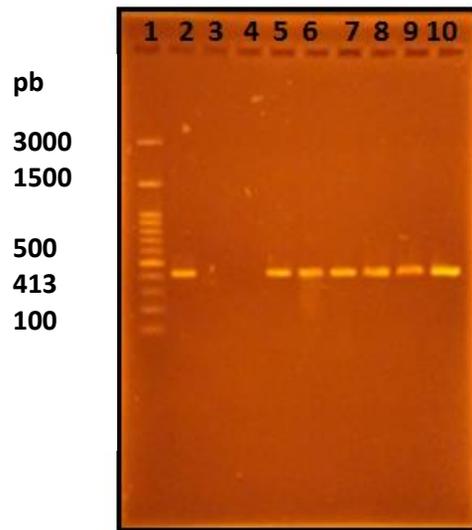


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen *hilA* (413 pb), de cepas de *Salmonella* aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Control positivo, *S. Typhimurium* ATCC 14028S; Carril 3: Control negativo, *E. coli* ATCC 25922; Carril 4: Control de reactivos, agua libre de nucleasas; Carril 5, 6, 7, 8, 9, 10: Cepas de *Salmonella* de reptil.

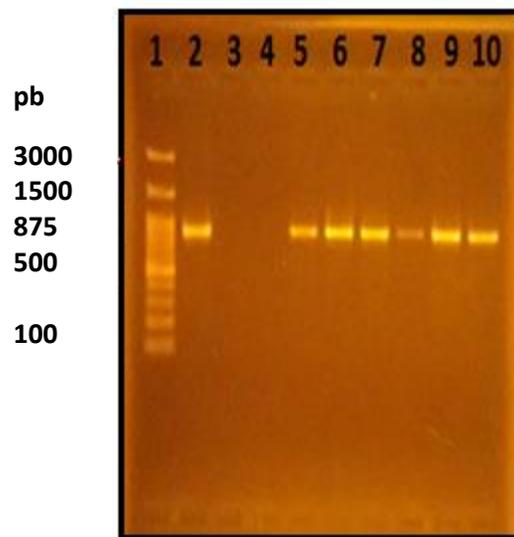


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen *sipB* (875 pb), de cepas de *Salmonella* aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Control positivo, *S. Typhimurium* ATCC 14028S; Carril 3: Control negativo, *E. coli* ATCC 25922; Carril 4: Control de reactivos, agua libre de nucleasas; Carril 5, 6, 7, 8, 9, 10: Cepas de *Salmonella* de reptil.

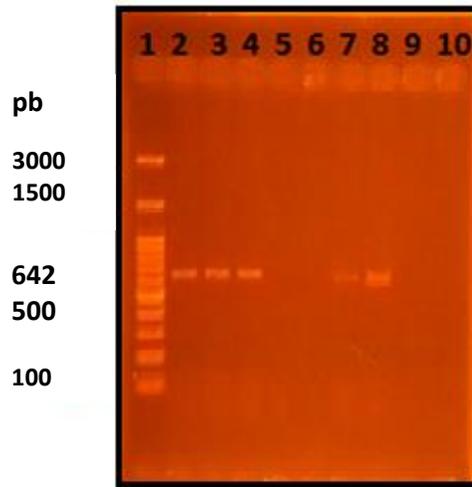


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del gen *sopE* (642 pb), de cepas de *Salmonella* aisladas de reptiles en cautiverio en la región Metropolitana de Chile. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2, 3, 4, 5, 6, 7: Cepas de *Salmonella* de reptil; Carril 8: Control positivo, *S. Typhimurium* ATCC 14028S; Carril 9: Control negativo, *E. coli* ATCC 25922; Carril 10: Control de reactivos, agua libre de nucleasas

DISCUSIÓN

La salmonelosis asociada a reptiles (SAR) es uno de los problemas más grandes que debe enfrentar la Salud Pública hoy, debido a la creciente popularidad de los reptiles como mascotas en los hogares. Junto a esto, el desconocimiento por parte de la población sobre el riesgo que implica el mal manejo de estos animales y el peligro de contraer alguna enfermedad zoonótica como es la salmonelosis, vislumbra la necesidad de educar a la comunidad sobre estos temas y lograr disminuir la probabilidad de contraer un cuadro de tipo gastroentérico o invasivo.

El grupo etáreo más preocupante lo constituyen los niños, debido probablemente a su cercanía y manipulación de estos animales, principalmente tortugas de agua. Estas pueden ser obtenidas en el mercado y al ser de pequeño tamaño su manejo se facilita. Frente a esto, destaca la medida tomada por la FDA en 1975, donde se prohibió todos los envíos interestatales de tortugas domésticas con caparzones inferiores a 4 pulgadas (10 cm) de longitud, previniendo con ello casi 100.000 casos de salmonelosis al año en niños de 1 a 9 años de edad (CDC, 2013).

En el contexto nacional, se debe considerar la modificación a la Resolución 7562 exenta del año 2014, que disminuye el periodo de cuarentena de 21 a 5 días en reptiles importados a Chile, lo que implicaría un mayor número de animales posiblemente infectados, sin ser detectados, debido a su diseminación intermitente (SAG, 2014). Esta medida podría representar un retroceso en las medidas de prevención de enfermedades zoonóticas que existen en el país, considerando que el estudio retrospectivo realizado durante los años 1997 y 2008 logró identificar que de los 6.079 especímenes de la clase Reptilia que ingresaron al país, el 70,3% era positivo a *Salmonella*, además de detectar serotipos exóticos como son Adelaide, Kiambu Cubana, Urbana y Teddington. Por lo que esta medida podría significar un aumento en el número de casos de salmonelosis humana asociada a reptiles, como ya se ha visto, que de los cuatro casos publicados en Chile, tres fueron publicados el año 2015

En relación a los resultados obtenidos en esta Memoria de Título, se observó que casi el 50% de las cepas aglutinó ante la exposición al antisuero poly A-I & Vi (Difco®), el cual contiene los serotipos y serogrupos más prevalentes para el hombre, lo que indicaría el

potencial riesgo de contraer salmonelosis. El resto de las cepas se asume que pertenecerían al resto de los serogrupos conocidos para este género.

Además, un bajo número de cepas presentó una batería bioquímica atípica, situación que no descartó la identidad de la cepa ya que se ha informado de algunas cepas de *Salmonella* spp. que no coinciden con todo el perfil bioquímico esperado. Al respecto estas características bioquímicas atípicas ya han sido descritas previamente por otros autores, como Leyva *et al.*, (1998), quienes identificaron *Salmonella* lactosa positiva aisladas desde camarones congelados, o Flores (2003), quien aisló *Salmonella* citrato negativo desde agua de mar. En el caso particular de cepas aisladas desde reptiles, es escasa la información publicada, sin embargo ya en el año 1989, Wuthe *et al.*, aislaron *Salmonella* lactosa positiva y *Salmonella* indol positivo desde serpientes.

En la identificación genómica de género se logró detectar el gen *invA* en el 100% de las cepas, lo cual coincide con lo obtenido por diversos autores, en aislados de *Salmonella*, provenientes de diversos orígenes, como aves de corral, lechones, mariscos, muestras ambientales, aislados clínicos humanos y alimentos (Skyberg *et al.*, 2006; Akiyama *et al.*, 2011; Dione *et al.*, 2011; Hur *et al.*, 2011). En este estudio, este gen fue seleccionado debido a que es un marcador específico para el género, alcanzando una especificidad del 100% y una sensibilidad analítica de 10^3 UFC en cepas puras, mediante el protocolo de Skyberg., *et al* (2006).

En términos globales se detectaron siete perfiles genotípicos de virulencia, donde sólo dos cepas presentaron los cinco genes buscados en este estudio. El 50% de las cepas presentó solo cuatro genes de virulencia, destacando que los genes *orgA* y *sopE* se detectaron en menor porcentaje con respecto a los demás genes. Cabe destacar que las proteínas efectoras codificadas por ambos genes, cumplen un rol esencial en la patogenia de *Salmonella*, siendo cruciales para llevar a cabo la migración transepitelial. Este hecho puede ser debido a que en reptiles la infección se limita al tracto gastrointestinal, y al ser las bacterias organismos muy eficientes metabólicamente, pueden ser capaces de escindir genes o segmentos de su genoma que no son requeridos para su supervivencia.

El gen *sopB*, que codifica una proteína efectora con función en la formación de “*ruffles*” de membrana, capaces de inducir la internalización de *Salmonella* en células no fagocíticas,

fue detectado en la mayoría de las cepas (85%, Tabla 4). Estos resultados son concordantes con los resultados obtenidos por diversos autores, quienes detectaron el gen en un alto porcentaje de cepas provenientes de diversos orígenes, como Skyberg *et al.*, 2006, quienes detectaron el gen en el 99% de cepas provenientes de aves de corral, Dione *et al.*, 2011, en el 94,1% de cepas provenientes de aislados clínicos humanos y alimentos, Hur *et al.*, 2011, en el 96% de cepas aisladas desde lechones con diarrea y Krawiec *et al.*, 2015, en el 94% de cepas aisladas desde aves silvestres.

Cabe mencionar que existen proteínas efectoras con función homóloga a la realizada por la proteína SopB, como son las proteínas SopE y SopE2, por lo que en teoría, las cepas que no presenten el gen *sopB*, no verían afectada su capacidad invasiva, siempre y cuando sean capaces de expresar las proteínas efectoras SopE y SopE2. Así lo señalan algunos estudios en que se ha analizado la capacidad invasiva de *Salmonella* en cepas en que se ha mutado el gen *sopB*, como es el caso de Reis *et al.*, 2003, quienes analizaron la capacidad invasiva en un modelo animal bovino, logrando evidenciar que las cepas mantenían la misma capacidad invasiva que las cepas que no presentaban mutación en el gen *sopB*. Resultado similar obtuvieron Hapfelmeier *et al.*, 2004, en un modelo de ratón, logrando apreciar que la capacidad invasiva de *Salmonella* se mantenía.

La baja detección del gen *orgA* (47%, Tabla 4) difiere de los resultados obtenidos por otros autores, quienes lograron detectar el gen en el 100% de cepas aisladas desde aves de corral, huevos, mariscos, muestras ambientales y aislados clínicos humanos (Skyberg *et al.*, 2006; Akiyama *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2013). Al no existir proteínas con función homóloga a la realizada por la proteína OrgA, hace suponer que las cepas que no presentan este gen sí verían disminuida su capacidad invasiva. Esto fue demostrado por Penheiter *et al.*, (1997), con la cepa *S. Typhimurium orgA :: Tn5lacZY* (gen *orgA* mutado). En este estudio, se observó que las cepas eran no invasivas y disminuía su virulencia en ratones. De una forma similar, Klein *et al.*, (2000), estudiaron la invasividad de cepas de *Salmonella* con el gen *orgA* mutado en células HEp-2, observando que la invasión se reducía en 100 veces comparado con la cepa salvaje de *S. Typhimurium* SL1344.

Los resultados obtenidos en este estudio con respecto al gen *hilA* (100%, Tabla 4), coinciden con los resultados obtenidos por otros autores, quienes lograron detectar el gen

hilA en el 100% de cepas de *Salmonella* aisladas de diversos orígenes, como aves de corral y de aislados clínicos humanos (Sánchez *et al.*, 2010; Craciunas *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2013). Cabe mencionar que al ser un activador transcripcional de la IP uno de *Salmonella*, una delección del gen sería equivalente a la delección completa de la isla, afectando el desarrollo del proceso infeccioso global. Esta situación fue evidenciada en los estudios de Madadi *et al.* (2014) y Shuang *et al.* (2015), quienes observaron disminución de la invasión de *S. Enteritidis*, con el gen *hilA* mutado, en aves de corral y en células Caco-2 respectivamente

En el caso del gen *sipB*, que tiene relación directa en la inducción de la migración transepitelial, sin embargo la forma específica en que realiza esto no es conocida, se ha descrito que podría ser parte de un complejo formado entre las proteínas SipB y SipC, el cual actuaría como proteína translocadora, permitiendo de esta forma, inyectar proteínas efectoras directamente al interior del citosol de la célula atacada. Una función conocida es la activación de la apoptosis en macrófagos, a través de la activación de la vía de la caspasa-1. En este estudio se logró detectar el gen *sipB* en casi la totalidad de las cepas (97%, Tabla 4), similar a lo obtenido por Skyberg *et al.* (2006), en muestras provenientes de aves y Akiyama *et al.* (2011), en muestras provenientes de alimentos, muestras ambientales y clínicas humanas. Las cepas que no presenten el gen *sipB* o que no sean capaces de formar el complejo entre SipB y SipC, serán defectuosas en el proceso de ingreso a las células, disminuyendo con ello la virulencia de las cepas, como lo demostró Sebenzile *et al.* (2013).

El bajo porcentaje de cepas *sopE* positivas (23%, Tabla 4) es similar a lo obtenido por otros autores, como Dione *et al.* (2011), quienes detectaron el gen en el 33% de cepas de *Salmonella* no tifoideas, aisladas desde menores de edad, animales y productos alimenticios, sin embargo existe diferencia con lo observado por Elemfareji y Thong (2013), donde el gen logró ser detectado en el 98% de cepas de *Salmonella* no tifoideas y en el 100% de cepas de *Salmonella* tifoideas provenientes de distintas regiones geográficas. En el caso particular de los reptiles, se encuentra el trabajo realizado por Pasmans *et al.* (2005), en el que se comparó los perfiles genotípicos de virulencia de cepas de *Salmonella* aisladas desde humanos y lagartos de vida silvestre, encontrando que el 17% de las cepas

aisladas desde humanos presentaba el gen *sopE*, mientras que en el caso de las cepas aisladas desde los reptiles se logró detectar el gen en el 24% de las cepas, valor muy cercano a lo obtenido en este estudio. En las cepas que no presentan el gen *sopE* se podría inferir que serían cepas menos virulentas, y también que generarían cuadros clínicos con diarreas de menor intensidad en comparación a cepas que si presentan el gen, según lo observado por Zhang *et al.* (2002).

Aunque estos genes son ampliamente estudiados en animales de producción y seres humanos, son escasos los estudios realizados en animales exóticos, por lo que resulta interesante caracterizarlos pudiendo con ello obtener resultados de gran utilidad para futuras investigaciones epidemiológicas y clínicas. Cabe destacar, que este es el primer estudio de caracterización de perfiles genéticos de virulencia, en cepas de *Salmonella* aisladas desde reptiles en cautiverio, realizado en Chile, aportando información relevante sobre las características de este género bacteriano que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza.

CONCLUSIÓN

Según los resultados obtenidos en este estudio, se puede evidenciar que las cepas de *Salmonella* aisladas de estos reptiles, presentan algunos de los genes que codifican factores de virulencia asociados a la migración transepitelial, ubicados en la isla de patogenicidad uno y cinco, siendo un potencial riesgo para la comunidad.

BIBLIOGRAFÍA

AKIYAMA, T.; KHAN, A.; CHENG, C.; STEFANOVA, R. 2011. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul isolated from imported seafood, pepper, environmental and clinical samples. *Food Microbiol.* 28(6): 1124-1138.

ÁLVAREZ, A.; BECERRO, A.; FERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ, L. 2013. *Salmonella*. Departamento de Biología Molecular. [en línea] <<http://www2.cbm.uam.es:8080/jmrequena/Tema15-Salmonella-19dic13.pdf>> [consulta: 15 Febrero 2015].

BORGES, K.; FURIAN, T.; BORSOL, A.; MORAES, H.; SALLE, C.; NASCIMENTO, V. 2013. Detection of Virulence- Associated Genes in *Salmonella* Enteritidis Isolates from Chicken in South of Brazil. *Pesq. Vet. Braz.* 33(12): 1416-1422.

BRAUN, S.; SPLONI, W.; FERRECCIO, F.; POSTIGO, J.; FERNÁNDEZ, A.; PORTE, L.; SALDIVIA, A.; WIGANTY, W.; TRIANTAFILO, V. 2015. Gastroenteritis por *Salmonella* spp. en tres lactantes asociada a contacto con tortugas acuáticas. *Rev Chilena Infectol.* 32(3): 334-348.

BÜTTNER, D. 2012. Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(2): 262-310.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with exposure to turtles – United States. *MMWR* 57:69-72.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Salmonelosis asociada a los reptiles. [en línea] <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/salmonellosis_asociada_a_los_reptiles.pdf> [consulta: 20 Septiembre 2015].

CFSPH. THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. 2005. Salmonellosis. Institute For International Cooperation in Animal Biologics. [en línea] <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/nontyphoidal_salmonellosis.pdf> [consulta: 15 Febrero 2015].

CONICYT. 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. [en línea] <<http://www.conicyt.cl/fondecyt/2012/09/10/manual-de-normas-de-bioseguiridad-2008/>> [consulta: 11 Enero 2015].

CRACIUNAS, C.; KEUL, A.; FLONTA, M.; CRISTEA, M. 2010. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hilA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. *J Environ Manage.* 95:15-18.

DIONE, M.; USMAN, I.; DEBASISH, S.; NUREDIN, M.; RICHARD, A.; STANNY, G.; IEVEN, M.; ANTONIO, M. 2011. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal. *J Infect Dev Ctries.* 5(11): 765-775.

- ELEMFAREJI, O.; THONG, K.** 20013. Comparative Virulotyping of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*. *Indian J Microbiol.* 53(4): 410-417
- FIGUEROA, I.; VERDUGO, A.** 2005. Molecular mechanism for pathogenicity of *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol.* 47 (1-2):25-42.
- FLORES, L.** 2003. Caracterización Fenotípica y Genotípica de Estirpes de *Salmonella* Cholerasueis Aisladas de Ambientes Marinos. [en línea] <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/flores_al/Result.pdf> [consulta: 20 Junio 2015].
- HAN, J.; GOKULAN, K.; BARNETTE, D.; KHARE, S.; ROONEY, A.; DECK, J.; NAYAK, R.; STEFANOVA, R.; HART, M.; FOLEY, S.** 2013. Evaluation of virulence and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from humans and chicken- and egg-associated sources. *Foodborne Pathog Dis.* 10(12):1008-15.
- HAPFELMEIER, S.; EHRBAR, K.; STECHER, B.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; HARDT, W.** 2004. Role of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Effector Proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* Subspecies 1 Serovar Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. *Infect Immun.* 72(2): 795–809.
- HOPKINS, K.; THRELFALL, J.** 2004. Frequency and polymorphism of *sopE* in isolates of *Salmonella enterica* belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. *J Med Microbiol.* 53:539-543.
- HUR, J.; CHOI, Y.; PARK, J.; JEON, B.; LEE, H.; KIM, A.; LEE, J.** 2011. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. *Can J Vet Res.* 75(1): 49-56.
- 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>> [consulta: 22 Enero 2015].
- KLEIN, J.; FAHLEN, T.; JONES, B.** 2000. Transcriptional Organization and Function of Invasion Genes within *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathogenicity Island 1, Including the *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*, *orgB*, and *orgC* Genes. *Infect. Immun.* 68 (6): 3368–3376
- KRAWIEC, M.; KUCZKOWSKI, M.; KRUSZEWICZ, A.; WIELICZKO, A.** 2015. Prevalence and Genetic Characteristics of *Salmonella* in free-living Birds in Poland. *BMC Vet Res.* 31; 11:15.
- LEYVA, V.; CISNEROS, E.; VALDÉS, E.; NOLOSCO, T.; PÉREZ, O.** 1998. Aislamiento de *Salmonella* Atípicas en Camarones Congelados. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 12(1): 5-11.
- MADADI, M.; MIRZAIE, S.; HASSANZADEH, M.** 2014. Comparison Study on Colonization of *hilA* Mutant and Parent Strains of *Salmonella* Enteritidis in Vertically Infected Broiler Chickens. *JMV.* 3(3-4): 1-7.

- MERMIN, J. ; HUTWAGNER, L. ; VUGIA, D. ; SHALLOW, S. ; DAILY, P. ; BENDER, J. ; KOECHLER, J. ; MARCUS, R. ; ANGULO, F.J.** 2004. Reptiles, Amphibians, and Human *Salmonella* infection: A Population-Based, Case- Control Study. Clin. Infect. Dis. 38 (Suppl. 3): 253-261.
- MEYER, P.; RELLY, C.; HUG, M.; WITTENBRINK, M.; BERGER, C.** 2013. Risk Factors for Invasive Reptile-Associated Salmonellosis in Children. Vector Borne Zoonotic Dis. 13(6):419-421.
- MURPHY, D.; OSHIN, F.** 2014. Reptile-Associated Salmonellosis in Children Aged Under 5 Years in South West England. Arch Dis Child. 100(4):364-365.
- PASMANS, F.; VAN IMMERSEEL, F.; VAN DEN BROECK, W.; BOTTREAU, E.; VELGE, P.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F.** 2003. Interactions Of *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Serovar Muenchen With Intestinal Explants Of The Turtle *Trachemys scripta scripta*. J. Comp. Path. 128: 119-126.
- PASMANS, F.; MARTEL, A.; BOYEN, F.; VANDEKERCHOVE, D.; WYBO, I.; VAN IMMERSEL, F.; HEYNDRICKX, M.; COLLARD, J.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK.** 2005. Characterization of *Salmonella* Isolates from Captive Lizards. Vet Microbiol. 110(3-4): 285-291.
- PENHEITER, K.; MATHUR, N.; GILES, D.; FAHLEN, T.; JONES, B.** 1997. Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. Mol Microbiol. 24(4):697-709.
- REIS, B.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.; BÄUMLER, A.; ADAMS, L.; SANTOS, R.** 2003. The attenuated *sopB* mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium has the same tissue distribution and host chemokine response as the wild type in bovine Peyer's patches. Vet Microbiol. 97(3-4): 269-277.
- SAG. Servicio Agrícola y Ganadero.** 2010. Estudio retrospectivo de presencia de *Salmonella* spp. en reptiles ingresados a Chile a través de la Estación Cuarentenaria Pecuaria, 1997 – 2008. BVO 12: 1-10.
- SAG. Servicio Agrícola y Ganadero.** 2014. Modifica resolución n° 54, de 1999, que fija exigencias sanitarias para la internación a Chile de reptiles. [en línea] <<http://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=1068719>> [consulta: 13 Marzo 2015].
- SÁNCHEZ, M.; CARDONA, N.; CANU, N.; UZZAU, S.; RUBINO, S.** 2010. Distribution of pathogenicity islands among Colombian isolates of *Salmonella*. J Infect Dev Ctries. 4(9): 555-559.
- SEBENZILE, K.; MYENI, L.; DAOGUO, Z.** 2013. SipB-SipC Complex Is Essential for Translocon Formation. PLoS One. 8(3): e60499.
- SHUANG, L.; WEI, S.; SHENYE, Y.; ZHAOLI, L.; XIUMEI, W.; LIPING, C.; WANJIANG, Z.; SIGUO, L.** 2015. Characteristics of invasion-reduced *hilA* gene mutant of *Salmonella* Enteritidis in vitro and in vivo. Res Vet Sci. 101: 63-68.

SKYBERG, J.; LOGUE, C.; NOLAN, L. 2006. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. *Avian Dis.* 50(1): 77-81.

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.

WUTHE, H.; ALEKSIC, S.; LILISCHKIS, R.; RAHN, U.; KNEBEL, J. 1989. *Salmonella* in snakes of the Gran Chaco, Paraguay. Description of the "new" flagellar antigen RZ72. *Zentralbl Bakteriol.* 272(1): 65-70.

ZHANG, S., SANTOS, R.; TSOLIS, R., STENDER, S.; HARDT, W.; BÄUMLER, A.; ADAMS, G. 2002. The *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Effector Proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 Act in Concert to Induce Diarrhea in Calves. *Infect Immun.* 70(7): 3843-3855.

ANEXO 1

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

ESPECIE ANIMAL	NUMERO 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%)
TOTAL REPTILES	96 (100%)	58 (60,4%)

ANEXO 2

Tabla 4: Resultados de detección de genes de virulencia en cepas de *Salmonella* aisladas de reptiles en cautiverio.

Cepas	<i>sopB</i>	<i>orgA</i>	<i>hilA</i>	<i>sipB</i>	<i>sopE</i>	Cepas	<i>sopB</i>	<i>orgA</i>	<i>hilA</i>	<i>sipB</i>	<i>sopE</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	+	+	+	+	-