



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A ESTRÉS Y VIRULENCIA
DE LOS GENOTIPOS ST19 Y ST213 DE *Salmonella enterica***

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

M. en C. ADRIÁN GÓMEZ BALTAZAR

ASESORA:

D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

CO-ASESOR:

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO



**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Mayo de 2019

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” y en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ambos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y el D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo. Se contó con el apoyo del CONACyT mediante la beca otorgada para la realización de estudios de Doctorado (no. de registro 267287).

COMITÉ TUTORAL:

D. en C. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

D. en C. LUZ TORNER AGUILAR

D. en C. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

DEDICATORIA

*A mis padres,
por siempre mi amor y mi agradecimiento.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Soledad Vázquez Garcidueñas y al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo por brindarme la oportunidad y la confianza para realizar este proyecto, gracias por la paciencia, la disposición y por todo el apoyo en estos 4 años.

A mi comité tutorial: la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y el Dr. Joel Edmundo López Meza, gracias por haberme recibido en su laboratorio, por todo el aprendizaje, los buenos momentos y por todo su apoyo; a la Dra. Luz Torner Aguilar, gracias por todos sus consejos y aportaciones a este proyecto, por ser parte de mi formación académica en la maestría y en el doctorado.

Al Dr. Humberto Astiazarán García, gracias por haberme recibido en su laboratorio y por todas las atenciones que tuvo conmigo y con el proyecto. Al Dr. Josep Casadesús, gracias por haberme aceptado en su grupo de trabajo, fue una experiencia enriquecedora a nivel personal y académico.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios de: Genética Molecular Microbiana, M3 del CMEB, Patología experimental del CIAD y del departamento de Genética de la Universidad de Sevilla, gracias por la amistad, por el aprendizaje y por todos esos momentos que siempre recordaré con cariño.

A mi familia, por todo el amor y apoyo que me han brindado, son el pilar que me sostiene y motiva a superarme cada día.

Al CONACYT por las dos becas que me otorgó para mi manutención durante este proceso.

Different people see microorganisms from different perspectives.

To evolutionary and molecular biologists, microbes are relatives, with whom we set up correspondence.

To biotechnologists, they are workers, to be employed and, perhaps, exploited.

To environmental microbiologists, they may be merely scenery, or analogous to canaries in coal mines, but they are generally viewed as good neighbors if we have good fences.

To clinical, food, and sanitary microbiologists, and to the defense establishment, microorganisms are enemies to be tracked, contained, and killed.

And to leaders of rogue states and terrorist organizations, they are useful tools which are much easier to get through airports than are firearms and explosives.

That said, it is clear that the heterogeneity of microorganisms themselves is orders of magnitude greater than the heterogeneity of perspectives from which they are contemplated by human observers.

Howard M. Shapiro

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades de transmisión alimentaria.....	1
1.2. Género <i>Salmonella</i>	1
1.3. Epidemiología de <i>Salmonella</i>	2
1.3.1. Morbilidad y mortalidad.....	2
1.3.2. Distribución de serotipos.....	3
1.3.3. Métodos moleculares para la tipificación de <i>Salmonella</i>	4
1.3.4. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	5
1.3.5. Epidemiología de ST determinadas mediante MLST.....	7
1.4. Patogenicidad.....	8
1.5. Resistencia a estrés y su relación con la virulencia.....	11
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos específicos.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. Capítulo I: Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of <i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium...	24
5.1.1. Introducción.....	25
5.1.2. Materiales y métodos.....	26
5.1.3. Resultados.....	27
5.1.4. Discusión.....	30
5.1.5. Conclusión.....	35

5.2. Capítulo II: Crecimiento y formación de biofilm bajo diferentes sustratos de los genotipos ST19 y ST213 de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium aislados de muestras de alimentos.....	38
5.2.1. Introducción.....	39
5.2.2. Materiales y métodos.....	41
5.2.3. Resultados.....	43
5.2.4. Discusión.....	49
5.3. Capítulo III: Análisis de virulencia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de cepas ST213 de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium aisladas de alimentos.....	58
5.3.1. Introducción.....	59
5.3.2. Materiales y métodos.....	61
5.3.3. Resultados.....	65
5.3.4. Discusión.....	73
5.4. Capítulo IV: Variabilidad en respuesta a estrés de cepas de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium ST213 aisladas de alimentos.....	84
5.4.1. Introducción.....	85
5.4.2. Materiales y métodos.....	86
5.4.3. Resultados.....	90
5.4.4. Discusión.....	99
5.5. Capítulo V: El Biofilm, una comunidad gobernada por bacterias.....	108
6. DISCUSIÓN GENERAL.....	113
7. CONCLUSIÓN.....	117
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
CAPÍTULO I	
1. Bacterial strains used in this study.....	26
2. Fatty acid composition of <i>S. enterica</i> Typhimurium strains grown under different conditions.....	33
CAPÍTULO II	
CAPÍTULO III	
1. Cepas de <i>Salmonella enterica</i> usadas en este estudio.....	64
2. Análisis microbiológico (\log_{10} CFU g^{-1}) de heces y tejidos de ratas infectadas.....	71
3. Análisis histológico de íleon y ciego de animales infectados con dos genotipos distintos de <i>Salmonella enterica</i>	72
CAPÍTULO IV	
1. Datos de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> ST213 usadas en este estudio.....	90
2. Área bajo la curva (AUC) del crecimiento <i>post</i> estrés de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> ST213.....	91
3. Formación de células filamentosas en las cepas de <i>Salmonella enterica</i> ST213 después de 8 días bajo condiciones de estrés.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUCCIÓN	
1. Biología de la infección por <i>Salmonella enterica</i>	10
CAPÍTULO I	
1. Viability of genotypes of <i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium after incubation in stress conditions.....	28
2. Recovery of ST19 and ST213 <i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium genotypes after stress.....	29
3. Cell filamentation of ST19 and ST213 genotypes under stress conditions.....	30
4. Biofilm formation by <i>Salmonella enterica</i> strains under stress conditions.....	31
5. Morphotype analysis of <i>Salmonella enterica</i> strains.....	31
6. Swimming motility assessment of <i>Salmonella enterica</i> strains.....	32
7. The UFA/SFA ratio of <i>Salmonella enterica</i> under different conditions.....	33
8. Relative fold change in the <i>rpoS</i> gene expression.....	34
CAPÍTULO II	
1. Versatilidad metabólica y sensibilidad a químicos de las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	44
2. Mapa de calor del crecimiento de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en distintos sustratos y sustancias químicas.....	45
3. Formación de biofilm en caldo LB de las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	47
4. Número de sustratos donde se observó formación de biofilm por parte de las cepas de estudio.....	47
5. Mapa de calor de la formación de biofilm por parte de las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	48
6. Análisis de agrupamiento con base en los sustratos/condiciones en las que se presentó crecimiento y formación de biofilm por parte de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> analizadas.....	49
CAPÍTULO III	
1. Internalización de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en células Caco-2.....	65
2. Porcentaje de muerte celular ocasionado por las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	66

3. Concentración de citocinas pro-inflamatorias secretadas por las células Caco-2 durante el proceso de infección.....	67
4. Temperatura rectal de ratas infectadas con las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	68
5. Ganancia de peso corporal de ratas infectadas con las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	69
6. Peso húmedo de las heces de ratas infectadas con las cepas de estudio de <i>Salmonella enterica</i>	70
7. Histología de ratas sanos e infectadas con cepas de <i>Salmonella enterica</i>	73
CAPÍTULO IV	
1. Viabilidad de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> ST213 después de ser incubadas en condiciones de estrés.....	92
2. Formación de biofilm de las cepas ST213 de <i>Salmonella enterica</i> bajo condiciones de estrés.....	94
3. Actividad metabólica del biofilm formado por las cepas ST213 de <i>Salmonella enterica</i> bajo condiciones de estrés.....	94
4. Motilidad de las cepas ST213 de <i>Salmonella enterica</i>	95
5. Internalización de las cepas ST213 de <i>Salmonella enterica</i> después de ser incubadas en condiciones de estrés.....	96
6. Análisis de agrupamiento de las cepas ST213 de <i>Salmonella enterica</i> con base en las características fenotípicas evaluadas.....	98

RESUMEN

Salmonella enterica es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo y se asocia principalmente con la ingestión de alimentos contaminados. Mediante herramientas moleculares se ha logrado identificar que la Secuencia Tipo (ST) 19, es la más abundante a nivel mundial; sin embargo, en algunas zonas geográficas está siendo desplazada por otros genotipos. Por ejemplo, en África la ST313 es la más abundante, en China es la ST34 y en México la ST213. Parte del éxito en la prevalencia de este patógeno se debe a su capacidad de resistir condiciones adversas en los diferentes microambientes que forman parte de su ciclo de vida. Estas condiciones de estrés no solo impactan en su sobrevivencia y crecimiento, también se ha reportado una correlación positiva entre la resistencia a estrés y el incremento de la virulencia de ciertas cepas de *S. enterica*. Por lo anterior, en este proyecto se planteó la hipótesis de que las cepas ST213 de *S. enterica* Typhimurium son más resistentes a condiciones de estrés asociadas a la preservación de los alimentos que las cepas ST19 de *S. enterica* Typhimurium, lo que se relaciona con una mayor virulencia. ST19 mostró porcentajes de células vivas más altos que ST213 en condiciones de estrés osmótico (NaCl 685 mM) y ácido (pH 3.5) y en combinación con temperaturas de refrigeración (4°C) y ambiente (≈22°C). Ambos genotipos mostraron el mismo crecimiento a las 6 horas de recuperación después del estrés. ST213 formó biofilm y células filamentosas (FCs) bajo estrés, mientras que ST19 no lo hizo. Las células ST213 también mostraron mayor motilidad. La capacidad de ST213 para formar FCs puede explicar sus porcentajes de viabilidad más bajos en comparación con ST19, es decir, las células ST213 se dividen menos en condiciones de estrés, pero las FCs tienen la misma capacidad de recuperación que las células ST19. ST213 presentó una mayor proporción de ácidos grasos insaturados/saturados (0.5–0.6) que ST19 (0.2–0.5), lo que indica una mayor fluidez de la membrana. Los niveles de transcripción del gen *rpoS* fueron similares entre los genotipos en las condiciones experimentales empleadas, por lo que otros genes podrían estar involucrados en estas respuestas a estrés. Los análisis de utilización de sustratos evidenciaron que existen diferencias entre ST213 y ST19 en cuanto a los sustratos en los cuales podían crecer, dependiendo fuertemente de las condiciones iniciales de cultivo (con o sin estrés). Interesantemente, ST213 fue capaz de establecer biofilm en un número mayor de sustratos que dependen de las condiciones iniciales de cultivo. Esto sugiere que ambos genotipos han

optado por estrategias distintas para resistir condiciones adversas. Al evaluar la virulencia, se encontró que tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, ST213 interactúa con el hospedero, ya sea internalizando células Caco-2 y promoviendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias; así como estableciendo una infección en un modelo en ratas, provocando signos clínicos de la enfermedad y daño histológico. Cabe resaltar que en ambos modelos se observaron diferencias importantes con ST19 que tuvo una virulencia atenuada; sin embargo, también con otros aislados pertenecientes a ST213. Finalmente, se observó que estas diferencias en la virulencia de diferentes aislados de ST213, también se detectó en las respuestas de resistencia a estrés. Asimismo, se observaron diferencias en la viabilidad y crecimiento post estrés, formación de células filamentosas, formación y actividad metabólica del biofilm, motilidad y en el impacto del estrés sobre la capacidad de internalizar células Caco-2. En conclusión, la capacidad de formar biofilm, la generación de filamentos, la motilidad celular y la modificación de la membrana, así como la capacidad de interactuar con el hospedero, parecen otorgarle una ventaja de sobrevivencia y dispersión al genotipo ST213 en comparación con ST19.

Palabras clave: *Salmonella*, ST213, estrés, virulencia, biofilm, filamentación, motilidad.

ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the main etiological agents of gastrointestinal diseases worldwide and is mainly associated with the ingestion of contaminated food. Through molecular tools, it has been possible to identify that the Sequence Type (ST) 19 is the most prevalent worldwide, however, in some geographical areas it is being displaced by other genotypes. For example, in Africa ST313 is the most prevalent, in China ST34 and in Mexico ST213. Part of the success in the prevalence of this pathogen is its capacity to resist adverse conditions in the different microenvironments that are part of its life cycle. These stress conditions not only impact on their survival and growth, a positive correlation has also been reported between stress resistance and the increase in the virulence of certain strains of *S. enterica*. Therefore, in this project the hypothesis that ST213 of *S. enterica* Typhimurium is more resistant to stress associated with the food preservation conditions of than ST19 of *S. enterica* Typhimurium and this resistance is associated with greater virulence was evaluated. ST19 showed higher percentages of living cells than ST213 under conditions of osmotic stress (685 mM NaCl) and acid (pH 3.5) and in combination with refrigeration (4°C) and ambient temperatures ($\approx 22^{\circ}\text{C}$). Both genotypes showed the same recovery growth after stress. ST213 formed biofilm and filamentous cells (FCs) under stress, whereas ST19 did not. ST213 cells also showed greater motility. The ability of ST213 to form FC may explain its lower viability percentages compared to ST19, ie, ST213 cells divide less under stress conditions, but FCs have the same recovery capacity as ST19 cells. ST213 had a higher proportion of unsaturated/saturated fatty acids (0.5-0.6) than ST19 (0.2-0.5), which indicates a greater fluidity of the membrane. The transcription levels of the *rpoS* gene were similar among the genotypes under the experimental conditions used. So other genes could be involved in these stress responses. The substrate utilization analyzes showed that there were differences between ST213 and ST19 in terms of the substrates in which they could grow, depending strongly on the initial culture conditions (with or without stress). Interestingly, ST213 was able to establish biofilm on a larger number of substrates that depended on the initial culture conditions. This indicates that both genotypes have opted for different strategies to resist adverse conditions. When assessing virulence, we found that in both *in vitro* and *in vivo* models, ST213 was able to interact with the host, either internalizing Caco-2 cells and promoting the secretion of pro-inflammatory cytokines; as well as establishing an

infection in a rat model, causing clinical signs of disease and histological damage. It should be noted that in both models important differences were observed with ST19 that had an attenuated virulence, but also with other isolates belonging to ST213. Finally, we observed that these differences in the virulence of different ST213 isolates were also observed in stress resistance responses. We observed differences in viability and post-stress growth, formation of filamentous cells, formation and metabolic activity of the biofilm, motility and in the impact of stress on the ability to internalize Caco-2 cells. The ability to form biofilm, filament generation, cell motility and membrane modification, as well as the ability to interact with the host, seem to give an advantage of survival and dispersion to the ST213 genotype compared to ST19.

Keywords: *Salmonella*, ST213, stress, virulence, biofilm, filamentation, motility.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades de transmisión alimentaria

Las enfermedades de transmisión alimentaria son de relevancia en salud pública a nivel mundial, ya que representan una gran carga de morbilidad, mortalidad y costos económicos derivados de su atención. Estas pueden ser provocadas por diferentes bacterias, virus, parásitos, productos químicos y priones. En las últimas décadas, la globalización ha facilitado que los microorganismos patógenos que se transmiten a través de alimentos, se transporten rápidamente a través de las fronteras internacionales, provocando brotes en diferentes regiones con impacto en el comercio y la seguridad alimentaria (Havelaar et al., 2015). De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), tan solo en 2010, los principales patógenos de transmisión alimentaria provocaron dos mil millones de casos de enfermedad y un millón de muertes, siendo los niños menores de 5 años los más afectados (Kirk et al., 2015).

Uno de los principales patógenos asociados a alimentos contaminados en todo el mundo es la especie bacteriana *Salmonella enterica*, causando padecimientos entéricos conocidos como salmonelosis (Eng et al., 2015). *S. enterica* causa infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede ocasionar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en niños menores de 5 años, ancianos y pacientes inmunosuprimidos (Zaidi et al., 2006).

1.2. Género *Salmonella*

El género *Salmonella* está formado por bacilos Gram-negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. La longitud de este microorganismo oscila entre 2 a 5 μm y diámetros de 0.7 a 1.5 μm . Son anaerobios facultativos, no forman esporas y presentan principalmente motilidad peritrica (Fàbrega y Vila, 2013).

El género se compone de dos especies distintas que son *Salmonella bongori*, comensal de animales de sangre fría, y *Salmonella enterica*, la especie de relevancia en el presente trabajo. La especie *S. enterica* se divide en las subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), e *indica* (VI), las cuales se clasifican en más

de 2600 serotipos de acuerdo al esquema Kauffmann-White, basados en el antígeno O (somático) y en el antígeno H (flagelar). Algunos serotipos son ubicuos y generalistas, mientras que otros están específicamente adaptados a un hospedero en particular (Sabbagh et al., 2010; Sánchez-Vargas et al., 2011).

A nivel clínico, es común dividir las enfermedades causadas en el ser humano por *S. enterica* con base en los síntomas, en *Salmonella* tifoidea y *Salmonella* no tifoidea (Sánchez-Vargas et al., 2011). En el primer caso, el agente etiológico son los serotipos Typhi y Paratyphi (A, B y C), los cuales provocan fiebre tifoidea y paratifoidea con síntomas indistinguibles (dolor de cabeza y fiebres altas que pueden llegar de 38.2°C a 41.5 °C) y son patógenos específicos del ser humano (Eng et al., 2015). La salmonelosis no tifoidea es causada por el resto de serotipos de *S. enterica* subespecie *enterica*, algunos de los cuales pueden afectar a otras especies animales y cuyos síntomas puede ir desde diarrea leve hasta bacteremia con complicaciones graves (Eng et al., 2015).

1.3. Epidemiología de *Salmonella*

1.3.1. Morbilidad y mortalidad

En los países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia epidemiológica que les permiten conocer con relativa certeza la incidencia de las infecciones por *Salmonella enterica* y otros patógenos causales de diarrea, así como el impacto de cada una de éstas en la morbilidad y mortalidad de la población (Zaidi et al., 2006). Las enfermedades ocasionadas por *Salmonella* no tifoidea (NTS), son una de las principales causas de enfermedades diarreicas a nivel mundial, ya que se estima que cada año ocurren 93 millones de infecciones entéricas y 155,000 muertes por diarrea; sin embargo, estas estimaciones no incluyen las enfermedades ocasionadas por NTS invasivas (iNTS) que solo en 2010 provocaron 3.4 millones de casos de enfermedad y más de 600 mil muertes, las cuales por lo general no están asociadas a enfermedades diarreicas (Ao et al., 2015). Mientras que las enfermedades ocasionadas por *S. enterica* serotipo Typhi/Paratyphi, causan un estimado de 7.5 millones de enfermedades y 52,000 muertes por año (Arya et al., 2017).

En México, de acuerdo a datos de la Dirección General de Epidemiología, en 2017 se presentaron 12,458 nuevos casos de fiebre paratifoidea, 45,280 casos nuevos de fiebre tifoidea y 92,013 casos nuevos de otras salmonelosis. Sin embargo, en los apartados de las infecciones intestinales causadas por otros microorganismos y las mal definidas, se reportaron 5,771,681 de casos nuevos, dentro de los cuales podrían existir algunos casos provocados por distintos serotipos de *S. enterica* (http://187.191.75.115/anuario/2017/morbilidad/enfermedad/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_grupo_edad.pdf). Así, puede decirse que en México no se cuenta con estadísticas nacionales certeras de infecciones por *S. enterica*. Con frecuencia el médico de primer contacto hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia con infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las principales serovariedades de *S. enterica* en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que cada una de estas representa para la salud de los humanos (Zaidi et al., 2006).

1.3.2. Distribución de serotipos

La serotipificación de aislados clínicos y ambientales de *S. enterica* ha sido una herramienta de vigilancia epidemiológica utilizada para detectar brotes, identificar fuentes de contaminación asociada a alimentos y animales (zoonosis) y controlar las tendencias a lo largo del tiempo (Galanis et al., 2006; De Cesare, 2018). Así, diversos estudios han documentado diferencias regionales y temporales significativas en la prevalencia de serotipos de *S. enterica* a nivel global. Por ejemplo, en 1995, el número de países que informaron que *S. Enteritidis* fue el serotipo más comúnmente aislado, aumentó en las regiones de América, Mediterráneo oriental, Pacífico occidental y Europa, siendo junto con *S. Typhimurium* los dos serotipos más frecuentemente aislados con un total de 176,256 y 40,982 aislados, respectivamente (Herikstad et al., 2002). De 2001 a 2005, *S. Enteritidis* siguió siendo el serotipo más común en todo el mundo (65% de los aislados), seguido de *S. Typhimurium* (12%) y *S. Newport* (4%). En África, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* representaron el 26% y 25% de los aislados respectivamente; en Asia, Europa y América Latina/Caribe, *S. Enteritidis* fue el serotipo más frecuente (38%, 87% y 31%, respectivamente); mientras que en Norteamérica, *S. Typhimurium* fue el más abundante (29%) seguido de *S. Enteritidis*

(21%) (Sánchez-Vargas et al., 2011). En la mayoría de los casos se desconocen los factores asociados al reemplazo o cambio en la prevalencia de serotipos a nivel regional (Galanis et al., 2006; Herikstad et al., 2002; Sánchez-Vargas et al., 2011). El conocimiento sobre el cambio en la prevalencia de serotipos causantes de brotes o asociados a gastroenteritis u otras enfermedades es relevante debido a las diferencias que se presentan entre estos en relación a la severidad de los síntomas y las consecuencias de la infección (Jones et al., 2008)

En México, los serotipos más frecuente en muestras clínicas entre los años 1972 y 1999 fueron *S. Typhimurium* (20.4%) y *S. Enteritidis* (18.3%). En muestras no humanas el serotipo aislado con mayor frecuencia fue *S. Derby* (13.8%), seguido por *S. Anatum* (8.5%) (Gutiérrez-Cogco et al., 2000). Entre 2004 y 2006, estudiando una población de 300 niños que cursaban un cuadro de diarrea, se encontró que *S. enterica* estaba asociada a un 53.5% de casos, siendo los serotipos más prevalentes *S. Ohio* (28.3%), *S. Typhimurium* (16.3%), *S. Infantis* (8%), *S. Anatum* (0.6%) y *S. Newport* (0.3%) (Paniagua et al., 2007). En uno de los estudios más amplios realizados en México, en el que se incluyeron a cuatro estados con distintas características socioeconómicas (Sonora, San Luis Potosí, Michoacán y Yucatán), los serotipos más comúnmente aislados de niños con padecimientos gastrointestinales fueron *S. Typhimurium* (22.2%) y *S. Enteritidis* (14.5%), encontrándose en menor proporción también a los serotipos *S. Agona*, *S. Muenchen*, *S. Oranienburg*, *S. Anatum*, *S. Newport* y *S. Meleagridis*. En el caso de los alimentos analizados en dicho estudio, el serotipo más abundante en carne de res fue *S. Anatum* (17.7%), seguido de *S. Meleagridis* (13%) (Zaidi et al., 2008).

En el estado de Michoacán, datos generados durante los últimos 5 años por el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), y analizados en colaboración con nuestro grupo de trabajo, muestran que los serotipos más frecuentemente aislados de carne de res son *S. Typhimurium* (34.1%) y *S. Derby* (24.4%), seguidos de *S. Anatum* (9.8%), más otros 11 serotipos en menor proporción (datos no publicados).

1.3.3. Métodos moleculares para la tipificación de *Salmonella*

La serotipificación de *S. enterica* con base en el esquema Kauffmann-White se ha utilizado aproximadamente durante 70 años, y continúa utilizándose en muchos laboratorios

a nivel mundial debido a que en los sistemas de salud, particularmente de países en vías de desarrollo, se considera el estándar de tipificación epidemiológica para dicho patógeno. Sin embargo, este esquema presenta varias desventajas; es laborioso, lento, puede ser impreciso y algunas cepas no reaccionan con los antisueros debido a la pérdida de expresión de los antígenos flagelares o del antígeno O (Achtman et al., 2012; Shi et al., 2013). Por lo que, al igual que en otros patógenos de humano, se ha incrementado el interés en el desarrollo de herramientas con un enfoque genético-molecular para la tipificación de *S. enterica*.

Los métodos de tipificación molecular tienen diversas ventajas sobre los métodos tradicionales, incluyendo un mayor poder discriminatorio, una mejor estandarización y una mayor reproducibilidad. Dichos métodos se pueden clasificar en tres categorías principales: 1) métodos basados en patrones de bandas de ADN (PFGE, RFLP, PCR-RFLP, AFLP, REP-PCR, RAPD, MLVA, DGE, HRM); 2) métodos basados en secuenciación de ADN (secuenciación de genes: 16S rRNA, MLST, otros genes; secuenciación de ADN no codificante: MST; secuenciación de genomas) y 3) métodos basados en hibridación de ADN (macroarreglos y microarreglos de ADN) (Achtman et al., 2012; Li et al., 2009; Sabat et al., 2013; Shi et al., 2013; Swaminathan et al., 2001).

1.3.4. Multilocus Sequence Typing (MLST)

La capacidad de distinguir con precisión entre diferentes cepas de una misma especie bacteriana es de vital relevancia para la interpretación apropiada de los datos generados por los sistemas de vigilancia epidemiológica y para un mejor entendimiento de los procesos microevolutivos que llevan a la generación de cepas con mayor capacidad patogénica (Winfield y Groisman, 2004; Langridge et al., 2015; Branchu et al., 2018). La diversidad genética presente en las especies bacterianas patógenas de humano, ha producido una diversidad proporcional de métodos de tipificación que varían ampliamente en su reproducibilidad y poder discriminatorio (Cooper y Feil, 2004).

La tipificación de secuencias multilocus (MLST por su siglas en inglés: *Multilocus Sequence Typing*) se ha aplicado para la caracterización de los principales patógenos bacterianos de humanos, y se siguen desarrollando nuevos esquemas para taxones de microorganismos patógenos y ambientales (Turner y Feil, 2007; Almeida et al., 2010). La

tipificación mediante MLST se basa en la secuenciación de múltiples fragmentos de genes de mantenimiento. Los aislados que poseen alelos idénticos para todos los fragmentos de genes se asignan a un tipo de secuencia (ST, *Sequence Typing*) común, y los ST que comparten todos menos uno o dos alelos se agrupan en complejos clonales basados en la ST (Achtman et al., 2012).

En el caso de aislados de *S. enterica* se utiliza un esquema de siete genes de mantenimiento, seleccionados sobre la base de que están dispersos alrededor del cromosoma, están flanqueados por genes de función conocida, están altamente conservados y no están sujetos a presión selectiva. Los genes utilizados son *aroC* (corismato sintasa), *dnaN* (ADN polimerasa III subunidad beta), *hemD* (uroporfirinógeno III cosintasa), *hisD* (histidinol deshidrogenasa), *purE* (fosforibosil aminoimidazol carboxilasa), *sucA* (alfa cetoglutarat deshidrogenasa) y *thrA* (aspartocinasa homoserina deshidrogenasa) (Kidgell et al., 2002). Los números de alelos y secuencias tipo (ST) son asignadas de acuerdo a una base de datos MLST de acceso público (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). La base de datos MLST, en 2011, contaba con datos de 4,257 aislados de 554 serotipos de *S. enterica* que se asignaron a 1,092 ST. Con estos datos se han realizado análisis donde han correlacionado ST con ciertos hospederos y zonas geográficas (Achtman et al., 2012).

La propuesta de MLST como una herramienta universal de tipificación fue posible gracias a tres grandes avances: (a) un mejor conocimiento de la evolución bacteriana y de la biología de poblaciones; (b) el aumento en la disponibilidad y la disminución del costo de la secuenciación de ADN; y (c) el desarrollo en las tecnologías de la información, específicamente el desarrollo del Internet como un medio eficiente, esencialmente instantáneo y rentable de intercambio de información (Maiden, 2006).

Uno de los principales argumentos en contra del sistema MLST es que pronto será reemplazado por la secuenciación de genomas completos (WGS, por sus siglas en inglés: *Whole Genome Sequencing*), cuyo precio se está aproximando rápidamente al del MLST y provee de una diferenciación más eficiente entre cepas estrechamente relacionadas (Luo et al., 2012; Pang et al., 2013). Sin embargo, se argumenta que la tipificación mediante WGS y MLST son complementarios, y deben ser realizadas en paralelo. WGS proporcionará información esencial para el seguimiento epidemiológico e información invaluable sobre la

estructura poblacional detallada de patógenos bacterianos. Sin embargo, la evaluación de SNP's (*Single Nucleotide Polymorphisms*) y las secuencias genómicas de WGS lleva mucho más tiempo que la evaluación de secuencias de siete fragmentos de genes (Achtman et al., 2012; Bale et al., 2016).

1.3.5. Epidemiología de ST determinadas mediante MLST

El análisis mediante MLST permite agrupar la gran mayoría de ST de *Salmonella* en grupos discretos, denominados como eBG (*eBurstGroups*). Un eBG está formado por dos o más ST que están conectadas por su identidad en seis de los siete fragmentos de genes, es decir, comparten seis de los siete alelos que definen una ST. Con base en esto se han identificado un total de 138 eBG hasta el año 2011. Como se mencionó anteriormente, uno de los serotipos más abundantes a nivel mundial es Typhimurium, la mayoría de aislados de este serotipo se agrupan en el eBG1, donde la ST19 es el nodo central del eBG1 y la más abundante en número de aislados a nivel mundial (Achtman et al., 2012).

Se ha documentado la prevalencia de ciertas ST en determinadas regiones geográficas que han comenzado a desplazar o ya han desplazado a las cepas de genotipo ST19 como las de mayor prevalencia. Por ejemplo, en África se ha identificado al genotipo ST313, cuyas cepas tienen la característica de ser invasivas (*iNTS, invasive Non-typhoidal salmonellosis*) y presentar resistencia a múltiples antibióticos (Kingsley et al., 2009). El análisis de capacidades metabólicas, potencial entero-patogénico y su habilidad para sobrevivir fuera del hospedero ha mostrado que las cepas del genotipo ST313 se están adaptando a un estilo de vida restringido a hospederos humanos (Carden et al., 2015; Okoro et al., 2015; Ramachandran et al., 2017, 2016; Singletary et al., 2016; Yang et al., 2015). Interesantemente, en años recientes se ha comenzado a reportar la aparición del genotipo ST313 fuera de África, en países como Reino Unido (Ashton et al., 2017) y Brasil (Almeida et al., 2017).

Otro caso documentado de genotipos de acuerdo a ST que han desplazado al genotipo ST19 es el de Guangdong, China, en donde entre 2007 y 2011 se identificaron aislados pertenecientes a la ST34 como la más prevalente (71.1%) junto con ST19 (23.5%). De especial relevancia en salud pública asociado a dicho recambio, fue el hecho de que el

98.56% de las cepas ST34 presentó resistencia a múltiples antibióticos. De igual manera, en aislados clínicos de humanos de los años 2005 a 2011 en Hong Kong, China se encontró una mayor proporción de cepas ST34, las cuales presentaban múltiple resistencia a antibióticos (Wong et al., 2013).

En México, se detectaron por primera vez cepas del genotipo emergente ST213 en 2001, aislada tanto de muestras clínicas de humanos como de alimentos de origen animal (Wiesner et al., 2009). Las cepas de dicho genotipo se han asociado con un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (Wiesner et al., 2011). A la fecha se han secuenciado los genomas de dos cepas ST213 aisladas de humanos con infecciones sistémicas (Calva et al., 2015; Silva et al., 2015) y los ensayos en un modelo de infección en ratones mostraron que estas cepas tenían una virulencia atenuada en comparación con el genotipo ST19 (Wiesner et al., 2016). Sin embargo, hasta donde se conoce, no hay reportes que analicen las capacidades de sobrevivencia y virulencia de cepas ST213 aisladas de alimentos contaminados. Estudiar aspectos fenotípicos y genéticos de las cepas con genotipo ST213, no solo es de relevancia epidemiológica para México, ya que en años recientes se han detectado aislados pertenecientes a esta ST en países de Norte América, Europa y Asia (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>), lo que demuestra su éxito para dispersarse a otras regiones geográficas.

1.4. Patogenicidad

Como se mencionó anteriormente, las infecciones ocasionadas por *Salmonella enterica* en humanos pueden dividirse en dos grupos de enfermedades, la gastroenteritis, una infección localizada y la fiebre entérica (tifoidea), una infección sistémica grave (Sabbagh et al., 2010). En ambos casos, generalmente el patógeno se adquiere por ingestión oral de alimentos o agua contaminados y una vez en el interior del hospedero la bacteria puede sobrevivir a la acidez gástrica para posteriormente acceder al epitelio intestinal (LaRock et al., 2015).

S. enterica tiene la capacidad de invadir los enterocitos no fagocíticos del epitelio intestinal por endocitosis mediada por bacterias. Después de adherirse a la superficie apical de la célula utilizando varias adhesinas fimbriales, las bacterias rompen el borde del cepillo

epitelial e inducen plegamientos en la membrana plasmática que fagocitan a los organismos. Sin embargo, *S. enterica* muestra preferencia por ingresar a las células M, células epiteliales especializadas que toman muestras de antígenos intestinales mediante pinocitosis y las transportan a las células linfoides en las placas de Peyer subyacentes (Haraga et al., 2008).

S. enterica utiliza un sistema de secreción de tipo III (T3SS) para provocar el plegamiento de la membrana de las células epiteliales del hospedero, lo que promueve su internalización. Este sistema de secreción introduce una variedad de proteínas efectoras en la célula hospedera que promueve la internalización del patógeno. Estas proteínas interactúan directamente con los sistemas de señalización de la célula hospedera (Finlay y Brumell, 2000; El Qaidi et al., 2018). La genética que subyace a esta ingeniosa estrategia se encuentra en las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI), grupos de genes ubicados en grandes regiones del ADN cromosómico y que codifican las estructuras involucradas en el proceso de invasión (Eng et al., 2015). Se ha reportado que cinco SPI tienen una contribución importante en la patogénesis de *S. enterica*. No obstante, otros rasgos de virulencia, como el plásmido de virulencia pSLT, las adhesinas, los flagelos y las proteínas relacionadas con la formación de biofilm también contribuyen al éxito dentro del hospedero. Se han descrito varios mecanismos reguladores que sincronizan todos estos elementos para garantizar la supervivencia bacteriana. Estos mecanismos gobiernan la transición de las diferentes etapas de patogénesis y conducen a la bacteria a lograr una eficiencia máxima dentro del huésped (Fàbrega y Vila, 2013).

Además de la internalización en células epiteliales, también se ha demostrado que *S. enterica* puede romper las uniones estrechas entre la capa de células epiteliales, alterando el paso de iones, agua y células inmunes. Esto, además de la respuesta inflamatoria intestinal, contribuye a la inducción de diarrea. El hecho de que existen múltiples mecanismos para cruzar la barrera intestinal indica la importancia de esta estrategia para el estilo de vida de *S. enterica* (Haraga et al., 2008; LaRock et al., 2015).

Después de atravesar la capa epitelial, el patógeno puede persistir dentro de una vacuola. Si bien, tradicionalmente se ha clasificado a *S. enterica* como un patógeno vacuolar, se ha reportado que una proporción sustancial de la población bacteriana total puede vivir libremente en el citosol de las células epiteliales. Además, puede colonizar diversos tipos de

células en un hospedero infectado, como células epiteliales, fibroblastos, macrófagos y células dendríticas. Trabajos recientes indican que el estilo de vida intracelular de *Salmonella* puede diferir considerablemente entre los distintos tipos de células (Knodler, 2015).

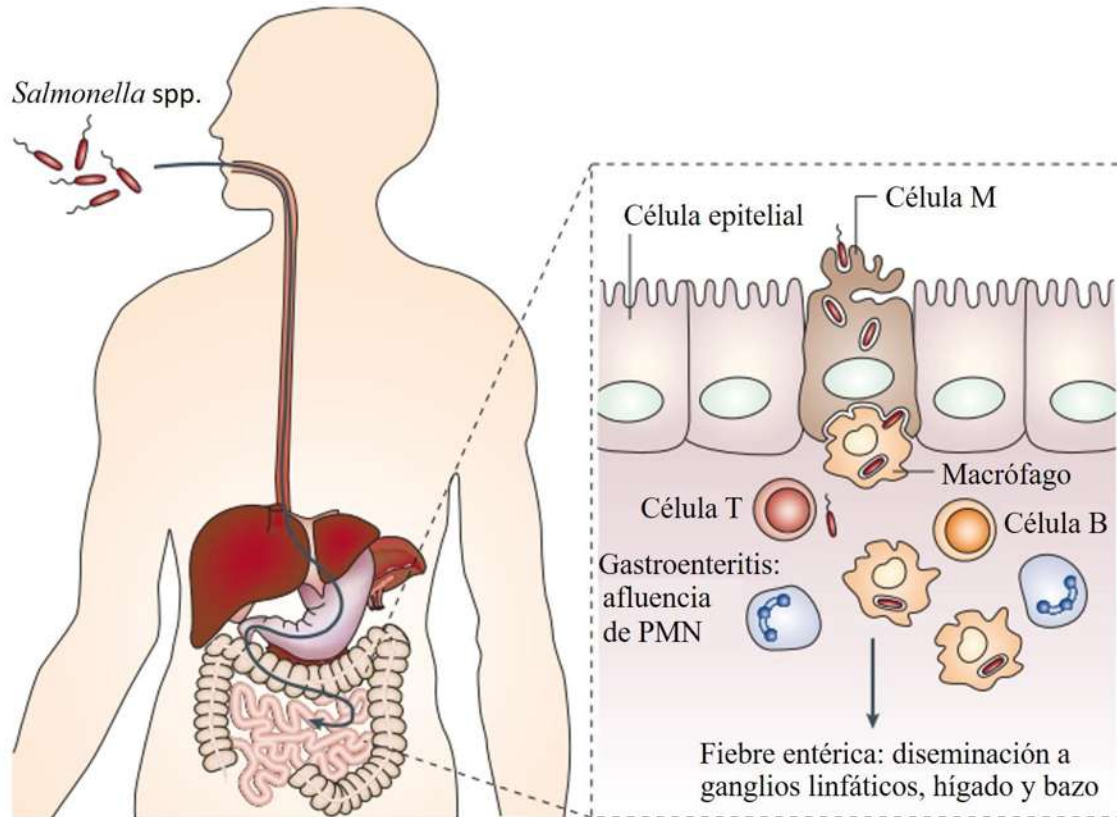


Figura 1. Biología de la infección por *Salmonella*. Imagen modificada de Haraga et al., 2008.

Aunque la gastroenteritis es una infección localizada de la mucosa intestinal y los ganglios linfáticos mesentéricos, algunos serotipos son capaces de diseminarse por todo el cuerpo durante la fiebre tifoidea y la bacteremia. Las respuestas del hospedero provocadas durante la bacteremia se consideran clásicamente como consecuencias de la detección de lipopolisacáridos (LPS) por el receptor Toll-like 4 (TLR4) expresado en monocitos, lo que desencadena una fuerte secreción de citocinas que puede conducir a la sepsis (Keestra-Gounder et al., 2015).

La evolución de la patogenicidad de *S. enterica* está fuertemente asociada con la adquisición de elementos genéticos móviles. El conjunto de elementos genéticos móviles incluye secuencias de inserción (IS), transposones, integrones, plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad. Este conjunto de elementos móviles ha contribuido enormemente a la

diversidad genética y al comportamiento diferencial de las bacterias, y codifica la mayoría de los determinantes de virulencia de los serotipos de *S. enterica* (Langridge et al., 2015; Mebrhatu et al., 2014).

1.5. Resistencia al estrés y su relación con la virulencia

Las bacterias se enfrentan constantemente a situaciones de estrés en sus nichos ecológicos, los alimentos y el tracto gastrointestinal del hospedero. La capacidad de detectar y responder a los cambios en el ambiente circundante es crucial para que los patógenos bacterianos sobrevivan o crezcan en entornos cambiantes (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). Estas condiciones de estrés, no solo afectan el crecimiento y la supervivencia de los patógenos, sino que también pueden influir en la virulencia y la resistencia a múltiples antimicrobianos (Spector y Kenyon, 2012). Algunas de estas condiciones de estrés incluyen cambios en la temperatura, la disponibilidad de agua, cambios en el pH, la disponibilidad de nutrientes, cambios en la osmolaridad, cambios en el potencial de oxígeno, radiación Gamma, exposición a moléculas antimicrobianas, interacción con otros microorganismos y bacteriófagos, entre otros (Begley y Hill, 2015; Rychlik y Barrow, 2005; Wesche et al., 2009).

S. enterica tiene la capacidad de desarrollar una resistencia estable contra condiciones extremas dentro de un contexto genómico definido y un número limitado de generaciones. Por otro lado, también pueden responder a condiciones adversas de manera transitoria, a través de las llamadas respuestas de tolerancia al estrés. Las respuestas de tolerancia al estrés incluyen modificaciones estructurales y fisiológicas en la célula, y están mediadas por una compleja maquinaria de regulación genética (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). Un buen ejemplo de dicha regulación son los factores sigma, que son reguladores globales que alteran la especificidad de la ARN polimerasa. El más estudiado de estos en *S. enterica* es RpoS, que regula la expresión de hasta 50 proteínas asociadas a la respuesta al estrés (Humphrey, 2004).

Los principales aspectos de las respuestas al estrés son: mecanismos de detección de señales de estrés, activación de proteínas reguladoras, inducción de sistemas que restablezcan la homeostasis celular, inducción de mecanismos de reparación de macromoléculas, síntesis de proteínas de respuesta al estrés, expresión de sistemas alternativos de respiración, y

modificaciones de la membrana celular, particularmente en su composición de ácidos grasos y propiedades físicas (Alvarez-Ordóñez et al., 2015; Spector y Kenyon, 2012).

La respuesta de *S. enterica* a estas condiciones de estrés no solo impactan a la sobrevivencia y al crecimiento del patógeno, sino que también pueden afectar la virulencia y la multi-resistencia a antibióticos (Altier, 2005; Clements et al., 2001; McMahon et al., 2007; Spector y Kenyon, 2012). Por ejemplo, se ha documentado que cepas del serotipo Typhimurium que poseen plásmidos del grupo HII, asociados a resistencia a antibióticos, contribuyen a la sobrevivencia de la célula a condiciones de estrés nutricional y bajas temperaturas (Paytubi et al., 2014). También se ha observado en cepas del serotipo Enteritidis que el estrés por cultivo a altas temperaturas incrementa significativamente los niveles de transcripción no solo de genes asociados a respuesta al estrés como *rpoS* y *rpoH*, sino también de genes asociados a virulencia como *spvR*, *hilA* y *avrA* (Yang et al., 2014). Adicionalmente, en el mismo serotipo, el estrés por actividad de agua reducida (altas concentraciones de NaCl) disminuye la sensibilidad a antibióticos e incrementa la resistencia térmica y la capacidad de invasión de células epiteliales Caco-2 (Yoon et al., 2013).

Así mismo, la capacidad de *S. enterica* para utilizar distintas fuentes de carbono se ha correlacionado con su virulencia. Por ejemplo, al analizar dos cepas del serotipo Enteritidis con un 99.99% de identidad genética, se observó que aquella cepa capaz de formar biofilm e infectar huevos era metabólicamente más activa que la cepa que no podía infectar huevos (Bochner et al., 2008), alimento mediante el cual este serotipo se transmite al hospedero. Otro análisis en el serotipo Enteritidis ha mostrado alteraciones en el operón *sefABCD* en cepas del mismo fagotipo; dicho operón está involucrado en el ensamble de la fimbria y ha sido relacionado con patogenicidad. Mutantes de este fagotipo en el operón *sefABCD* han mostrado deficiencias en sus capacidades metabólicas (Morales et al., 2012). En particular, la ausencia del gen *sefD* dentro de dicho operón ha sido relacionada con virulencia, al facilitar el crecimiento dentro del hospedero mediante el aprovechamiento de una gran variedad de sustratos (Morales et al., 2012).

En la cepa del serotipo Typhimurium del genotipo DT104 multi-resistente a antibióticos y relacionado con epidemias, se observó que presentan cambios únicos en el metabolismo de la histidina y el glioxilato, los cuales no se presentan en la cepa de referencia

LT2 del mismo serotipo (Bochner et al., 2008). La cepa DT104 es capaz de utilizar la histidina como fuente de carbono y nitrógeno, lo cual no puede hacer la cepa LT2 debido a una mutación que modifica el marco de lectura del gen *hutU*. Por otra parte, la cepa DT104 resistente a cinco antibióticos es incapaz de metabolizar glioxilato como fuente de carbono, debido probablemente a la pérdida de una región del cromosoma que contiene los genes involucrados en esta ruta metabólica (Bochner et al., 2008).

Referencias bibliográficas

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S., 2012. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* 8, e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Ackermann, M., 2013. Microbial individuality in the natural environment. *ISME J.* 7, 465–467. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.131>
- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C., Vinatzer B- A., 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology.* 100(3): 208-215.
- Almeida, F., Seribelli, A.A., da Silva, P., Medeiros, M.I.C., Dos Prazeres Rodrigues, D., Moreira, C.G., Allard, M.W., Falcão, J.P., 2017. Multilocus sequence typing of *Salmonella Typhimurium* reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 51, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.009>
- Altier, C., 2005. Genetic and environmental control of salmonella invasion. *J. Microbiol.* 43 Spec No, 85–92.
- Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., Prieto, M., 2015. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004>
- Ao, T.T., Feasey, N.A., Gordon, M.A., Keddy, K.H., Angulo, F.J., Crump, J.A., 2015. Global Burden of Invasive Nontyphoidal *Salmonella* Disease, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 941–949. <https://doi.org/10.3201/eid2106.140999>
- Arnold, D.L., Jackson, R.W., Waterfield, N.R., Mansfield, J.W., 2007. Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. *Trends Genet.* 23, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.017>
- Arya, G., Holtslander, R., Robertson, J., Yoshida, C., Harris, J., Parmley, J., Nichani, A., Johnson, R., Poppe, C., 2017. Epidemiology, Pathogenesis, Genoserotyping, Antimicrobial Resistance, and Prevention and Control of Non-Typhoidal *Salmonella*

- Serovars. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* 4, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0057-7>
- Ashton, P.M., Owen, S. V., Kaindama, L., Rowe, W.P.M., Lane, C.R., Larkin, L., Nair, S., Jenkins, C., de Pinna, E.M., Feasey, N.A., Hinton, J.C.D., Dallman, T.J., 2017. Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella* Typhimurium epidemic in Africa. *Genome Med.* 9, 92. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0480-7>
- Bale, J., Meunier, D., Weill, F., DePinna, E., Peters, T., Nair, S., 2016. Characterization of new *Salmonella* serovars by whole-genome sequencing and traditional typing techniques. *J. Med. Microbiol.* 65, 1074–1078. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000325>
- Begley, M., Hill, C., 2015. Stress adaptation in foodborne pathogens. *Annual Review of Food Science and Technology.* 6: 191-210. doi:10.1146/annurev-food-030713-092350
- Bochner, B.R., Giovannetti, L., Viti, C., 2008. Important discoveries from analysing bacterial phenotypes. *Mol. Microbiol.* 70, 274–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06383.x>
- Branchu, P., Bawn, M., Kingsley, R. A., 2018. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infection and Immunity.* 86(8): e00079-18.
- Calva, E., Silva, C., Zaidi, M.B., Sanchez-Flores, A., Estrada, K., Silva, G.G.Z., Soto-Jiménez, L.M., Wiesner, M., Fernández-Mora, M., Edwards, R.A., Vinuesa, P., 2015. Complete Genome Sequencing of a Multidrug-Resistant and Human-Invasive *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain of the Emerging Sequence Type 213 Genotype. *Genome Announc.* 3, e00663-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00663-15>
- Carden, S., Okoro, C., Dougan, G., Monack, D., 2015. Non-typhoidal *Salmonella* Typhimurium ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis. *Pathog. Dis.* 73, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu023>
- Clements, M., Eriksson, S., Tezcan-Merdol, D., Hinton, J.C.D., Rhen, M., 2001. Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. *Ann. Med.* 33, 178–185. <https://doi.org/10.3109/07853890109002075>
- Cooper, J.E., Feil, E.J., 2004. Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends Microbiol.* 12, 373–377. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.06.003>
- De Cesare, A., 2018. *Salmonella* in foods: a Reemerging problem. *Advances in food and nutrition research* 86: 137-179. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.007>
- El Qaidi, S., Wu, M., Zhu, C., Hardwidge, P. R., 2018. *Salmonella*, *E. coli*, and *Citrobacter* Type III Secretion System Effector Proteins that Alter Host Innate Immunity. *Adv. Exp. Med. Biol. Protein Reviews.* https://doi.org/10.1007/5584_2018_289
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., Lee, L.-H., 2015. *Salmonella* : A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.* 8, 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

- Fàbrega, A., Vila, J., 2013. Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Finlay, B.B., Brummell, J.H., 2000. Salmonella interactions with host cells: in vitro to in vivo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 623–31. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0603>
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C., Wagner, S., 2014. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annual Review of Microbiology.* 68: 415-438. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155725
- Galanis, E., Wong, D.M.A.L.F., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., Wegener, H.C., 2006. Web-based Surveillance and Global Salmonella Distribution, 2000–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 381–388. <https://doi.org/10.3201/eid1205.050854>
- Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., González-Andrade, M.D.C., 2000. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. *Salud Publica Mex.* 42, 490–495.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I., 2008. Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., Praet, N., Bellinger, D.C., de Silva, N.R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F.J., Devleeschauwer, B., 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Med.* 12, e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R. V., 2002. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* 129, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268802006842>
- Humphrey, T., 2004. Salmonella, stress responses and food safety. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 504–509. <https://doi.org/10.1038/nrmicro907>
- Jones, T. F., Ingram, L. A., Cieslak, P. R., Vugia, D. J., Tobin-D'Angelo, M., Hurd, S., Medus, C., Cronquist, A., Angulo, F. J., 2008. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *The Journal of Infectious Diseases.* 198(1): 109-114.
- Kalai-Chelvam, K., Yap, K.P., Chai, L.C., Thong, K.L., 2015. Variable Responses to Carbon Utilization between Planktonic and Biofilm Cells of a Human Carrier Strain of Salmonella enterica Serovar Typhi. *PLoS One* 10, e0126207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126207>
- Keestra-Gounder, a. M., Tsoilis, R.M., Bäumlner, A.J., 2015. Now you see me, now you don't: the interaction of Salmonella with innate immune receptors. *Nat. Rev. Microbiol.* 1–11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3428>
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., Achtman, M.,

2002. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect. Genet. Evol.* 2, 39–45. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00089-8)
- Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Thomson, N.R., Kariuki, S., Holt, K.E., Gordon, M.A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M.E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C.A., Heyderman, R.S., Dougan, G., 2009. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Res.* 19, 2279–2287. <https://doi.org/10.1101/gr.091017.109>
- Kirk, M.D., Pires, S.M., Black, R.E., Caipo, M., Crump, J.A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C.L., Hald, T., Hall, A.J., Keddy, K.H., Lake, R.J., Lanata, C.F., Torgerson, P.R., Havelaar, A.H., Angulo, F.J., 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLOS Med.* 12, e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
- Knodler, L.A., 2015. *Salmonella enterica*: living a double life in epithelial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.10.010>
- Lamas, A., Miranda, J.M., Vázquez, B., Cepeda, A., Franco, C.M., 2016. Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in *Salmonella enterica* decrease under anaerobic conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.043>
- Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M., 2018. *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assessment from farm to fork. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.8945>
- Lambert, G., Kussell, E., 2014. Memory and Fitness Optimization of Bacteria under Fluctuating Environments. *PLoS Genet.* 10, e1004556. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004556>
- Langridge, G.C., Fookes, M., Connor, T.R., Feltwell, T., Feasey, N., Parsons, B.N., Seth-Smith, H.M.B., Barquist, L., Stedman, A., Humphrey, T., Wigley, P., Peters, S.E., Maskell, D.J., Corander, J., Chabalgoity, J. a., Barrow, P., Parkhill, J., Dougan, G., Thomson, N.R., 2015. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 863–868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416707112>
- LaRock, D.L., Chaudhary, A., Miller, S.I., 2015. *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro3420>
- Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T.J., Phillips, R., Hsieh, J., 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control* 47, 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>
- Li, W., Raoult, D., Fournier, P.-E., 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 892–916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2013. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 310–321.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.016>

- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.002>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2011. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiol.* 28, 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.006>
- Luo Y, Kong Q, Yang J, Mitra A, Golden G, Wanda, S. Y., Roland, K. L., Jensen, R. V., Ernst, P. B., Curtiss III, R., 2012. Comparative Genome analysis of the high pathogenicity *Salmonella* Typhimurium strain UK-1. *PLoS ONE* 7(7): e40645. doi:10.1371/journal.pone.0040645
- Maiden, M.C.J., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 561–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325>
- Martins, M., McCusker, M.P., McCabe, E.M., O’Leary, D., Duffy, G., Fanning, S., 2013. Evidence of Metabolic Switching and Implications for Food Safety from the Phenome(s) of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Cultured at Selected Points across the Pork Production Food Chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5437–5449. <https://doi.org/10.1128/AEM.01041-13>
- McMahon, M.A.S., Xu, J., Moore, J.E., Blair, I.S., McDowell, D.A., 2007. Environmental Stress and Antibiotic Resistance in Food-Related Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 211–217. <https://doi.org/10.1128/AEM.00578-06>
- Mebrhatu, M.T., Cenens, W., Aertsen, A., 2014. An overview of the domestication and impact of the *Salmonella mobilome*. *Crit. Rev. Microbiol.* 40, 63–75. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.755949>
- Morales, C.A., Guard, J., Sanchez-Ingunza, R., Shah, D.H., Harrison, M., 2012. Virulence and Metabolic Characteristics of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Strains with Different *sefD* Variants in Hens. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6405–6412. <https://doi.org/10.1128/AEM.00852-12>
- Okoro, C.K., Barquist, L., Connor, T.R., Harris, S.R., Clare, S., Stevens, M.P., Arends, M.J., Hale, C., Kane, L., Pickard, D.J., Hill, J., Harcourt, K., Parkhill, J., Dougan, G., Kingsley, R. a., 2015. Signatures of Adaptation in Human Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 Populations from Sub-Saharan Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003611. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003611>
- Okoro, C.K., Kingsley, R.A., Connor, T.R., Harris, S.R., Parry, C.M., Al-Mashhadani, M.N., Kariuki, S., Msefula, C.L., Gordon, M.A., de Pinna, E., Wain, J., Heyderman, R.S., Obaro, S., Alonso, P.L., Mandomando, I., MacLennan, C.A., Tapia, M.D., Levine, M.M., Tennant, S.M., Parkhill, J., Dougan, G., 2012. Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat. Genet.* 44, 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/ng.2423>
- Olsen, S.J., Bishop, R., Brenner, F.W., Roels, T.H., Bean, N., Tauxe, R. V., Slutsker, L., 2001. The Changing Epidemiology of *Salmonella*: Trends in Serotypes Isolated from Humans in the United States, 1987–1997. *J. Infect. Dis.* 183, 753–761.

<https://doi.org/10.1086/318832>

- Pang, S., Octavia, S., Feng, L., Liu, B., Reeves, P. R., Lan, R., Wang, L., 2013. Genomic diversity and adaptation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from analysis of six genomes of different phage types. *BMC Genomics* 14:718. doi:10.1186/1471-2164-14-718
- Paniagua, G., Monroy, E., García-González, O., Alonso, J., Negrete, E., Vaca, S., 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 6, 17. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-17>
- Paytubi, S., Aznar, S., Madrid, C., Balsalobre, C., Dillon, S.C., Dorman, C.J., Juárez, A., 2014. A novel role for antibiotic resistance plasmids in facilitating *Salmonella* adaptation to non-host environments. *Environ. Microbiol.* 16, 950–962. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12244>
- Ramachandran, G., Aheto, K., Shirtliff, M.E., Tennant, S.M., 2016. Poor biofilm-forming ability and long-term survival of invasive *Salmonella* Typhimurium ST313. *Pathog. Dis.* 74, 1–35. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw049>
- Ramachandran, G., Panda, A., Higginson, E.E., Ateh, E., Lipsky, M.M., Sen, S., Matson, C.A., Permala-Booth, J., DeTolla, L.J., Tennant, S.M., 2017. Virulence of invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 in animal models of infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005697. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005697>
- Ranieri, M.R., Whitchurch, C.B., Burrows, L.L., 2018. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.006>
- Rychlik, I., Barrow, P. a., 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 1021–1040. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.005>
- Sabat, a. J., Budimir, a., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J., Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, a. W., ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM), 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 18, 20380. <https://doi.org/20380> [pii]
- Sabbagh, S.C., Forest, C.G., Lepage, C., Leclerc, J.M., Daigle, F., 2010. So similar, yet so different: Uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol. Lett.* 305, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x>
- Sánchez-Vargas, F.M., Abu-El-Haija, M. a., Gómez-Duarte, O.G., 2011. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med. Infect. Dis.* 9, 263–277. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2011.11.001>
- Schaper, F., Rose-John, S., 2015. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.004>
- Shah, J., Desai, P.T., Chen, D., Stevens, J.R., Weimer, B.C., 2013. Preadaptation to Cold Stress in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Increases Survival during

- Subsequent Acid Stress Exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7281–7289. <https://doi.org/10.1128/AEM.02621-13>
- Shi, C., Singh, P., Ranieri, M.L., Wiedmann, M., Moreno Switt, A.I., 2013. Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. *Crit. Rev. Microbiol.* 7828, 309–325. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.837862>
- Silva, C., Calva, E., Calva, J.J., Wiesner, M., Vinuesa, P., Fernández-Mora, M., Puente, J.L., Vinuesa, P., 2015. Complete Genome Sequence of a Human-Invasive *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain of the Emerging Sequence Type 213 Harboring a Multidrug Resistance IncA / C Plasmid and a bla CMY-2 -. *Genome Announc.* 3, 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01323-15>. Copyright
- Singletary, L.A., Karlinsey, J.E., Libby, S.J., Mooney, J.P., Lokken, K.L., Tsohis, R.M., Byndloss, M.X., Hirao, L.A., Gaulke, C.A., Crawford, R.W., Dandekar, S., Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Heyderman, R.S., Fang, F.C., 2016. Loss of Multicellular Behavior in Epidemic African Nontyphoidal *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ST313 Strain D23580. *MBio* 7, e02265. <https://doi.org/10.1128/mBio.02265-15>
- Solomon, E.B., Niemira, B. a, Sapers, G.M., Annous, B. a, 2005. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *J. Food Prot.* 68, 906–912. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.906>
- Spector, M.P., Kenyon, W.J., 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res. Int.* 45, 455–481. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45, 502–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C., 2014. The Molecular Epidemiological Characteristics and Genetic Diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS One* 9, e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>
- Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R. V., 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 382–389. <https://doi.org/10.3201/eid0703.017303>
- Turner, K.M.E., Feil, E.J., 2007. The secret life of the multilocus sequence type. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.11.002>
- Veening, J.-W., Smits, W.K., Kuipers, O.P., 2008. Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 193–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163002>
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G., 2013. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>

- Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P., Ryser, E.T., 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 72, 1121–1138.
- Wiesner, M., Calva, E., Fernández-Mora, M., Cevallos, M. a, Campos, F., Zaidi, M.B., Silva, C., 2011. Salmonella Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiol.* 11, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-9>
- Wiesner, M., Calva, J.J., Bustamante, V.H., Pérez-Morales, D., Fernández-Mora, M., Calva, E., Silva, C., 2016. A multi-drug resistant Salmonella Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the bla CMY-2 gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC Microbiol.* 16, 18. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0633-7>
- Wiesner, M., Zaidi, M.B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J.J., Silva, C., 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican Salmonella enterica serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* 9, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>
- Winfield, M. D., Groisman, E. A., 2004. Evolution and Ecology of Salmonella. *EcoSal Plus.* 1(1). doi:10.1128/ecosalplus.6.4.6.
- Wong, M.H.Y., Yan, M., Chan, E.W.C., Liu, L.Z., Kan, B., Chen, S., 2013. Expansion of Salmonella enterica Serovar Typhimurium ST34 Clone Carrying Multiple Resistance Determinants in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4599–4601. <https://doi.org/10.1128/AAC.01174-13>
- Xu, H., Lee, H.-Y., Ahn, J., 2010. Growth and Virulence Properties of Biofilm-Forming Salmonella enterica Serovar Typhimurium under Different Acidic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7910–7917. <https://doi.org/10.1128/AEM.01508-10>
- Xu, H., Lee, H.Y., Ahn, J., 2008. Cross-protective effect of acid-adapted Salmonella enterica on resistance to lethal acid and cold stress conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 290–297. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02429.x>
- Yang, J., Barrila, J., Roland, K.L., Kilbourne, J., Ott, C.M., Forsyth, R.J., Nickerson, C. a., 2015. Characterization of the Invasive, Multidrug Resistant Non-typhoidal Salmonella Strain D23580 in a Murine Model of Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003839. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003839>
- Yang, Y., Khoo, W.J., Zheng, Q., Chung, H.-J., Yuk, H.-G., 2014. Growth temperature alters Salmonella Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.006>
- Yoon, H., Park, B.-Y., Oh, M.-H., Choi, K.-H., Yoon, Y., 2013. Effect of NaCl on Heat Resistance, Antibiotic Susceptibility, and Caco-2 Cell Invasion of Salmonella. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2013/274096>
- Zaidi, M.B., Calva, J.J., Estrada-Garcia, M.T., Leon, V., Vazquez, G., Figueroa, G., Lopez, E., Contreras, J., Abbott, J., Zhao, S., McDermott, P., Tollefson, L., 2008. Integrated

food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 429–435. <https://doi.org/10.3201/eid1403.071057>

Zaidi, M.B., Macías, C.L., Calva, E., 2006. Estudios Mexicanos sobre *Salmonella*: Epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48, 121–125. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>

2. JUSTIFICACIÓN

Salmonella enterica es uno de los principales patógenos transmitidos por los alimentos que afecta a los seres humanos y animales de granja. En los seres humanos, *S. enterica* causa gastroenteritis y otras enfermedades, como bacteriemia e infecciones endovasculares y localizadas; por lo que las enfermedades relacionadas con *S. enterica* continúan teniendo un impacto significativo en la morbilidad y la mortalidad en todo el mundo, acarreando en consecuencia costos económicos asociados a la prevención y el tratamiento. Se estima que aproximadamente 94 millones de casos de salmonelosis ocurren cada año, asociados con la contaminación de los alimentos.

A nivel mundial, los datos epidemiológicos muestran cambios regionales en la prevalencia de serotipos de *S. enterica* así como el reemplazo en la incidencia de genotipos determinados por secuencias tipo (ST) en diferentes áreas geográficas. Estos cambios son de gran relevancia en salud pública debido a que los genotipos emergentes que empiezan a prevalecer y expandirse a nuevas regiones presentan alta virulencia y resistencia múltiple a antibióticos. Uno de estos genotipos es el de la secuencia tipo ST213, descrito inicialmente en México en el año 2009.

A pesar de la creciente evidencia sobre el reemplazo mundial de serotipos/genotipos en diferentes países o áreas geográficas, son pocos los estudios donde se han evaluado las diferencias genéticas, bioquímicas y fisiológicas subyacentes entre las cepas involucradas en dichas dinámicas, principalmente con el genotipo ST213.

Esta falta de conocimiento dificulta la optimización de las estrategias para el control de la contaminación de los alimentos y los programas de vigilancia de la salud pública, ya que la exposición al estrés ambiental y las condiciones antimicrobianas generadas por las defensas del hospedero proporcionan ventajas selectivas para la supervivencia de cepas resistentes.

Por lo anterior, el interés de este trabajo fue realizar un análisis comparativo de la relación entre resistencia al estrés y virulencia entre los genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica*, con la finalidad de determinar las posibles razones por las que el genotipo ST213 se ha vuelto más prevalente en la contaminación de alimentos en México y ha iniciado su expansión geográfica.

3. HIPÓTESIS

El genotipo ST213 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium es más resistente a las condiciones de estrés que el genotipo ST19, lo que se relaciona con una mayor virulencia.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la relación entre resistencia al estrés y virulencia entre los genotipos ST213 y ST19 de cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.

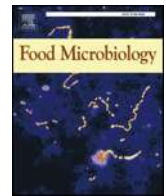
4.2. Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de resistencia al estrés asociado a la preservación de los alimentos de cepas de los genotipos ST213 y ST19 de *S. enterica*.
- Comparar el crecimiento y formación de biofilm bajo diferentes sustratos de cepas de los genotipos ST213 y ST19 de *S. enterica*.
- Contrastar la virulencia *in vitro* e *in vivo* de los genotipos ST213 y ST19 de *S. enterica*.
- Determinar la variabilidad fisiológica de cepas del genotipo ST213 con relación a la resistencia a las condiciones de estrés asociadas a la preservación de los alimentos.

5. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium



Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium

Adrián Gómez-Baltazar^a, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^b, John Larsen^c,
Mariana Esther Kuk-Soberanis^b, Gerardo Vázquez-Marrufo^{a,*}

^a Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, CP 58893, Mexico

^b División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, CP 58020, Mexico

^c Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES), Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, CP 58190, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Salmonella Typhimurium
Sequence type
Stress
Biofilm
Filamentation
Motility

ABSTRACT

The replacement of the most prevalent *Salmonella enterica* genotypes has been documented worldwide. Here we tested the hypothesis that the current prevalent sequence type ST213 of serotype Typhimurium in Mexico has a higher resistance to stressful food preservation conditions than the displaced sequence ST19. ST19 showed higher cell viability percentages than ST213 in osmotic (685 mM NaCl) and acidic (pH 3.5) stress conditions and in combination with refrigeration (4 °C) and ambient (≈ 22 °C) temperatures. Both genotypes showed the same poststress recovery growth. ST213 formed biofilm and filamentous cells (FCs) under stress, whereas ST19 did not. ST213 cells also showed higher motility. The capacity of ST213 to form FCs may explain its lower viability percentages when compared with ST19, i.e., ST213 cells divided less under stress conditions, but FCs had the same recovery capacity of ST19 cells. ST213 presented a higher unsaturated/saturated fatty acids ratio (0.5–0.6) than ST19 (0.2–0.5), which indicates higher membrane fluidity. The transcript levels of the *rpoS* gene were similar between genotypes under the experimental conditions employed. Biofilm formation, the generation of FCs, cell motility and membrane modification seem to make ST213 more resistant than ST19 to food preservation environments.

1. Introduction

Salmonella enterica is one of the main food-borne pathogens that affects humans and farm animals. In humans, *S. enterica* causes gastroenteritis and other diseases, such as bacteremia and endovascular and localized infections (Crum-Cianflone, 2008); thus, *S. enterica*-related diseases continue to have a significant impact on morbidity, mortality and economic costs worldwide (Kirk et al., 2015). It is estimated that approximately 94 million cases of salmonellosis occur each year, and Typhimurium and Enteritidis are the most frequent serotypes associated with food contamination (Majowicz et al., 2010). During its infection cycle, this bacterial pathogen lasts for prolonged periods outside the host and is exposed to harsh environmental conditions (Spector and Kenyon, 2012). In particular, food matrices constitute complex microenvironments where bacteria face extreme pH,

osmolarity, and temperature, or sudden changes in physicochemical variables that may be lethal (Álvarez-Ordóñez et al., 2015). However, *S. enterica* has the ability to adequately overcome these adverse surroundings through a wide variety of genetic, biochemical and physiological responses that allows it to adapt and survive. Within populations that are submitted to stress, the bacterial cells that survive are usually able to colonize and invade the host intestinal mucosa via contaminated food (Spector and Kenyon, 2012). Among the stress survival strategies described, *S. enterica* induces biofilm formation (Lianou and Koutsoumanis, 2012; Steenackers et al., 2012), generates filamentous cells (Mattick et al., 2000), and modifies both its membrane composition and fluidity (Álvarez-Ordóñez et al., 2008). The switch in transcription levels of adequate gene sets go along with these cellular and biochemical responses to stress. Within the set of genes that participate in different stress environments, the alternative sigma factor RpoS/ σ^S

* Corresponding author. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, La Palma, Tarímbaro, Mich, CP 58893, Mexico.

E-mail addresses: ad_riangb@hotmail.com (A. Gómez-Baltazar), marisolvaz@yahoo.com (M.S. Vázquez-Garcidueñas), jlarsen@cieco.unam.mx (J. Larsen), mvmzmarianakuk@gmail.com (M.E. Kuk-Soberanis), gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx (G. Vázquez-Marrufo).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.010>

Received 24 August 2018; Received in revised form 30 January 2019; Accepted 7 March 2019

Available online 08 March 2019

0740-0020/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Bacterial strains used in this study.

Strain	Source	Serotype	Sequence Type (ST)	Location of isolation
ATCC 14028	Tissue, animal-pools of heart and liver from 4-week-old chickens	Typhimurium	19	–
SAL004	Cheese	Typhimurium	19	Ciudad Hidalgo, Michoacán, Mexico
SAL115	Cheese	Typhimurium	213	Tanhuato, Michoacán, Mexico

and σ^S -dependent genes are associated and work to coordinate stress resistance (McMeechan et al., 2007; Robbe-Saule et al., 2003). Furthermore, some stress responses are involved in the severity of damage to the host during the infection process and result in crosstalk between the pathogen's stress resistance and virulence (Altier, 2005; Álvarez-Ordóñez et al., 2012).

Globally, the epidemiological data of *S. enterica* shows a dynamic pathogen with continuous regional turnover in serotype prevalence (Galanis et al., 2006; Herikstad et al., 2002; Olsen et al., 2001). Recent findings have documented the pathogen dynamics at a more subtle level by describing the replacement of genotypes as determined by sequence type (ST) within prevalent serotypes associated with different geographical areas. For instance, the ST313 genotype has the highest incidence among invasive non-typhoidal *Salmonella* (iNTS) in sub-Saharan Africa; replacing the ST19 genotype, prevalent in other geographical areas (Feasey et al., 2012; Okoro et al., 2012). Recently, the change in genotype prevalence occurred in Guangdong, China, where ST34 is one of the most prevalent in this region (Sun et al., 2014). The advantages of assessing the epidemiological dynamics of *S. enterica* at the genotype level using STs instead of serotypes have been recently highlighted (Achtman et al., 2012). Furthermore, the ST genotype of *S. enterica* using a 7 loci protocol has high congruence with whole genome typing (Bale et al., 2016; Larsen et al., 2012).

Genotype replacement of the *S. enterica* serotype Typhimurium has also been observed in Mexico. Even though ST19 strains were prevalent in clinical and food samples in 2002, ST213 genotype strains became prevalent in 2005 (Wiesner et al., 2009). We observed this same replacement tendency in contaminated food samples in 2008–2011 (unpublished data). Far from being only a local public health concern, such replacement has global consequences because ST19 is the most abundant genotype of the Typhimurium serotype worldwide and seems to be the founder genotype of the remaining Typhimurium strains. Although the ST213 genotype was initially reported in Mexico as a predominant genotype (Achtman et al., 2012; Wiesner et al., 2009), it has also begun to be found at low incidence in other countries in North America, Europe and Asia (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). Furthermore, it has been recently documented to have significant differences in virulence among clinical strains of both genotypes (Wiesner et al., 2016).

Despite growing evidence on the worldwide replacement of formerly prevalent serotypes/genotypes in different countries or geographical areas, the underlying genetic, biochemical and physiological differences between strains involved in such dynamics have not been evaluated. This lack of knowledge hampers optimization of strategies for control of food contamination and public health surveillance programs because exposure to environmental stress and antimicrobial conditions generated by the host defenses, provide selective advantages for the survival of resistant strains. This also drives horizontal gene transfer that leads to the evolution of virulence, which contributes to the occurrence of outbreaks caused by a particular serotype or genotype of a pathogen (Arnold et al., 2007).

We hypothesize that the replacement of ST19 by ST213 as the predominant genotype isolated from contaminated food in Mexico and its recent spread worldwide might be partially explained by its superior stress resistance. Particularly, the ST213 genotype might resist and survive better than the ST19 genotype in food preservation conditions such as low water activity (a_w), acidic pH, and refrigeration

temperatures (4 °C). Thus, this study might help to better understand *S. enterica* adaptive responses and evolution associated with food chains and man-made generated environments with relevance to public health.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

The strains of serotype Typhimurium were provided by the State Public Health Laboratory of Michoacán and include ST213 (SAL115) and ST19 (SAL004). Sequence typing assignment was performed by 7 loci MLST and according to the protocols described at the MLST website (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica.html>). The numbers for alleles and sequence types (STs) were assigned according to the MLST database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). The reference *S. enterica* strain (ATCC14028) serotype Typhimurium was used as the control. Relevant information for each strain is shown in Table 1.

2.2. Culture conditions

The strains were cultured overnight at 37 °C and 180 rpm in 10 ml Luria-Bertani (LB) broth to obtain the inoculum for stress assays and as control conditions to contrast stress responses. The culture conditions to simulate stress associated with food preservation, including reduced water activity (r_{a_w}), low pH and refrigeration temperature (4 °C), were performed as previously described (Humphrey et al., 2011), and their combinations were also tested. Stress broth were prepared by modifying LB medium with NaCl and 1 M HCl until we achieved the desired salt concentration and pH as follows: NaCl 685 mM (LB r_{a_w}), pH 3.5 (LB ac) and the combination of NaCl 685 mM and pH 3.5 (LB r_{a_w} -ac). Bacterial cultures were prepared by inoculating a single colony in 10 ml of LB broth and incubating overnight at 37 °C and 180 rpm. The culture was centrifuged at 1360 × g for 4 min and the pellet was resuspended in 10 ml of the corresponding stress broth. The cultures were statically incubated at room temperature (\approx 22 °C) or at refrigeration temperature (4 °C) for 8 days.

2.3. Viability count

The cell viability was determined using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). This kit contains a 1:1 (v/v) mixture of SYTO-9/propidium iodide markers capable of staining nucleic acids. The strains were stained according to the manufacturer's instructions. The percentage of live and dead bacteria was evaluated using a BD Accuri™ C6 flow cytometer.

2.4. Poststress recovery assay

After incubation under stress conditions, the cultures were centrifuged (1360 × g) for 10 min, the cell pellet was resuspended and diluted 1:200 (v/v) in 10 ml LB broth and incubated at 37 °C at 180 rpm for 6 h to allow cell recovery. To determine the number of colony-forming units (CFUs), serial dilutions of the culture were made every 2 h and 100 μ l of the culture was spread on LB agar plates and incubated for 24 h at 37 °C. After the incubation period, the CFUs were determined. All of the recovery assays were conducted six times.

2.5. Cell filamentation observations

The studied strains were submitted to reduced water activity (a_w) stress conditions as previously described and incubated statically both at room and refrigeration temperature for 8 days. After the stress period, the changes in cell morphology were assessed by Gram staining of the cells viewed in a Leica microscope equipped with a Leica ICC50 HD digital camera. The images were captured and processed using Leica Application Suite 3.00 software. The percentage of filamentous cells in each genotype were quantified by counting 100 cells in nine different microscopic fields for control and each stress condition. The sizes of the elongated cells were viewed at 100 \times magnification. Cells that were longer than three normal cell lengths (2–3 μ m) were considered filamentous.

2.6. Biofilm formation and viability

The biofilm formation was quantified using a modified crystal violet staining colorimetric assay (Burton et al., 2007) as follows. Bacteria were incubated in 96-well plates under stress conditions, and after 8 days, the broth was gently removed, and each well was washed three times with 200 μ l of PBS and then allowed to dry for 15 min. Bound cells in each well were stained with 200 μ l of crystal violet (0.4% v/v) for 15 min at room temperature. The unbound dye was removed, and wells were washed gently three times with 200 μ l of PBS. The plate was dried for 15 min and the crystal violet in each well was solubilized by adding 200 μ l of 33% (v/v) acetic acid. The plate was read at 595 nm using a Microplate Reader iMark (Bio-Rad, USA).

To determine the biofilm bacterial viability, an MTT colorimetric assay based on the reduction of tetrazolium salts was used according to Trafny et al. (2013) with minor modifications. Briefly, the strains were incubated in 96-well plates under stress conditions, and after 8 days, the medium was gently removed, and the wells were washed three times with 200 μ l of PBS and allowed to dry for 15 min. A total of 190 μ l of PBS and 10 μ l of 5 mg/ml of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma, USA) solution was added and then incubated 2 h at 37 $^{\circ}$ C in darkness. After incubation, the MTT solution was removed, and 200 μ l of isopropanol/HCl (19:1 v/v) was added to dissolve the formazan crystals and then incubated for 15 min at room temperature. The plate was shaken for 60 s and read at 595 nm using a Microplate Reader iMark (Bio-Rad, USA). Biofilm formation and viability assays were conducted nine times.

2.7. Cellulose and curli production

The production of cellulose and curli was determined as described by Aya-Castañeda et al. (2015). The production of curli was evaluated using LB agar without NaCl and supplemented with 40 mg/l of Congo red and 20 mg/l brilliant blue. A total of 10 μ l of bacterial LB culture with an OD₆₀₀ of 0.6 was used to inoculate agar plates and incubated for 8 days at 28 $^{\circ}$ C; afterwards, the colony morphology was observed. To confirm the production of cellulose, bacteria were inoculated onto LB agar plates without NaCl containing 200 mg/l of calcofluor and incubated at 28 $^{\circ}$ C for 48 h. The fluorescence emitted under UV light (366 nm) indicates cellulose production by the strains. This assay was conducted six times.

2.8. Cell motility

To evaluate cell motility, a swimming assay was performed for each strain. LB agar plates (0.3% agar) were inoculated in the center with overnight cultures. The inoculated plates were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 8 h. The visible region of the colony propagated in the agar was measured in millimeters (Martins et al., 2013). This assay was conducted nine times.

2.9. Fatty acid analysis

The fatty acid analyses were conducted from bacterial cultures obtained as previously described only in cultures without stress and those stressed with pH 3.5 and incubated statically at room temperature or refrigeration for 8 days. After the stress period, the cultures were centrifuged at 1360 \times g for 4 min, and the pellet was resuspended in 1 ml of distilled water. Fatty acid profiles were obtained using the four-step fatty acid extraction procedure: i) saponification, ii) methylation, iii) extraction and iv) base wash (Jensen et al., 2013). Fatty acid methyl ester analyses were performed with an Agilent 6890 Plus Chromatograph (Agilent, Palo Alto, CA, USA) and Sherlock System Software 4.0.

2.10. Quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR)

The RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions and used as a template for reverse transcription-PCR. Complementary cDNA was synthesized using random hexamer primers (Invitrogen, USA). The expression analysis of the *rpoS* gene was performed with qPCR using the comparative Ct method ($\Delta\Delta$ Ct) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and according to the manufacturer's instructions. The reactions were conducted with a SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The primers were synthesized by Elim Biopharmaceuticals Inc. (Hayward CA, USA), and their specificity was determined by endpoint PCR. The 16S rRNA gene was used as an internal control. The primer sequences were 16S rRNA: 5' CAGAAGAAGCACCGGCTAAC 3'/5' GACTCAAGCCTGCCAGTTTC 3' (Yang et al., 2014) and *rpoS*: 5' GTTGACGCGACTCAGCTTT 3'/5' TTTTACCACCAGACGAGGTT 3' (Wang et al., 2016). The results were normalized using the *S. enterica* (ATCC14028) strain in stationary-phase (calibrator treatment).

2.11. Data analysis

Data were obtained from three independent experiments and compared by analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons test. The results were reported as the mean \pm standard error (SE). *P*-values of < 0.05 were considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism V6.0 software.

3. Results

3.1. Viability under stress and poststress recovery of *S. enterica* genotypes

All of the tested stress conditions decreased the viability of ST19, ST213 and the reference strain when compared with incubation in nonstress conditions (Fig. 1). Under simulated refrigeration (4 $^{\circ}$ C), the combination of LB a_w -ac strongly affected the viability of the ST213 strain (38.15%), whereas the ST19 strain was the most affected with the LB ac condition (65%). When incubated at room temperature, strain ST213 had a lower percentage of viability in each of the tested stress conditions (LB a_w : 52%, LB ac: 29.7%, and LB a_w -ac: 60.5%) compared to ST19 (LB a_w : 67.6%, LB ac: 75.5%, and LB a_w -ac: 86.8%). The cell viability of the ATCC 14028 strain was higher than that of ST19 and ST213 in LB a_w (82%) and LB ac (90%) at room temperature. However, it decreased significantly for LB a_w -ac (28%), whereas in refrigeration it was similar to the ST19 strain except for the LB pH condition, where it showed better viability (79%) than ST19 (65%). After 8 days of stress, the ST213 strain had lower viability values than the ST19 strain in all of the tested conditions, except for the refrigeration conditions at low a_w , where there was no difference, and at pH 3.5, where the ST213 strain had higher viability values than the ST19 strain.

Subsequently, the ability of the strains to recover from stress in LB liquid medium was evaluated during a 6 h period (Fig. 2). The ATCC 14028, ST19 and ST213 strains showed similar recovery kinetics under

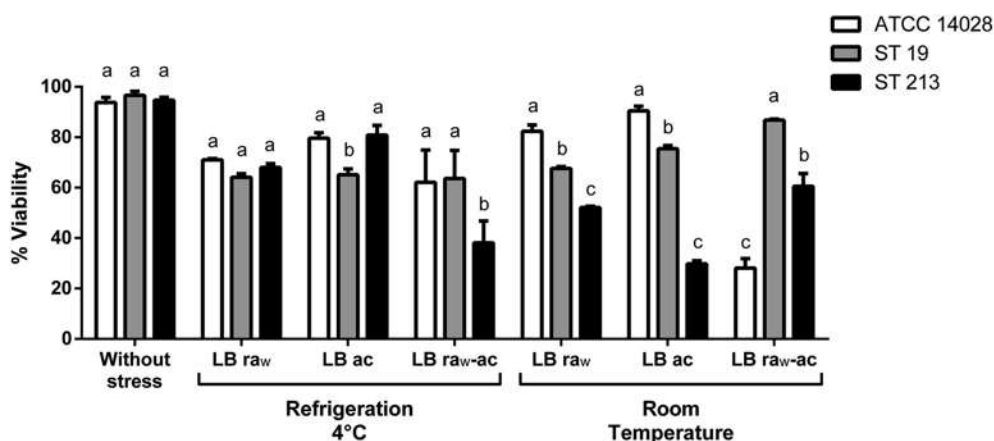


Fig. 1. Viability of genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium after incubation in stress conditions. The *S. enterica* strains ATCC 14028, ST19 and ST213 were exposed to low water activity (LB raw), pH 3.5 (LB ac) and their combination (LB raw-ac) and incubated at refrigeration (4 °C) or room temperature (≈ 22 °C) for 8 days. The data represent the mean \pm S.E. (n = 6). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference in each condition tested ($p < 0.05$).

all stress conditions, and no statistically significant differences were found ($p < 0.05$), except for the LB raw-ac at room temperature. In such conditions the ST213 genotype strain showed lower recovery than both ST19 strains (Fig. 2g). All of the recovery kinetics showed growth after 2 h, but they were slower in cells of both environmental strains (ST19 and ST213) coming from 4 °C under LB raw-ac (Fig. 2f) than in cells coming from room temperature at the same conditions (Fig. 2g). The ATCC 14028 strain showed slower recovery growth in LB ac at the refrigeration temperature (Fig. 2d).

3.2. Cell filamentation in response to stress

The capacity of both genotypes to form filamentous cells at low a_w and at both at 4 °C and room temperature was evaluated. The results show that the ST19 genotype was not able to form filamentous cells under any of the tested conditions, whereas the ST213 strain formed filaments at low a_w in both temperatures and in normal LB at 4 °C (Fig. 3). The ATCC 14028 reference strain is also able to form filamentous cells at low a_w at both temperatures, which showed a similar percentage of filamentous cells as ST213 under the same conditions (i.e., below 10% for both strains). There was an increase in filamentous cells in the LB a_w condition compared to the condition with no osmotic stress for the ST213 and ATCC 14028 strains, independent of temperature.

3.3. Ability of ST19 and ST213 genotypes to establish viable biofilm under stress

The ST213 strain was able to form biofilms under all of the evaluated incubation conditions and formed the largest amount at 4 °C compared with the other evaluated strains (Fig. 4a). However, under LB raw-ac stress in both temperatures, its ability to establish a biofilm was significantly diminished. However, ST19 was not able to form biofilm under any of the conditions evaluated, whereas the reference strain formed biofilm only in LB and LB ac at room temperature, which indicated that both refrigeration and NaCl affects its ability to establish biofilm. To determine if the cells within formed biofilms were viable under stress, their metabolic activity was evaluated by the MTT assay (Fig. 4b). Biofilm cells from the ST213 strain were metabolically active, although at 4 °C, the metabolic activity was lower in comparison to room temperature. The reference strain was metabolically active in LB and LB ac at room temperature. The Pearson correlation coefficient of 0.7646 ($p < 0.001$) clearly indicates that those strains able to establish the biofilm under the stress tested conditions remained viable after 8 days of incubation.

3.4. Colony morphotype and cell motility of *S. enterica* genotypes

The cellulose synthesis and curli fimbriae expression are important components in biofilm formation, which might be identified by determining the morphotype of the strains. The bdar (brown, dry and rough) morphotype was observed in all three strains, which indicated their capability to produce only curli fimbriae. In addition, the production of cellulose can be visualized by growing strains on agar containing calcofluor, but no fluorescence was observed under UV light for any of the three strains, which confirmed their inability to produce cellulose (Fig. 5). Other cellular structures related to biofilm formation are the flagellum components and strain motility. In this regard, a greater motility was observed in the ST213 strain (37.6 mm) in comparison with ST19 (2.1 mm) and reference (4.5 mm) strains (Fig. 6).

3.5. Plasma membrane fatty acid modifications in response to stress

The fatty acid composition of the studied strains grown in control conditions and in LB ac at 4 °C and room temperature for 8 days was evaluated. Nine major peaks were found for three strains in all of the tested conditions (Table 2), which corresponds to approximately 90% of the total fatty acids detected. Such shared fatty acids were identified as dodecanoic acid (C12:0), tetradecanoic acid (C14:0), hexadecanoic acid (C16:0), hexadecenoic acid (C16:1), heptadecanoic acid (C17:0), methylene hexadecanoic acid (C17:0 cyc), octadecanoic acid (C18:0), octadecenoic acid (C18:1) and methylene octadecenoic acid (C19:0 cyc). Under nonstress conditions, both the reference strain and the ST19 genotype showed a higher percentage of saturated fatty acids (SFA) when compared to ST213. The reference and ST19 strains showed no internal differences in fatty acid composition between the nonstress and LB ac at 4 °C incubation conditions. However, when both strains were incubated in LB ac at room temperature, their percentage of SFA decreased, whereas the content of unsaturated fatty acids (UFA) increased. In the case of the ST213 genotype, LB ac at the 4 °C stress level induced a significant decrease in the content of SFA, but no fatty acids composition change was shown in acid stress at room temperature compared to the nonstress condition. Interestingly, it was observed that the increases in C17:0 cyc and C19:0 cyc percentages were associated with the decrease in the C16:1 and C18:1 percentages, respectively. Finally, the UFA/SFA ratio was used as an indirect indicator of membrane fluidity. In this sense, strain ST213 showed higher values of the UFA/SFA ratio (Fig. 7) with only acid stress at 4 °C, which decreased this rate.

3.6. Expression of the *rpoS* gene

All of the studied strains significantly increased *rpoS* gene transcription under the evaluated stress conditions when compared with the

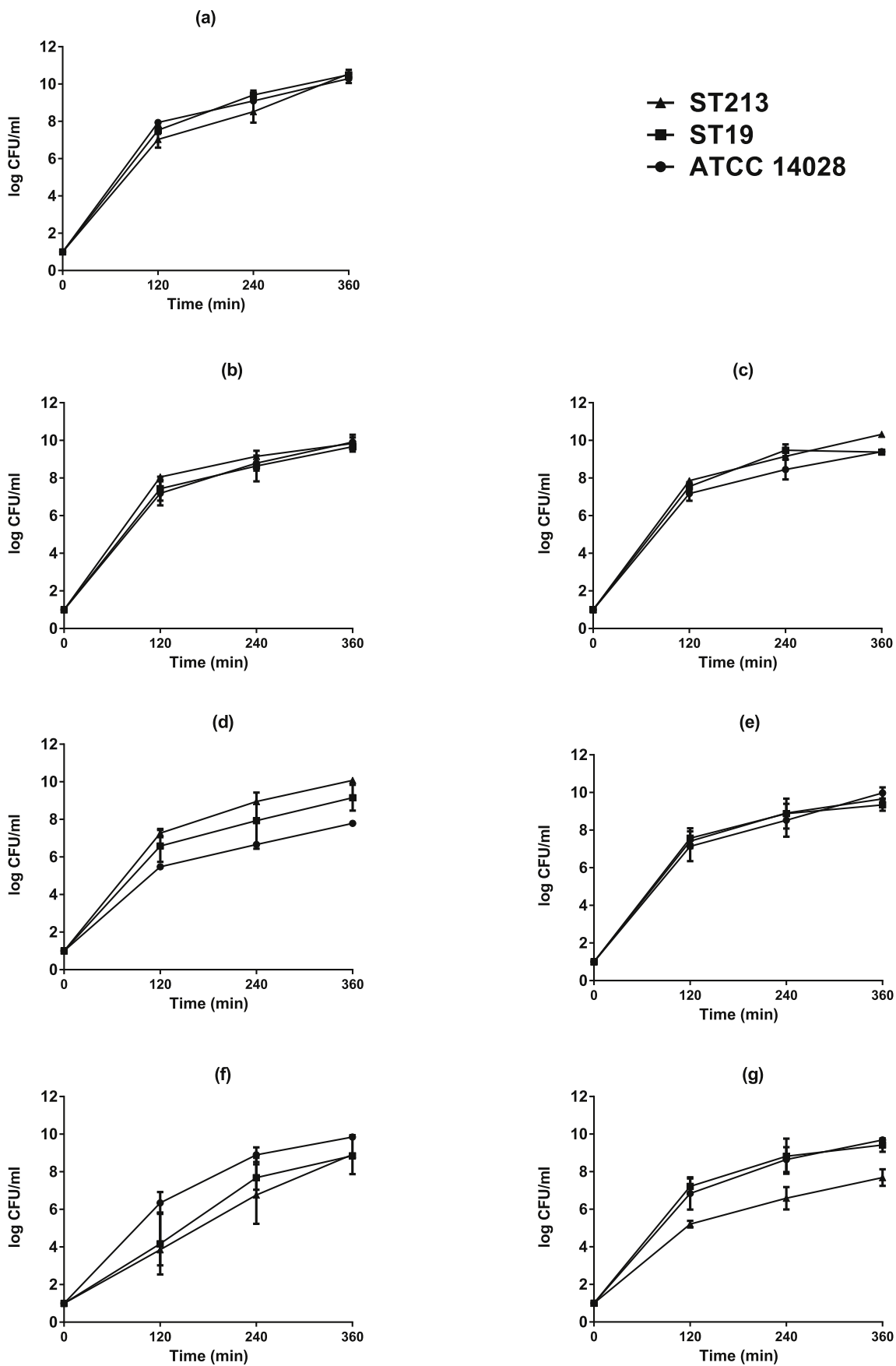


Fig. 2. Recovery of ST19 and ST213 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium genotypes after stress. After the stress conditions: (a) non-stressed, (b) low a_w at 4 °C, (c) low a_w at room temperature, (d) pH 3.5 at 4 °C, (e) pH 3.5 at room temperature, (f) low a_w-pH 3.5 at 4 °C and (g) low a_w-pH 3.5 at room temperature, recovery on liquid LB medium of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains ATCC 14028, ST19 and ST213 for 6 h was monitored. The data represent the mean ± S.E. (n = 6).

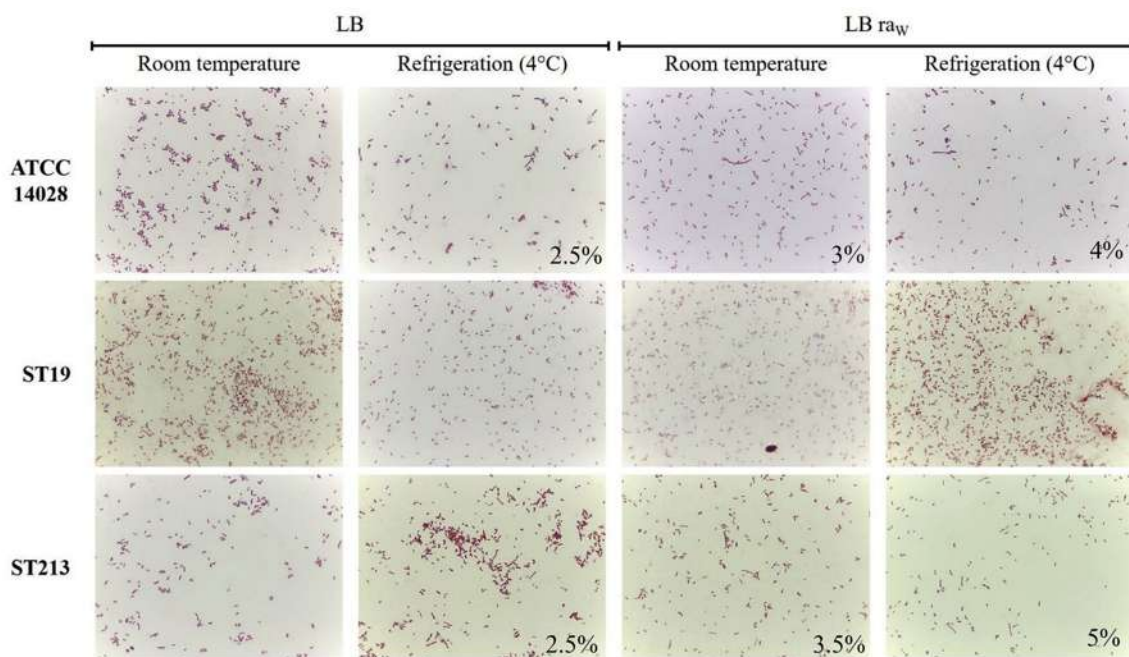


Fig. 3. Cell filamentation of ST19 and ST213 genotypes under stress conditions. *S. enterica* serotype Typhimurium strains, ATCC 14028, ST19 (SAL004) and ST213 (SAL115) were subjected to low a_w in both refrigeration and room temperature for 8 days. Changes in cell morphology were assessed by gram staining. Cells longer than three normal cell lengths were considered filaments. The percentage of filamentous cells in each tested condition is indicated in its respective image. The images are representative of nine independent assays ($n = 9$).

respective stationary phase cultures used as inoculum of the stress assays (Fig. 8). These high expression levels remained in the three strains after 2 h of poststress recovery. The expression of the *rpoS* gene in the stress conditions was higher in the reference strain at 1748-fold for acid pH at room temperature and 1461-fold induction for refrigeration when compared to the nonstress and stationary phase cultures. Regarding ST19, the induction was 114- and 315-fold, whereas ST213 obtained induction at 402- and 210-fold for acid pH at room temperature and refrigeration, respectively. In overnight culture in the stationary phase, both the ST19 (7-fold) and ST213 (9-fold) strains show higher mRNA levels of this gene compared with the reference strain. At 2 h of poststress growth, the transcription levels of this gene in the reference strain were higher than those observed in the stationary phase (241-fold), whereas in the case of the ST19 and ST213 strains, the values obtained were 306- and 342-fold, respectively. The fact that the *rpoS* gene showed high transcription levels, particularly in the reference strain at acidic conditions both under refrigeration and at ambient temperatures, agrees with the high viability percentages observed in this strain. Conversely, both ST19 and ST213 genotypes had higher transcription levels of the *rpoS* gene in the stationary phase.

4. Discussion

All of the studied cellular responses were associated with stress resistance in *S. enterica*. However, to the best of our knowledge, cellular differences in the stress responses between the involved genotypes in prevalent genotype replacement within a geographic area have not been previously reported.

Even though it was initially unexpected, the ST213 strain presented the lowest viability in most of the tested stress conditions. *S. Typhimurium* cells can enter a viable but nonculturable (VBNC) state when subjected to osmotic (Kusumoto et al., 2012), thermal (Reissbrodt et al., 2002), and acidic (Xu et al., 2010) stress. This might help explain the low viability values of the ST213 genotype. The possible superior capability of ST213 over ST19 to enter into the VBNC under stress conditions requires further examination.

The greatest survival variability among the three studied strains was observed at room temperature. In addition, it was observed that the ST213 strain had better viability percentages at pH 3.5 and 4 °C compared to incubation at room temperature. The survival variability among *S. enterica* strains has been attributed to differential physiological and metabolic adaptations in response to unfavorable environmental conditions (Xu et al., 2008). The possible protective effect of refrigeration temperature during acid stress in *S. enterica* has been previously reported. Shah et al. (2013) documents that a preadaptation in cold stress increases the survival of *S. enterica* due to the transcription induction of multiple genes associated with amino acid metabolism, oxidative stress and DNA repair, whereas very few of these genes were induced when only exposed to acid stress. However, Xu et al. (2008) observed that *S. enterica* cells preadapted to pH 5.0 increased their resistance to poststress exposure at pH 4.0 and 4 °C and produced a cross-protection between acid and cold temperature, which was possibly mediated by the acid tolerance response (ATR). Additionally, *S. enterica* is able to tolerate high osmolarity through a biphasic response involving potassium uptake followed by an increase in the cytoplasmic concentration of compatible solutes such as glycine, betaine, carnitine, ectoine, proline and trehalose (Alvarez-Ordóñez et al., 2011). The ATR response and cellular responses to osmotic shock need to be evaluated in detail in genotypes ST213 and ST19.

The results show that the SAL004 and ATCC 14028 strains have significantly different responses to stress associated with food preservation conditions despite both being ST19; such intra-genotype differences might be partially explained by the archival character of the latter strain. Studies on the *S. Typhimurium* ATCC 14028 strain span more than 40 years, and since then, it has been preserved in stock cultures. Once this strain has been provided to a scientific laboratory, it is subjected to continuous serial passages in diverse culture media. It has been widely documented that both archiving and serial passage of reference strains of human pathogenic bacterial species cause the strain to undergo biochemical, physiological and genetic changes (Fux et al., 2005). Significant genetic differences have been found between laboratory reference strains and their clinical counterparts for *Escherichia*

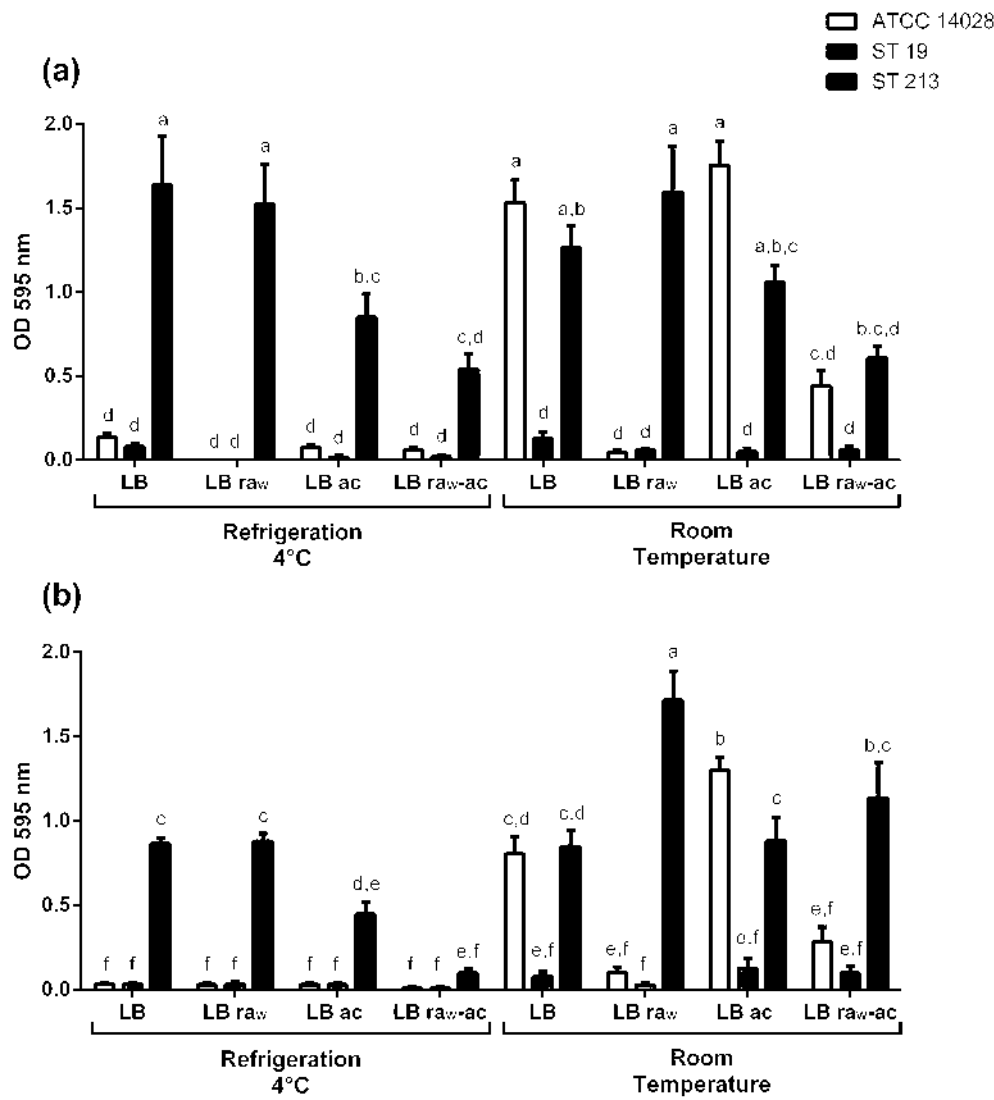


Fig. 4. Biofilm formation by *Salmonella enterica* strains under stress conditions. (a) Biofilm-forming ability and (b) biofilm metabolic activity was evaluated using crystal violet staining and MTT, respectively. The *S. enterica* serotype Typhimurium strains ATCC 14028, ST19 and ST213 were subjected to stress at low a_w (LB ra_w), pH 3.5 (LB ac) and the combination of low a_w and pH 3.5 (LB ra_w-ac) for 8 days, incubated at refrigeration (4°C) or room temperature (≈22°C). The data represent the mean ± S.E. (n = 9). ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was used. Different letters represent significant difference in each condition tested (p < 0.05).

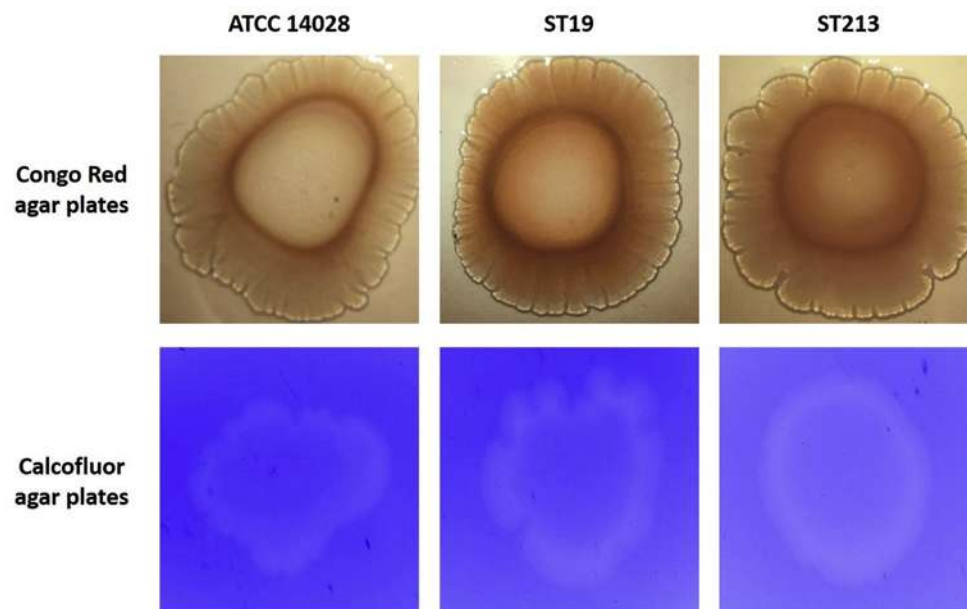


Fig. 5. Morphotype analysis of *Salmonella enterica* strains. The morphotype and the ability to produce cellulose of *S. enterica* serotype Typhimurium strains ATCC 14028, ST19 and ST213 was evaluated with Congo red agar and calcofluor agar, respectively. The images are representative of six independent assays (n = 6). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

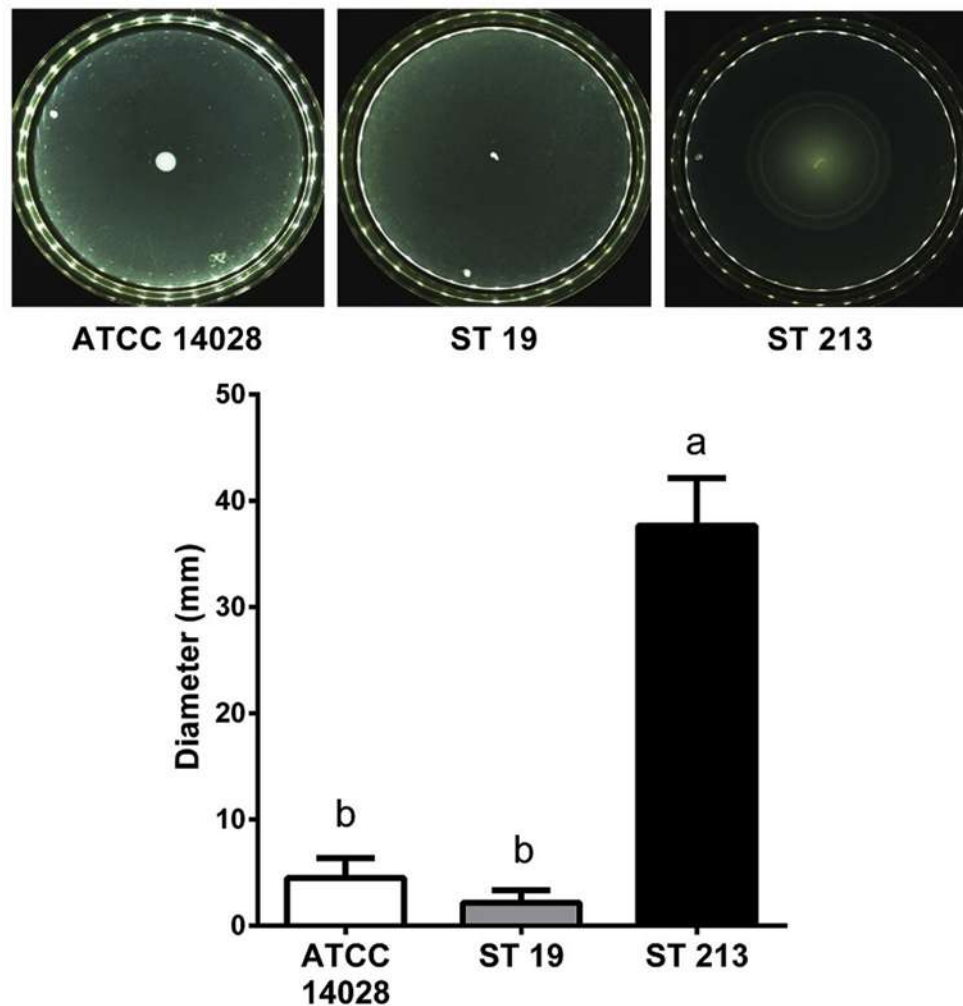


Fig. 6. Swimming motility assessment of *Salmonella enterica* strains. Swimming motility assays were performed in *S. enterica* serotype Typhimurium strains ATCC 14028, ST19 and ST213 cultured on LB 0.3% agar plates. The images are representative of three triplicate independent experiments. Data represent the mean \pm S.E. (n = 9). ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was used. Different letters represent significant difference ($p < 0.05$).

coli, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (Fux et al., 2005). The phenotypic reported changes in pathogenic bacteria include the loss of virulence (Hopkins et al., 1996; Somerville et al., 2002) and flagella (Sellek et al., 2002), as well as physiological changes *in vitro* assays (Cafini et al., 2015). Archival strains of *S. Typhimurium* show genomic rearrangements, including small deletions and insertions and large duplications (Porwollik et al., 2004). Phenotypic changes in *S. Typhimurium* archival strains include rough/smoothness colony morphology, motility, auxotrophic reversion, phage types and prophage-to-phage releases (Eisenstark, 2010). In the specific case of the *S. enterica* ATCC 14028 strain, laboratory passage has induced the loss of the *rdar* morphotype and has generated a high mutation rate in the *rpoS* gene (Davidson et al., 2008). Furthermore, genomic analysis reveals that strain 60-6516, which is the putative ancestor of the 14,028 strain, lacks a 2.3 kbp region that expands the genes *dcuA* (an anaerobic C4-dicarboxylate transporter), *aspA* (aspartate ammonia lyase), and *fxsA* (F exclusion of bacteriophage T7), as well as STM14_5203, which encodes a hypothetical protein of unknown function; this loss presumptively occurred in culture or during recent cultivation of the 60–6516 strain (Jarvik et al., 2010).

The ability of *S. enterica* cells to form filaments has been previously associated with sublethal stress conditions (Humphrey et al., 2011; Kieboom et al., 2006; Mattick et al., 2000). Filamentation in bacteria occurs when cell growth continues in the absence of cell division and results in the formation of elongated bacteria that have multiple copies

of chromosomes (Justice et al., 2008). It has been suggested that osmotic stress causes inhibition of the production or action of proteins involved in cell division (e.g., FtsZ) in *S. enterica* and thus blocks septation, but allows the function of proteins involved in biomass formation, which could provide a survival advantage in unfavorable environments. Once conditions are favorable, septation can be resumed, and it rapidly results in a large number of viable *S. enterica* cells that are ready to continue replicating (Kieboom et al., 2006; Mattick et al., 2000; Stackhouse et al., 2012). This might be one of the reasons why, despite having a lower percentage of viability than the SAL004 and ATCC 14028 strains, the ST213 strain has similar recovery curves to these ST19 strains in some of the analyzed stress conditions.

Foodborne bacteria submitted to stress directs the cellular metabolism for survival and avoids the use of ATP for cell division (Jones et al., 2013). Under acid stress, bacteria use their available energy to change: (1) the membrane fatty acid composition to make it less permeable to protons, (2) the synthesis of DNA binding proteins to avoid acid damage of the genetic material, and (3) the activation of metabolic pathways that consume protons. Under reduced water availability, bacterial cells maintain turgor pressure by incorporating compatible soluble metabolites via active transport or by synthesizing them, if they are not available, and limiting the energy available for cell division. At low temperatures, the proteins required for energy generation, such as the tricarboxylic acid (TCA) cycle and electron transport, are upregulated in the context of low energy availability for

Table 2
Fatty acid composition of *S. enterica* Typhimurium strains grown under different conditions.

Strain	Growth conditions	Fatty acid (%)					
		C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:0 cyc
ATCC	Without stress	2.6 ± 0.8a	9.2 ± 0.6 a	39.6 ± 1.1 a	5.8 ± 1.5 e	0.9 ± 0.4 e,f	19.3 ± 0.9 a
	pH 3.5 4 °C	2.7 ± 0.5 a	9.1 ± 0.5 a	40.3 ± 1.1 a	7.2 ± 0.3 e	1.0 ± 0.3 e,f	15.3 ± 2.5 b
	pH 3.5 RT	2.4 ± 0.0 a	7.2 ± 0.0 b,c	36.9 ± 0.0 b	8.3 ± 0.0 c,d,e	0.8 ± 0.0 f	14.3 ± 0.0 b,c
ST19	Without stress	2.7 ± 0.6 a	8.3 ± 0.2 a,b	35.4 ± 0.8 b,c	10.2 ± 1.0 b,c,d	2.1 ± 0.0 b,c,d	16.2 ± 1.4 b
	pH 3.5 4 °C	3.1 ± 0.7 a	8.6 ± 1.5 a,b	36.5 ± 0.5 b	7.5 ± 0.7 d,e	2.8 ± 0.9 a	17.1 ± 2.1 a,b
	pH 3.5 RT	3.0 ± 0.4 a	6.6 ± 0.4 c,d	32.6 ± 1.9 d	14.8 ± 2.4 a	1.5 ± 0.2 d,e	12.7 ± 1.2 c,d
ST213	Without stress	2.8 ± 0.7 a	5.4 ± 0.7 d,e	33.3 ± 1.3 c,d	15.1 ± 1.1 a	2.4 ± 0.2 a,b,c	8.8 ± 0.2 e
	pH 3.5 4 °C	2.5 ± 0.0 a	5.3 ± 0.4 e	35.2 ± 1.4 b,c	11.0 ± 0.9 b,c	2.6 ± 0.2 a,b,c	10.4 ± 0.3 d,e
	pH 3.5 RT	3.4 ± 1.0 a	5.7 ± 0.4 d,e	32.2 ± 3.1 d	13.2 ± 4.5 a,b	1.9 ± 0.4 c,d	9.5 ± 2.0 e

Strain	Growth conditions	Fatty acid (%)					
		C18:0	C18:1	C19:0 cyc	Minor FA	SFA	UFA
ATCC	Without stress	1.4 ± 0.2 b	7.8 ± 1.7 f	5.7 ± 1.5 a	7.7 ± 0.2 c,d	86.2 ± 3.3 a	13.8 ± 3.3 f
	pH 3.5 4 °C	2.0 ± 0.6 a	10.7 ± 2.2 e,f	4.5 ± 0.6 a,b	7.2 ± 0.4 d	81.9 ± 2.0 a,b	18.1 ± 2.0 e,f
	pH 3.5 RT	1.2 ± 0.0 a,b	16.0 ± 0.0 c,d	5.5 ± 0.0 a	7.5 ± 0.0 c,d	74.8 ± 1.9 d	25.2 ± 1.9 c
ST19	Without stress	1.3 ± 0.2 b,c	12.5 ± 1.0 d,e	2.4 ± 0.3 c,d	9.0 ± 0.4 a,b	76.5 ± 1.8 c,d	23.5 ± 1.8 c,d
	pH 3.5 4 °C	1.1 ± 0.3 b,c	10.8 ± 3.8 e,f	3.5 ± 0.8 b,c	9.0 ± 0.5 a,b	81.1 ± 3.3 b,c	18.9 ± 3.3 d,e
	pH 3.5 RT	0.5 ± 0.2 d	17.1 ± 2.3 b,c	2.2 ± 0.7 c,d	9.0 ± 0.6 a,b	67.1 ± 3.8 e,f	32.9 ± 3.8 a,b
ST213	Without stress	1.2 ± 0.1 b,c	21.1 ± 1.2 a	1.6 ± 0.2 d	8.4 ± 0.4 b,c	62.9 ± 0.2 f	37.1 ± 0.2 a
	pH 3.5 4 °C	1.5 ± 0.1 b	20.4 ± 0.1 a,b	3.2 ± 0.5 b,c	8.0 ± 0.3 b,c,d	68.1 ± 1.1 e	31.9 ± 1.1 b
	pH 3.5 RT	0.9 ± 0.4 c,d	20.3 ± 1.5 a,b	3.0 ± 1.5 c,d	9.8 ± 1.8 a	65.6 ± 4.4 e,f	34.4 ± 4.4 a,b

Minor FA: Minor fatty acids. SFA: Total saturated fatty acids. UFA: Total unsaturated fatty acids. The data represent the mean ± S.D. (n = 3). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference in each fatty acid column (p < 0.05).

protein synthesis, which indicates that cellular filamentation is a result of the stringent response or starving response (Jones et al., 2013). All of these cytological, biochemical and physiological processes are under the control of global transcription regulators and, in some cases, include *rpoS* and consume large amounts of ATP, which limits their availability for cell division. Thus, the available data suggest that cellular filamentation is a consequence of cellular processes that consume energy rather than a direct bacterial cytological strategy to resist stress. However, filamentation in *S. enterica* and other foodborne bacteria is relevant from a public health perspective because filamentous cells form single colonies when plated on solid agar medium and cause lower CFU counts in a food samples and the underestimation of bacterial numbers in current assessments and predictive models (Jones et al., 2013). Thus, the ST213 strain represents a higher public health risk than ST19. Additionally, slightly higher filamentous cells were observed in ST213 than in ATCC 14028 and might contribute to lower counts in some of the recovery kinetics.

Another strategy employed by *S. enterica* in adverse conditions is biofilm formation, which is defined as a community of bacterial cells immersed in a polymeric matrix that adheres to inert or living surfaces and gives protection to bacteria against environmental stress, disinfectants and the host immune system (Steenackers et al., 2012). It has been reported that biofilm formation by *S. enterica* is strongly strain-

dependent and is affected by environmental conditions (Lianou and Koutsoumanis, 2011), but present work documents genotype significant differences to form a biofilm under stress conditions associated with food preservation. Vestby et al. (2009) screened 148 *S. enterica* strains, and 23% displayed bdar morphology. Their results indicate that cellulose is not a major component of the *S. enterica* biofilm matrix. In this sense, other components, such as curli fimbriae, which is the large secreted BapA protein (proteinaceous fraction), and the O-antigenic capsule (exopolysaccharide fraction) could be involved in biofilm formation (Steenackers et al., 2012).

It should be noted that motility is also important for biofilm formation (Mireles et al., 2001), whereas other data suggest that flagellin, not motility *per se*, is necessary for biofilm formation (Kim and Wei, 2009; Prouty and Gunn, 2003; Römling, 1999), thus the motility observed by the ST213 strain could be involved in the formation of biofilm. Interestingly, the motility data of the ATCC 14028 strain are heterogeneous in the literature, with several studies reporting a higher swimming capability than the present study (Ballesteros et al., 2018; Birhanu et al., 2018; Marshall and Gunn, 2015), and at least one other work reported lower motility (Kim and Kwon, 2013) than our data. Despite all of the cited references and present work that used the same motility assay in LB medium, such discordance might be partially explained by differences in the incubation time before reading the

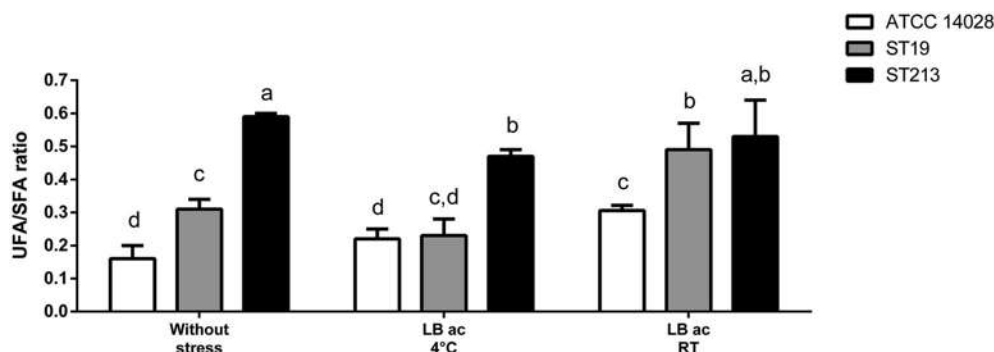


Fig. 7. The UFA/SFA ratio of *Salmonella enterica* under different conditions. Influence of acid pH on the UFA/SFA ratio of *S. enterica* serotype Typhimurium strains incubated at refrigeration (4 °C) or room temperature (≈22 °C) for 8 days. The data represent the mean ± S.D. (n = 3). ANOVA with Tukey's multiple comparisons was used. Different letters represent significant difference (p < 0.05).

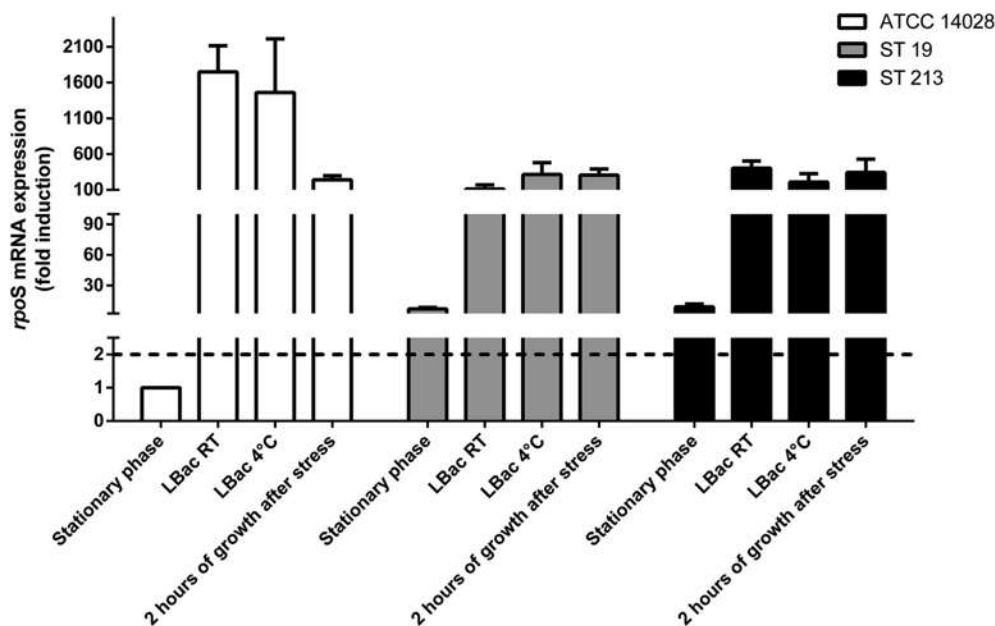


Fig. 8. Relative fold change in the *rpoS* gene expression. The relative expression of stressed *S. enterica* serotype Typhimurium strains in LB medium at pH 3.5 (LB ac) incubated for 8 days under refrigeration (4 °C) or at room temperature (RT, ≈22 °C) and strains with 2 h of growth in standard LB medium after stress in LB ac at 4 °C was compared with strains at stationary phase (overnight growth) in standard LB medium. The results were normalized using ATCC strain in stationary phase.

swimming halo. Additionally, LB medium includes peptone in its formulation, and it has been documented that different peptone sources cause significant differences in the motility results of the ATCC 14028 strain (Gray et al., 2006). In addition, previously discussed storage and medium passages of the ATCC 14028 strain might also account for the motility variations among studies. Like motility, filamentation has also been associated with biofilm formation. As a complex multicellular structure, the division of labor among different cell types (Claessen et al., 2014), and filamentous cells has been observed within biofilms of pathogenic bacteria (Justice et al., 2008). To the best of our knowledge, no filamentous cells have been described in *S. enterica* biofilms that were generated as a response to stress. In enterobacteria, filamentous cells are present during biofilm formation in cold adapted *E. coli*, but it does not appear to enhance the attachment to food surfaces compared to biofilms with non-filamentous cells (Visvalingam and Holley, 2013). Thus, biofilm cellular complexity in *S. enterica*, particularly among ST19 and ST213 genotypes, remains a pending task to be addressed in future studies.

In addition to its relevance in stress tolerance, diverse lines of evidence relate biofilm formation with virulence in *S. enterica*. For instance, biofilm cells highly overexpress *stn* (enterotoxin) and *invA* genes at pH 6 compared to planktonic cells (Xu et al., 2010). Further work demonstrates that the *spiA* gene product has a role in biofilm formation in addition to its participation as a component of the virulence factor SPI-2 type III secretion system (Dong et al., 2011). Physiological evidence shows that biofilm cells show higher adhesive capability in the spleens of mice than planktonic ones (Turnock et al., 2002). However, Borges et al. (2018) do not find a relationship among *in vivo* pathogenicity and the capability of biofilm formation of Typhimurium strains isolated from salmonellosis outbreaks and poultry. Further work needs to be conducted to assess the possible relationship between the biofilm formation capability of the ST213 genotype and its virulence. Furthermore, ST213 swarming capability and biofilm formation are associated with higher antibiotic resistance (Baugh et al., 2012; Butler et al., 2010; Turnbull and Surette, 2008). Thus, a detailed analysis of the relationships between the stress response and antibiotic resistance of ST19 and ST213 is necessary to better understand replacement of the former by the latter genotype and its implications on public health.

Fatty acid composition of the plasma membrane determines its fluidity, and several studies have suggested a relationship between the degree of membrane fluidity and stress tolerance (Álvarez-Ordóñez et al., 2012). For instance, at an acidic pH, the *S. enterica* plasma

membrane reduces UFA and increases SFA contents, which is mainly cyclopropane fatty acids (CFA). Such changes diminish membrane fluidity, which has been associated with higher resistance to an acidic environment (Álvarez-Ordóñez and Prieto, 2010; Álvarez-Ordóñez et al., 2008; Kim et al., 2005; Yang et al., 2014). Furthermore, our results agree with previously documented significant changes in fatty acid, protein, and carbohydrate profiles in the *S. Typhimurium* biofilm cells exposed to acidic conditions (Xu et al., 2010), which clearly shows specific metabolic responses and changes in cell surface hydrophobicity related to acidic stress.

Most of the previously discussed cellular responses to stress are closely related to regulation by alternative sigma factor RpoS. For example, entrance in the stationary phase by *S. enterica* and other gram-negative bacteria involves several metabolic, biochemical, and genetic change characteristics of this state, which is fine-tuned by alternative sigma factor RpoS (Navarro-Llorens et al., 2010). Because cells in this study used for the stress tests were from overnight growth and reached a stationary phase, this might explain the lack of a lag phase of the studied genotypes in recovery growth. Higher transcriptional levels at the stationary phase for both evaluated genotypes indicate that they were better prepared to face stressful conditions than the reference strain, which explains their lower transcriptional increase when entering into such conditions. It will be interesting to conduct further work to analyze the differences in poststress recovery of log-phase cells between both studied genotypes. Additionally, strain differences in the stress response have been associated with point or larger mutations in key genes, such as *rpoS*, but might also be caused by differential expression of RpoS (σ^S)-dependent genes due to mutations that affect the transcript translation of this gene or the generation of an unstable σ^S protein whose function is affected (Lianou and Koutsoumanis, 2013).

Some of the genes involved in the biphasic response to tolerate high osmolarity are regulated by the σ^E factor (Spector and Kenyon, 2012), which, along with the E (σ^E) factor, plays a relevant role in the response to osmotic stress. McMeechan et al. (2007) demonstrated that *rpoS* and *rpoE* defective mutants of *S. enterica* had a low survival in a hyperosmotic environment; it is of further interest to obtain these kinds of defective mutants in the evaluated genotypes to evaluate the survival in stress conditions. Low transcription levels of the *rpoS* gene after 2 h poststress recovery might explain the similar recovery kinetics shown by the ST19 and ST213 strains, even though the ST213 strain in most stress conditions presented lower percentages of viability. This could be due to a possible competition between σ^{70} and σ^S for the binding site in

RNA polymerase, which establishes a balance between the resources that an organism dedicates to growth/replication (σ^{70}) and maintenance/repair (σ^S) (Aertsen and Michiels, 2004). A subtle overproduction of σ^{70} stops the transcription of genes requiring σ^S , and cells become sensitive to stress; conversely, the overexpression of σ^S attenuates the expression of genes requiring σ^{70} . This antagonism between sigma factors has been shown to be highly regulated and is related to the nutritional quality of the environment and the hormone-like nucleotide ppGpp (Jishage, 2002; Nyström, 2002). Interestingly, Kim et al. (2005) found that σ^S expression reduces C19:0 cyc production but not C17:0 cyc in congruence with our observation of high σ^S expression and low C19:0 cyc content in the studied strains.

Beyond physiological characteristics (biochemical and genetic characteristics associated with archival and serial passages of the ATCC 14028 reference strain previously stated), intra-genotype variation of ST19 clinical strains have been documented, particularly regarding antibiotic profile resistance, *in vitro* human macrophage invasion, and motility (Panzenhagen et al., 2018). Comparative genomic analysis reveals that clinical ST19 strains from Brazil have split into two lineages, one of which showed genome degradation affecting genes coding for proteins related to membrane, SOS response, and transcriptional regulation (Panzenhagen et al., 2018). It is still unknown whether the ST19 (SAL004) environmental strain in this study is undergoing the same or a similar process of genome degradation that will aid in explaining their differences with the ATCC 14028 reference strain. Besides the present work, there is only one previous experimental characterization of an ST of the Typhimurium serotype involved in the replacement of a prevalent genotype in one country/geographical region, which corresponds to the ST313 genotype first detected in sub-Saharan Africa (Feasey et al., 2012; Okoro et al., 2012), which have also started to replace the ST19 genotype as iNTS. Genomic analysis revealed the presence of two lineages among the ST313 African strains (Okoro et al., 2012) and subsequent work documented a clear differentiation among Brazilian and African lineages (Panzenhagen et al., 2018). Despite this, initial studies conducted to characterize the ST313 genotype strains showed no significant differences in non phagocytic cell invasion, Caspase-1-dependent macrophage death induction, IL-1 β release, and transcription levels of *sopE2* and *flhC* genes; however, all ST313 strains showed significant differences in such characteristics with all ST19 studied strains (Carden et al., 2015). In contrast, recent work comparing ST313 strains from Brazil and Africa found significant phenotypical differences among them (Almeida et al., 2017; Panzenhagen et al., 2018). Based on these antecedents of clinical strains of the ST19 and ST313 genotypes, we anticipate that further studies characterizing new clinical and environmental isolates of ST19 and ST213 genotypes from co-occurrence areas will document high intra-(ST) genotypic and physiological variability.

It is important to emphasize that the ST313 genotype was exclusively isolated from asymptomatic carriers and systemic invasive disease in Africa, and there is a lack of knowledge of its relevance on gastroenteritis (Feasey et al., 2012), whereas the ST213 genotype in this study was isolated from contaminated food and stool samples (Wiesner et al., 2009). Such differences in the sample provenance might determine genotype adaptation to host interactions and make it relevant from a public health perspective; it appears that genomic and physiological particularities of the ST313 genotype evolved to become human adapted and were spread by person-to-person transmission to cause iNTS (Feasey et al., 2012). If the food and gastroenteritis associated origin of ST213 strains demand a similar or different set of genomic, biochemical and physiological changes than ST313, then this is an interesting issue to address in further studies.

5. Conclusions

Although ST19 has high survival percentages, and recovery and σ^S transcription are shown to be similar between tested genotypes, ST213

displays higher capability to cell elongation, biofilm formation, motility, and membrane modification in stress conditions. Such characteristics might confer to ST213 the capability to survive and disperse outside the human host. This may partially help to explain the increase in food and clinical prevalence in Mexico, replacement of the ST19 genotype, and its recent dispersion to other countries. Collectively, this work shows that differential cell responses might subtly occur between the ST19 and ST213 genotypes of the Typhimurium serotype at the intraspecific level. Studies of the genotypes involved in turnover at other geographical areas still need to be conducted to determine if these cellular modifications are also present in current genotypes over displaced ones or if other stress resistance mechanisms are present.

Further studies are necessary to have a clearer picture of cellular differences between the STs analyzed and how differences emerge. Additionally, complementary work is needed to evaluate if ST213 stress resistance mechanisms increase its virulence. These kinds of data will aid in improving food production chain conditions and surveillance programs to avoid outbreaks by new circulating variants of *S. enterica* serotype Typhimurium.

Acknowledgements

We thank Estefania Saucedo Correa for her technical help in the fatty acids analysis and Dr. Ricardo Iván Medina-Estrada for his support in the flow cytometry assays. Thanks are given to CONACYT for the graduate scholarship granted to AGB (No. 267287). This project received support from CIC-UMSNH within 2019 research program. This work is in memoriam J.V.Y.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.010>.

References

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S., 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* 8, e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>.
- Aertsen, A., Michiels, C.W., 2004. Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, 263–273. <https://doi.org/10.1080/10408410490884757>.
- Altier, C., 2005. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J. Microbiol.* 43 Spec No., 85–92.
- Almeida, F., Seribelli, A.A., da Silva, P., Medeiros, M.I.C., Dos Prazeres, R.D., Moreira, C.G., Allard, M.W., Falcão, J.P., 2017. Multilocus sequence typing of *Salmonella* Typhimurium reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 51, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.009>.
- Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., Lopez, M., Bernardo, A., Hill, C., 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology* 157, 3268–3281. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050351-0>.
- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., 2010. Changes in ultrastructure and fourier transform infrared spectrum of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells after exposure to stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7598–7607. <https://doi.org/10.1128/AEM.00312-10>.
- Álvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., Prieto, M., 2015. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004>.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R., Bernardo, A., 2008. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.015>.
- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., López, M., 2012. The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: an adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Res. Int.* 45, 482–492. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.002>.
- Arnold, D.L., Jackson, R.W., Waterfield, N.R., Mansfield, J.W., 2007. Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. *Trends Genet.* 23, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.017>.
- Castañeda, M.del R.Aya, Sarnacki, S.H., Noto Llana, M., López Guerra, A.G., Giacomodonato, M.N., Cerquetti, M.C., 2015. Dam methylation is required for efficient biofilm production in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.003>.
- Bale, J., Meunier, D., Weill, F., DePinna, E., Peters, T., Nair, S., 2016. Characterization of

- nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4788–4794. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4788-4794.2002>.
- Robbe-Saule, V., Algorta, G., Rouilhac, I., Norel, F., 2003. Characterization of the RpoS status of clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4352–4358. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4352-4358.2003>.
- Römling, U., 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00469-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00469-3).
- Sellek, R.E., Escudero, R., Gil, H., Rodríguez, I., Chaparro, E., Pérez-Pastrana, E., Vivo, A., Anda, P., 2002. In vitro culture of *Borrelia garinii* results in loss of flagella and decreased invasiveness. *Infect. Immun.* 70, 4851–4858. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4851-4858.2002>.
- Shah, J., Desai, P.T., Chen, D., Stevens, J.R., Weimer, B.C., 2013. Preadaptation to cold stress in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium increases survival during subsequent acid stress exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7281–7289. <https://doi.org/10.1128/AEM.02621-13>.
- Somerville, G.A., Beres, S.B., Fitzgerald, J.R., DeLeo, F.R., Cole, R.L., Hoff, J.S., Musser, J.M., 2002. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. *J. Bacteriol.* 184, 1430–1437. <https://doi.org/10.1128/JB.184.5.1430-1437.2002>.
- Spector, M.P., Kenyon, W.J., 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res. Int.* 45, 455–481. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>.
- Stackhouse, R.R., Faith, N.G., Kaspar, C.W., Czuprynski, C.J., Wong, A.C.L., 2012. Survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis filaments induced by reduced water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2213–2220. <https://doi.org/10.1128/AEM.06774-11>.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45, 502–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>.
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C., 2014. The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS One* 9, e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>.
- Trafny, E.A., Lewandowski, R., Zawistowska-Marciniak, I., Stępińska, M., 2013. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1635–1643. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1326-0>.
- Turnbull, A.L., Surette, M.G., 2008. L-Cysteine is required for induced antibiotic resistance in actively swarming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 154, 3410–3419. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/020347-0>.
- Turnock, L.L., Somers, E.B., Faith, N.G., Czuprynski, C.J., Lee Wong, A.C., 2002. The effects of prior growth as a biofilm on the virulence of *Salmonella typhimurium* for mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 43–48. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(01\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(01)00019-4).
- Vestby, L.K., Møretør, T., Ballance, S., Langsrud, S., Nesse, L.L., 2009. Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. *BMC Vet. Res.* 5, 43. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-43>.
- Visvalingam, J., Holley, R.A., 2013. Adherence of cold-adapted *Escherichia coli* O157: H7 to stainless steel and glass surfaces. *Food Control* 30, 575–579. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.010>.
- Wang, H., Dong, Y., Wang, G., Xu, X., Zhou, G., 2016. Effect of growth media on gene expression levels in *Salmonella* Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. *Food Control* 59, 546–552. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.026>.
- Wiesner, M., Calva, J.J., Bustamante, V.H., Pérez-Morales, D., Fernández-Mora, M., Calva, E., Silva, C., 2016. A multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the bla_{CMY-2} gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC Microbiol.* 16, 18. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0633-7>.
- Wiesner, M., Zaidi, M.B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J.J., Silva, C., 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* 9, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>.
- Xu, H., Lee, H.-Y., Ahn, J., 2010. Growth and virulence properties of biofilm-forming *Salmonella enterica* serovar Typhimurium under different acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7910–7917. <https://doi.org/10.1128/AEM.01508-10>.
- Xu, H., Lee, H.Y., Ahn, J., 2008. Cross-protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 290–297. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02429.x>.
- Yang, Y., Khoo, W.J., Zheng, Q., Chung, H.-J., Yuk, H.-G., 2014. Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. *Int. J. Food Microbiol.* 172, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.006>.

CAPÍTULO II

Crecimiento y formación de biofilm bajo diferentes sustratos de los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica* Typhimurium aislados de muestras de alimentos

1. Introducción

Las enfermedades gastrointestinales representan una gran carga de morbilidad, mortalidad y costos económicos a nivel mundial. El consumo de alimentos contaminados por bacterias, virus, parásitos, sustancias químicas y priones es la principal causa de los brotes o casos esporádicos de enfermedades gastrointestinales en todos los países del mundo (Fletcher et al., 2013; Kirk et al., 2015). Se estima que en 2010 ocurrieron alrededor de 2 mil millones de enfermedades gastrointestinales, siendo *Salmonella enterica* responsable de aproximadamente 180 millones de casos de enfermedad y más de 150 mil muertes (Kirk et al., 2015).

S. enterica es una bacteria Gram-negativa y enteropatogénica facultativa de distribución global. En el transcurso de la evolución, esta bacteria ha logrado sobrevivir y adaptarse a condiciones ambientales y de hospedero, en parte debido a cambios en la modulación de la expresión de genes. Esta adaptación es esencial para la virulencia de este organismo, lo cual afecta la salud humana y la economía mundial por los costos asociados a los tratamientos (Humphrey, 2004; López et al., 2012).

La disponibilidad de nutrientes es de vital importancia para las bacterias patógenas, ya que la actividad metabólica bajo ciertos sustratos de carbono y nitrógeno les permite usarlos como fuente de energía para proliferar, colonizar la barrera epitelial, producir factores de virulencia, responder a la respuesta inmune del hospedero y finalmente transmitirse a otros hospederos o sobrevivir en el medio ambiente (Staib y Fuchs, 2014). Como parte de su ciclo de vida, *S. enterica* se enfrenta a periodos de inanición o falta de nutrientes en su paso por microambientes naturales, comerciales y del hospedero. Para sobrevivir, este patógeno depende de distintas respuestas genéticas, bioquímicas y fisiológicas que se activan en dichas condiciones. Algunas de estas respuestas incluyen la activación de transportadores y/o sistemas catabólicos de fuentes alternativas o inusuales de carbono; así como la expresión de sistemas anaeróbicos de respiración para controlar la tasa de utilización de la fuente de energía y disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (Spector y Kenyon, 2012).

La disponibilidad de nutrientes también tiene efecto sobre la formación de biofilm, una comunidad de microorganismos en la que las células con frecuencia se incrustan en una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que se adhieren entre sí

y/o a una superficie (Flemming et al., 2016). La formación de biofilm representa el modo de crecimiento bacteriano más común en la naturaleza y permite que los microorganismos sobrevivan en ambientes hostiles y se dispersen para colonizar nuevos nichos (Hall-Stoodley et al., 2004). La formación de la matriz extracelular del biofilm representa un costo energético considerable; sin embargo, este costo puede justificarse con base en que la matriz permite que el biofilm capture de forma más eficiente los nutrientes del medio ambiente en comparación con células individuales, debido a las propiedades de absorción de la matriz (Flemming et al., 2016). La formación de biofilm es una estrategia de persistencia empleada durante el proceso de infección de especies bacterianas patógenas (Bjarnsholt et al., 2013; Koo et al., 2018), por lo que su estudio es de relevancia clínica y de salud pública.

Los datos epidemiológicos de *S. enterica* han demostrado un continuo cambio en la prevalencia de ciertos serotipos en varias regiones del mundo (Galanis et al., 2006; Herikstad et al., 2002; Olsen et al., 2001). De igual manera se han observado fenómenos de reemplazo de genotipos determinados por secuencias tipo (ST). Por ejemplo en Sudáfrica, el genotipo ST313 ha reemplazado al ST19 como el genotipo más prevalente en esta región (Okoro et al., 2012) y en China el genotipo ST34 ha emergido como uno de los más abundantes, junto con el ST19 (Sun et al., 2014).

En México, se ha observado que el genotipo ST213 ha desplazado al ST19 en muestras clínicas de 2002-2005 (Wiesner et al., 2009), así como en muestras de alimentos contaminados en el periodo 2008-2011 (Vázquez-Garcidueñas, datos no publicados). Dicho reemplazo tiene un impacto a nivel mundial, ya que el genotipo ST19 que pertenece al serotipo Typhimurium es el más abundante en varias regiones del mundo y constituye el genotipo fundador del resto de ST's dentro del serotipo Typhimurium (Achtman et al., 2012), mientras que el genotipo ST213 fue descrito por primera vez en México (Wiesner et al., 2009) y ha comenzado a encontrarse en otros países (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>).

En este trabajo se comparó el crecimiento y la formación de biofilm en presencia de 96 sustratos distintos de las cepas ST19 y ST213 y el efecto del estrés bajo condiciones de preservación de los alimentos como baja actividad de agua, pH ácido y refrigeración en dichos procesos.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas

Las cepas de estudio fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán. Pertenecen a los genotipos ST19 (SAL004) y ST213 (SAL115), ambas serotipo Typhimurium y aisladas de queso. Para la asignación de secuencia tipo se empleó el esquema de 7 loci de acuerdo al protocolo descrito en el sitio web MLST (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html), determinando los perfiles alélicos para los genes de mantenimiento *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* y *thrA*. Los números de alelos y secuencias tipo fueron asignadas de acuerdo a la base de datos MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). La cepa de referencia ATCC 14028 de *S. enterica* serotipo Typhimurium fue usada con fines comparativos de cepas de la misma secuencia tipo (ST19).

2.2. Condiciones de cultivo

Lo cultivos en condiciones control, sin estrés, se realizaron inoculando una colonia de las cepas de estudio en 10 ml de caldo Luria-Bertani (LB) e incubando toda la noche a 37°C y 180 rpm. Para las condiciones de cultivo simulando estrés asociado a la preservación de los alimentos, como actividad de agua (a_w) reducida, pH ácido y refrigeración, se siguió el protocolo descrito por Humphrey *et al.*, (2011). Se modificó la formulación del caldo LB para simular condiciones de estrés con NaCl y HCl hasta lograr la concentración de sal y pH deseados, correspondientes a NaCl 685 mM (LB $_{a_w}$) y pH 3.5 (LB $_{ac}$). Los cultivos bacterianos en condiciones de estrés se prepararon inoculando una colonia en 10 ml de caldo LB e incubando toda la noche a 37°C y 180 rpm. El cultivo se centrifugó a 1360 x g por 4 minutos y la pastilla se re-suspendió en 10 ml de caldo LB $_{a_w}$ o LB $_{ac}$. Los cultivos fueron incubados estáticamente a temperatura ambiente ($\approx 22^\circ\text{C}$) o en refrigeración (4°C) por 8 días.

2.3. Ensayos de versatilidad metabólica

Se evaluó la capacidad de las cepas de estudio provenientes de condiciones de cultivo sin estrés y previamente estresadas para crecer en diferentes sustratos, utilizando las microplacas GEN III (Biolog, Inc., Hayward, CA). Dichas placas permiten analizar la capacidad de un microorganismo para metabolizar 71 fuentes de carbono distintas y de crecer en 23 químicos inhibitorios, dando un total de 94 ensayos fenotípicos realizados

simultáneamente. Los cultivos bacterianos bajo las diferentes condiciones, con y sin estrés, se centrifugaron a 1360 x g por 4 minutos, se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 10 ml de buffer salino de fosfatos (PBS) estéril y se volvió a centrifugar. La pastilla obtenida se diluyó en fluido de inoculación (0.40% NaCl, 0.03% Pluronic F-68, 0.02% Gellan Gum) hasta alcanzar una turbidez del 61% empleando un turbidímetro (Biolog, Inc., Hayward, CA). Finalmente se colocaron 100 µl del fluido de inoculación en cada uno de los pozos de la microplaca, se incubó a 37°C de manera estática y se hicieron lecturas a 595 nm a las 0, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h en una Biolog MicroStation (Biolog, Inc., Hayward, CA). Con los datos obtenidos se calculó el área bajo la curva (AUC).

2.4. Formación de biofilm en diferentes sustratos

Al finalizar el ensayo de crecimiento en diferentes sustratos, se utilizaron las mismas placas para evaluar la formación de biofilm mediante un ensayo colorimétrico tiñendo con cristal violeta (Burton et al., 2006). Se removió el fluido de inoculación de cada pozo, se lavó tres veces con 200 µl de PBS y se dejó secar por 15 minutos a temperatura ambiente. Las células adheridas en cada pozo fueron teñidas con 100 µl de cristal violeta (0.4% w/v) por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el cristal violeta no unido a cada pozo, se lavó tres veces con 200 µl de PBS y se secó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de ácido acético al 33% (v/v) a cada pozo y se incubó por 15 minutos. La microplaca fue leída a 595 nm usando una Biolog MicroStation (Biolog, Inc., Hayward, CA). De manera independiente se añadió fluido de inoculación sin bacteria a cada pozo de microplacas GEN III y se tiñeron con cristal violeta, esto para observar si había coloración por efecto del sustrato en cada pozo. También se evaluó la capacidad de cada cepa sin estrés de formar biofilm en caldo LB incubadas por 48 h a 37°C en placas de 96 pozos sin ningún sustrato.

2.5. Análisis estadístico

Se realizaron tres ensayos independientes para cada cepa y condición de estrés. Con los datos obtenidos de la cinética de crecimiento se calculó el área bajo la curva (AUC). Para considerar positivo el crecimiento, así como la formación de biofilm, se utilizó la prueba ANOVA *post hoc* Dunnett ($p < 0.05$) usando los valores del pozo con agua como control negativo. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 6.0. Los mapas de

calor se realizaron mediante el software JMP 6.0.0. Los dendrogramas se realizaron con el coeficiente de correlación de Pearson por el método UPGMA mediante el software Past 3.20.

3. Resultados

3.1. Crecimiento de las cepas en las placas GEN III

Las cepas de estudio mostraron diferencias significativas respecto al número de sustratos en los cuales fueron capaces de crecer (Fig. 1). Bajo condiciones sin estrés, la cepa ATCC desarrolló crecimiento en 39 sustratos y SAL004 en 45, mientras que SAL115 en 47. Sin embargo, cuando las cepas de genotipo ST19 se sometieron a estrés previo a su inoculación en las placas GEN III, se incrementó el número de sustratos en los que podían crecer. Así, para la cepa ATCC el estrés por refrigeración aumentó su capacidad para crecer en más sustratos, haciéndolo en 50 y 62 para los cultivos provenientes de LBac y LBraw, respectivamente. En contraste, cuando dicha cepa se incubó previamente a temperatura ambiente, disminuyó el número de sustratos utilizados, ya que solo se observó crecimiento en 36 (LBac) y 32 (LBraw) sustratos. La cepa SAL004 también fue capaz de utilizar un mayor número de sustratos cuando provenía de ser incubada en refrigeración, tanto en LBac (51), como en LBraw (49), mientras que cuando provenía de cultivos a temperatura ambiente en LBac creció en 49 sustratos y cuando provenía de LBraw solo en 42. Por otro lado, la cepa SAL115, de genotipo ST213, se comportó de manera distinta, ya que creció en más sustratos cuando provenía de ser incubada a temperatura ambiente, 49 cuando provenía de LBac y 51 de LBraw, mientras que a 4°C en LBac creció en 45 y en LBraw en 41. El incremento en el número de sustratos que mostraron las cepas ST19 previamente incubadas en condiciones de estrés, se dio principalmente en azúcares, alcoholes polivalentes y aminoácidos. De manera interesante, en el caso de las pruebas de sensibilidad a químicos inhibitorios, se observó una respuesta opuesta a la de utilización de sustratos, es decir, una disminución en el número de sustratos donde podían crecer las células provenientes de incubación en alguna condición de estrés, en comparación con cepas no sometidas previamente a estrés.

Al determinar cuantitativamente la capacidad de crecimiento de las cepas de estudio en los diferentes sustratos y sustancias químicas de las placas GEN III determinando el área bajo la curva (AUC), se encontraron diferentes perfiles de crecimiento entre las cepas de genotipo ST19 y la ST213 en las diferentes condiciones de estrés evaluadas (Fig. 2). Una

diferencia relevante se encontró en las cepas del genotipo ST19, ATCC y SAL004, cuando habían sido previamente estresadas en LBraw a 4°C, presentándose un aumento de la AUC en comparación con otras condiciones de estrés y con la cepa SAL115, de genotipo ST213 (Fig. 2a). En cuanto al crecimiento en las pruebas de sensibilidad química también se encontraron diferentes perfiles de crecimiento, siendo la cepa de genotipo ST213 la que mostró los valores más altos de AUC, sobre todo cuando provenía de ser incubada sin estrés (Fig. 2b). La única prueba de sensibilidad a químicos inhibitorios en donde ninguna cepa creció bajo ninguna condición de pre-incubación evaluada fue en 8% de NaCl. Bajo condiciones sin estrés, las cepas ATCC y SAL004 no crecieron en minociclina y aztreonam, pero si lo hizo la cepa SAL115. La cepa ATCC tampoco creció en bromato de sodio y D-serina, pero SAL004 y SAL115 sí. Mientras que SAL004 no creció en troleandomicina y ácido nalidíxico pero ATCC y SAL115 si crecieron. Cuando esta última cepa fue estresada, se observó que dejo de crecer en sustratos tales como ácido nalidíxico y aztreonam, mientras que en cloruro de litio no creció cuando provenía de ser incubada en refrigeración tanto en LBac y LBraw; en telurito de potasio no creció cuando provenía de LBac tanto a 4°C como a RT; en bromato de sodio solo creció cuando estaba sin estrés y cuando provenía de LBac a RT, y finalmente en D-serina no creció cuando provenía de LBac a 4°C.

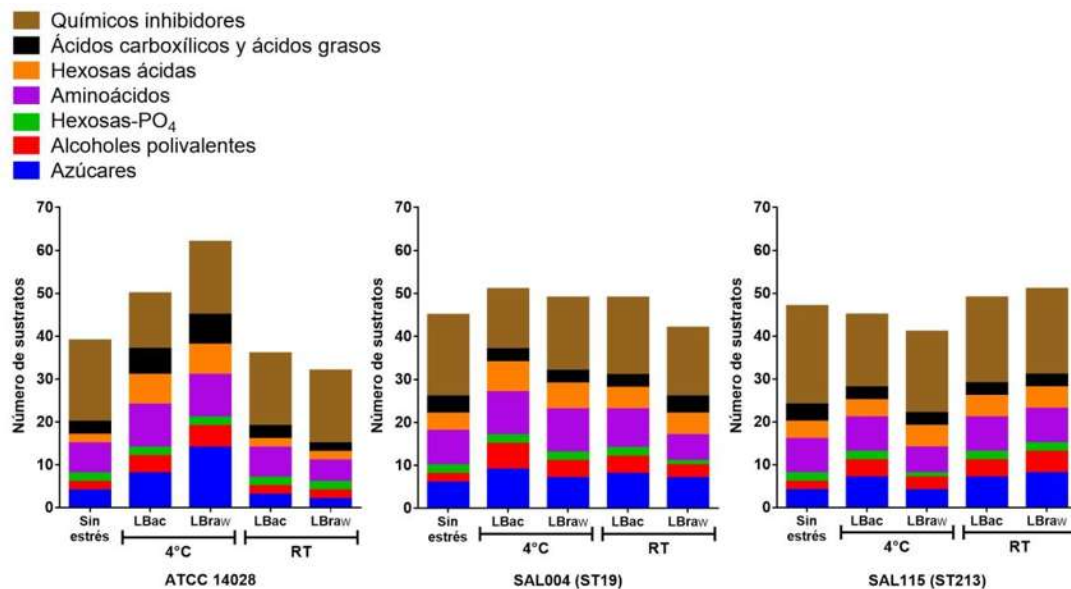


Figura 1. Versatilidad metabólica y sensibilidad a químicos de las cepas de *Salmonella enterica*. Se muestra el crecimiento en diferentes sustratos de cultivos de las tres cepas provenientes de distintas condiciones de estrés y de un cultivo control no sujeto a estrés. Se indican las condiciones de estrés de las que provenían los distintos cultivos: LBac, estrés ácido; LBraw, estrés osmótico (disponibilidad de agua reducida). RT,

temperatura ambiente. Se consideró positivo a aquellos sustratos donde el área bajo la curva (AUC) de la cinética de crecimiento fue diferente estadísticamente del valor de AUC del control negativo (agua), utilizando una ANOVA *post hoc* Dunnett ($p < 0.05$). Para detalles ver Materiales y Métodos.

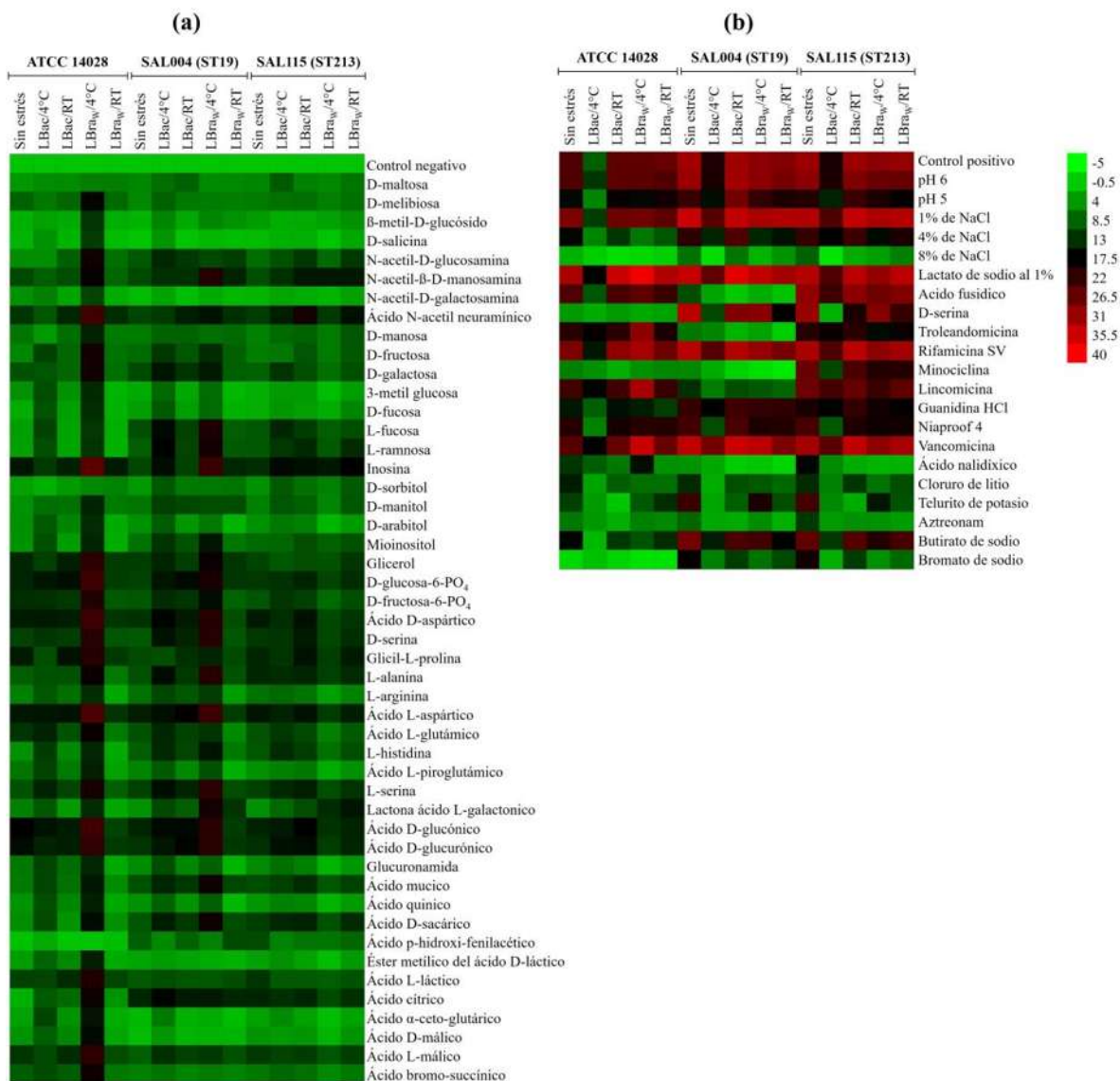


Figura 2. Mapa de calor del crecimiento de las cepas de *Salmonella enterica* en distintos sustratos y sustancias químicas. Fuentes de carbono (a) y pruebas de resistencia química (b) donde se observó crecimiento bacteriano. El gráfico se realizó con la media de los valores de AUC para cada sustrato de tres ensayos independientes. Los valores van de 0 (verde) a 40 (rojo) unidades de AUC.

3.2. Formación de biofilm en las placas GEN III

Se evaluó la capacidad de las cepas de estudio para formar biofilm sin haber pasado por un proceso de estrés (Fig. 3). Se observó que la cepa SAL115 formó una mayor cantidad de biofilm (2.6 ± 0.23 OD) que la cepa ATCC (0.37 ± 0.14 OD), mientras que SAL004 (0.05 ± 0.04 OD) no formó biofilm. Posteriormente, se evaluó si el crecimiento de las cepas en sustratos únicos inhibía o inducía la formación de biofilm (Fig. 4). Se encontró que la cepa ATCC estableció biofilm en 6 sustratos, SAL004 solo en 1 y SAL115 en 22.

Interesantemente, se observó que la cepa SAL004, la cual no establecía biofilm al ser pre-incubada sin estrés en caldo LB, si lo hizo en Niaproof 4, y cuando fue estresada, dependiendo del tipo de estrés, estableció biofilm en sustratos como pectina, ácido acetoacético, 4% NaCl, 8% NaCl, telurito de potasio y bromato de sodio. La cepa ATCC aumentó el número de sustratos en los cuales establecía biofilm cuando había sido previamente estresada en LBraw/RT, mientras que en las otras condiciones de estrés se observaron diferencias en el tipo de sustrato en que se estableció el biofilm, dependiendo de la condición de incubación de la cual provenía. Por otro lado, se observó que la cepa SAL115 proveniente de LBac/4°C formó biofilm en un número restringido de sustratos (17), mientras que la procedente de LBraw, tanto a 4°C como RT, aumentó a 29 sustratos su capacidad para establecer biofilm. Además, dicha cepa incrementó cuantitativamente la cantidad de biofilm formado en la mayoría de los sustratos (Fig. 5). Los valores más altos de formación de biofilm se encontraron en los sustratos utilizados en las pruebas de sensibilidad química (Fig. 5b), en los cuales claramente la cepa SAL115 presentó altos valores en condiciones de pH 6 y pH 5, así como en presencia de D-serina, minociclina, niaproof 4 y azul de tetrazolio. Con relación a las distintas fuentes de carbono, los valores más altos de biofilm se observaron en la cepa SAL115 para los sustratos pectina y ácido p-hidroxifenilacético (Fig. 5a). También se observó que era mayor la cantidad de biofilm formado para la misma cepa en la mayoría de sustratos cuando era previamente estresada, sobre todo en LBraw, tanto a 4°C como a RT. Para descartar que el cristal violeta estuviera tiñendo alguno de los sustratos de la placa GEN III, generando falsos positivos, se realizó el método de tinción en las placas GEN III con el fluido de inoculación pero sin bacteria, observándose que no se producía coloración considerablemente mayor a la del pozo con agua (datos no mostrados).

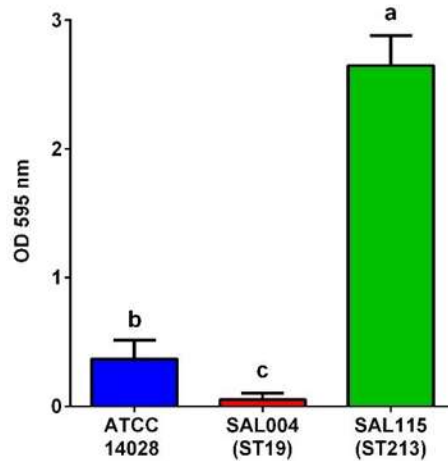


Figura 3. Formación de biofilm en caldo LB de las cepas de *Salmonella enterica*. Se muestran las medias \pm D.E. de tres ensayos independientes por quintuplicado. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa, ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0.05$).

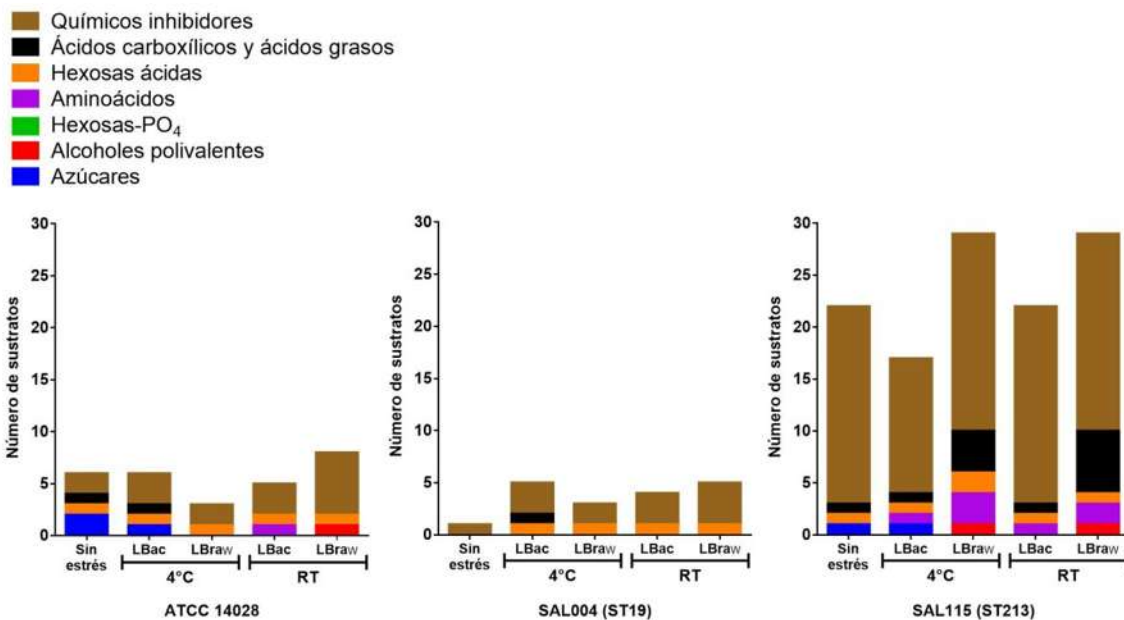


Figura 4. Número de sustratos donde se observó formación de biofilm por parte de las cepas de estudio. Se consideró positivo a aquellos sustratos donde el valor de densidad óptica fue diferente estadísticamente del valor del control negativo (agua), utilizando una ANOVA *post hoc* Dunnett ($p < 0.05$). Las abreviaturas de las condiciones de pre-incubación son las mismas que las definidas en la Figura 1. Para detalles ver Materiales y Métodos.

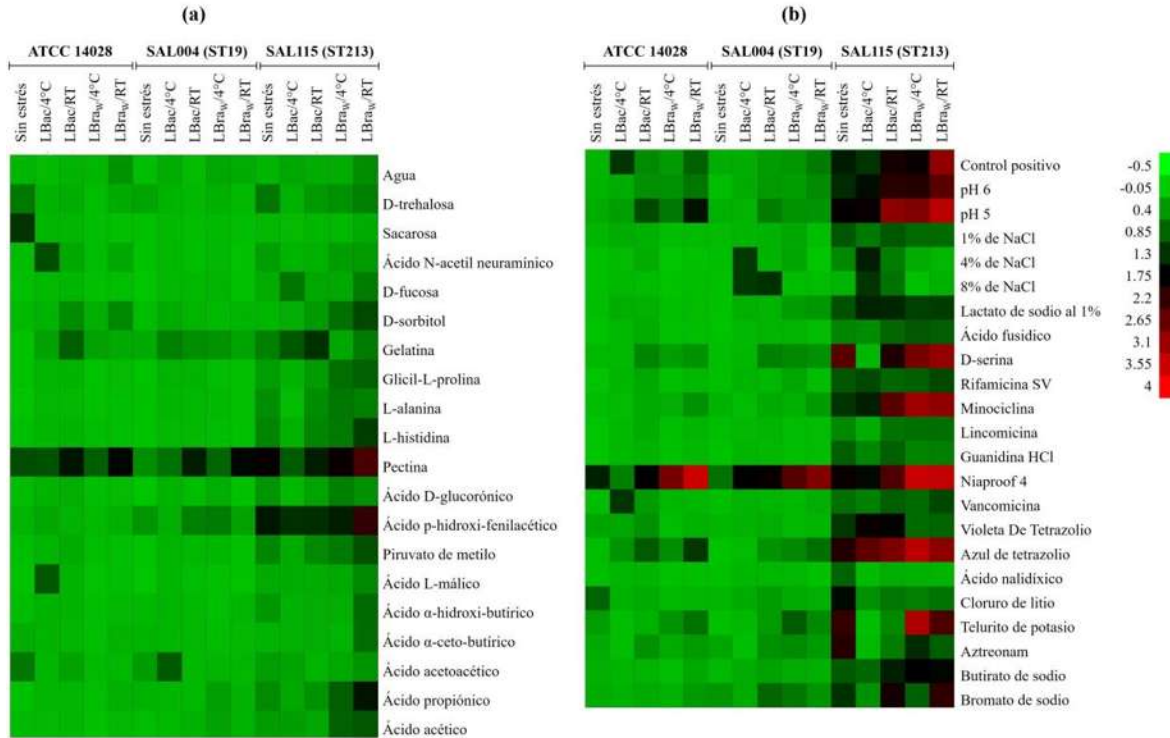


Figura 5. Mapa de calor de la formación de biofilm por parte de las cepas de *Salmonella enterica*. Fuentes de carbono (a) y pruebas de sensibilidad química (b) en donde se observó formación de biofilm. El gráfico se realizó con la media de los valores de densidad óptica a 595 nm para cada sustrato de tres ensayos independientes. Los valores van de 0 (verde) a 4 (rojo) OD_{595nm}.

3.3. Patrones de agrupamiento por su capacidad de crecer y formar biofilm en las placas

GEN III

Por su capacidad de crecer bajo diferentes sustratos, se encontraron tres fenotipos principales a un corte de similitud del 75%, usando el coeficiente de correlación de Pearson y agrupando por el criterio UPGMA (Fig. 6a). Las cepas de genotipo ST19 (ATCC y SAL004) provenientes de condiciones de estrés se agruparon en el grupo I. Dentro del grupo II, se encontraron dos subgrupos a un corte de similitud del 85%, en uno de éstos se agruparon las cepas ATCC y SAL115 provenientes de estrés por LBra_w incubadas tanto a 4°C como en RT. En el otro subgrupo se encontraron las tres cepas provenientes de condiciones sin estrés, así como las cepas ATCC y SAL115 provenientes de estrés en LBac incubadas a 4°C y RT, a excepción de la cepa ATCC proveniente de LBac a 4°C, la cual se agrupó en el clúster III. Al utilizar la capacidad para formar biofilm de las tres cepas bajo diferentes condiciones de estrés para realizar el agrupamiento, se encontraron 7 fenotipos principales a un corte de

similitud del 75% (Fig. 6b). Dentro del grupo I se agruparon las cepas ATCC y SAL004 provenientes de estrés en LBra_w incubadas a 4°C y RT, así como las provenientes de estrés en LBac a RT. Las cepas SAL004 y ATCC sin estrés se agruparon en los grupos II y III respectivamente, mientras que en el grupo IV se encontró a la primera cepa proveniente de estrés en LBac incubada a 4°C. Las células de la cepa SAL115 con y sin estrés, se agruparon en los grupos V y VI. Mientras que en el grupo VII se agrupó la cepa ATCC proveniente de estrés en LBac incubada a 4°C.

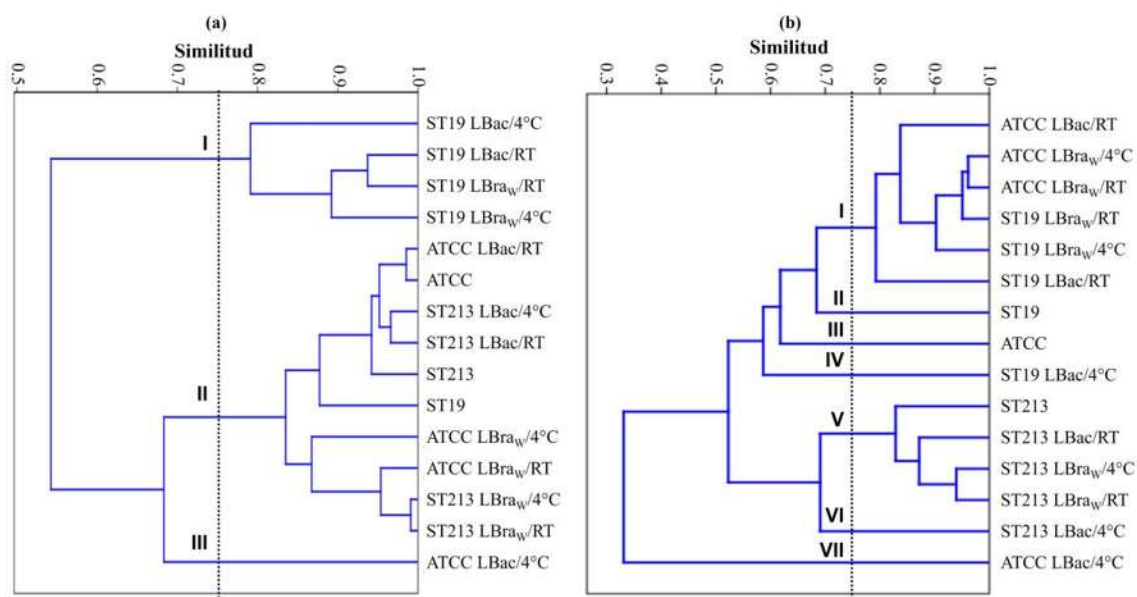


Figura 6. Análisis de agrupamiento con base en los sustratos/condiciones en las que se presentó crecimiento y formación de biofilm por parte de las cepas de *Salmonella enterica* analizadas. Los dendrogramas se obtuvieron a partir de los valores de AUC del crecimiento bacteriano (a) y de los valores de densidad óptica de la formación de biofilm (b) de las cepas bajo los diferentes sustratos. El análisis de agrupamiento se realizó con el coeficiente de correlación de Pearson por el método UPGMA. La línea vertical indica un nivel de corte al 75% de similitud. Los fenotipos agrupados a un 75% de similitud se indican con números romanos.

4. Discusión

A la fecha, aún son relativamente escasos los estudios en los que se evalúa la capacidad de cepas ambientales de *Salmonella enterica* para crecer y formar biofilm en sustratos únicos empleando la tecnología de microarreglos fenotípicos de Biolog (Kalai-Chelvam et al., 2015; Martins et al., 2013). Sin embargo, no existen reportes donde se comparen estas respuestas fisiológicas entre distintos genotipos de *S. enterica* involucrados

en un fenómeno de reemplazo en una región geográfica determinada. Por lo anterior, en este estudio se comparó la capacidad de cepas de los genotipos ST19 (SAL004) y ST213 (SAL115) de *S. enterica* para crecer y formar biofilm en presencia de diferentes sustratos y condiciones de estrés. La hipótesis de partida fue que existe una respuesta diferencial entre los genotipos ST19 y ST213 para crecer y formar biofilm, los resultados mostraron que es mayor la capacidad de ST213 para crecer y formar biofilm bajo más sustratos, lo que contribuye a explicar su mayor éxito en la prevalencia de dicho genotipo en México en comparación con ST19 en los últimos años.

Las cepas de *S. enterica* evaluadas presentaron mejor crecimiento en las distintas fuentes de carbono cuando provenían de cultivos en condiciones de estrés que cuando no provenían de dichas condiciones. La temperatura, la actividad del agua (a_w) y el pH son parámetros relevantes en la conservación de alimentos; sin embargo, algunos microorganismos han evolucionado desarrollando estrategias de adaptación para tolerar cambios súbitos en las condiciones fisicoquímicas del entorno o condiciones extremas (Beales, 2004); y existe evidencia de que la respuesta a dichas condiciones son cepa-dependiente. Por ejemplo, Martins et al. (2013) observaron variabilidad fenotípica entre cepas de *S. enterica* aisladas de diferentes puntos a través de la cadena de producción de alimentos de cerdo, mostrando diferentes perfiles de crecimiento dependiendo de la cepa y del sustrato o condición de estrés en que fue inoculada. En otro estudio realizado por Díez-García et al. (2012), se evaluó la cinética de crecimiento de un total de 69 cepas de *S. enterica* pertenecientes a 10 serotipos, observándose variación en los valores de crecimiento entre los serotipos probados. Por otro lado, Lianou y Koutsoumanis (2011) encontraron que las condiciones de cultivo de 60 cepas de *S. enterica* afectaron los valores de crecimiento, presentándose una gran variabilidad en dicho parámetro a medida que las condiciones de crecimiento se volvieron más extremas, tanto en términos de pH como de NaCl.

Las condiciones de cultivo también tienen impacto en la formación de biofilm (Lamas et al., 2016; Lianou y Koutsoumanis, 2012; Wang et al., 2013; Xu et al., 2010). La formación de biofilm es un proceso multicelular complejo que involucra varias respuestas fisiológicas reguladas por un cambio importante en el perfil de expresión génica (Paytubi et al., 2017; Wang et al., 2016). Existen señales ambientales que pueden activar la formación de biofilm, como la osmolaridad, el pH, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Lamas et al.,

2018a; Steenackers et al., 2012; Xu et al., 2010). Además, se ha reportado que existe variabilidad en la formación de biofilm de cepas de *S. enterica* provenientes de diversas fuentes (Martins et al., 2013; Solomon et al., 2005), así como entre cepas de *S. enterica* de diferentes serotipos bajo diferentes condiciones de estrés ácido, osmótico y de temperatura (Lianou y Koutsoumanis, 2012). En este estudio, la cepa SAL115 mostró una mayor capacidad para formar biofilm en caldo LB, en comparación con las cepas SAL004 y ATCC 14028, ambas de genotipo ST19. La capacidad de formar biofilm es una estrategia de bacterias patógenas para incrementar su persistencia y sobrevivencia fuera del hospedero, lo cual se asocia con un mayor número de infecciones causadas por el consumo de alimentos contaminados. También existe una correlación entre la formación de biofilm y la capacidad de las cepas para colonizar y replicarse en los tejidos de distintos hospederos (Bjarnsholt et al., 2013; Koo et al., 2018; MacKenzie et al., 2017). Así, los resultados indican que la cepa SAL115 de genotipo ST213 tiene un mayor potencial para la contaminación de alimentos y representa un mayor riesgo para la salud pública que la cepa SAL004 de genotipo ST19.

Al evaluar la formación de biofilm en diferentes sustratos, los valores de formación de biofilm disminuyeron en comparación con el medio LB cuando las cepas se incubaron en distintas fuentes de carbono, a excepción de la pectina, en la cual incluso la cepa SAL004 que no formó biofilm en caldo LB, si lo hizo en presencia de dicho sustrato, sobre todo cuando provenía de crecer en condiciones de estrés. La pectina es un polisacárido formado por ácidos galacturónicos y constituye parte de los polisacáridos de la pared celular de plantas (Cosgrove, 2005). También es ampliamente utilizada como agente gelificante y estabilizante en la industria alimenticia (Mohnen, 2008). De manera interesante, algunos reportes indican que la pectina en la pared celular de plantas podría actuar como un sitio receptor para la adherencia de *S. enterica* (Saggers et al., 2008; Tan et al., 2016), paso crucial en el proceso de formación de biofilm (Steenackers et al., 2012). Kalai-Chelvam et al. (2015) observaron que una cepa del serotipo Typhi podía formar biofilm en presencia de pectina; sin embargo, otras 7 cepas del mismo serotipo no formaron biofilm en presencia de dicho polisacárido. Este estudio muestra que un agente químico empleado en la industria alimenticia, como la pectina, puede estimular la formación de biofilm en cepas de *S. enterica* que no son buenas formadoras de dicha estructura.

Recientemente se ha documentado que cepas del serotipo Typhimurium y otros serotipos de *S. enterica* son capaces de formar biofilm en presencia de nitrato de sodio y la mezcla acetato de sodio-ácido cítrico, usados como preservativos de alimentos (Lamas et al., 2018b). Dicho estudio mostró que la formación de biofilm en presencia de dichas sustancias puede incluir además, la activación de la transcripción de algunos genes relacionados con virulencia. Por lo anterior, a futuro será necesario realizar ensayos que permitan relacionar la formación de biofilm en presencia de distintos sustratos y su relación con la expresión de genes de virulencia en cepas de los genotipos ST213 y ST19, con la finalidad de evaluar la relación entre dichos procesos en estos genotipos de relevancia en la salud pública. La pectina es utilizada como probiótico, y ratones alimentados con 10% de pectina de manzana presentaron un incremento en el número de células de *S. Typhimurium* en el intestino y heces, en comparación con ratones que no consumieron dicho suplemento (Petersen et al., 2009). Aunque los ratones que consumieron pectina no mostraron una mayor invasión de órganos por parte de *S. enterica* en comparación con los ratones control, es factible que el riesgo de que esto suceda difiera entre cepas de distintos genotipos, algo que necesita ser evaluado en estudios posteriores.

En este estudio también se observó que en el sustrato niaproof 4 todas las cepas formaron biofilm. Este sustrato es un surfactante aniónico, su principal componente es el tetradecilsulfato de sodio y es utilizado para mejorar la especificidad y sensibilidad de medios de cultivo para la detección de *S. enterica* (Brichta-Harhay et al., 2008; Goldman, 2004; Mallinson et al., 2000). Se ha reportado que el tetradecilsulfato de sodio inhibe el nado (*swarming*) en el género *Proteus* por inhibición de la motilidad, inhibiendo la formación de flagelos o por acción lítica sobre los flagelos ya sintetizados (Kopp et al., 1966). Sin embargo, hasta donde se conoce, no hay reportes que correlacionen el tetradecilsulfato de sodio con la formación de biofilm en ningún género bacteriano, por lo que sería interesante evaluar más profundamente el efecto de esta molécula en los mecanismos de formación de biofilm. La cepa SAL115 mostró altos valores de formación de biofilm, particularmente en aquellos sustratos que son utilizados como químicos inhibitorios de crecimiento, antibióticos, o condiciones de pH ácido y osmolaridad alta. Además, estos valores fueron más altos en las cepas cuando habían sido previamente estresadas, sobre todo en LBraw. Se sabe que los antimicrobianos a concentraciones subinhibitorias pueden provocar cambios en la fisiología

y el comportamiento de las bacterias, induciendo un aumento en la producción de biofilm. Las hipótesis más frecuentes sobre cómo los antibióticos estimulan la formación de biofilm establecen que las células muertas y sus productos actúan como promotores para tal fin, o bien pueden inducir respuestas de estrés u otros cambios fisiológicos por daño subletal, lo que incrementa la formación de biofilm de una manera dosis-dependiente (Ranieri et al., 2018). Debido al aumento de la resistencia a antibióticos que están presentando muchos géneros bacterianos en la que el biofilm juega un papel fundamental (Hall y Mah, 2017), se sigue buscando identificar moléculas que puedan bloquear la resistencia o inhibir la formación de biofilm (Koo et al., 2017). Se requieren más estudios y diferentes aproximaciones para lograr desarrollar estrategias que puedan representar alternativas que ayuden al control de microorganismos patógenos en el sector médico y en la cadena de producción de alimentos.

Referencias

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S., 2012. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* 8, e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Beales, N., 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3, 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S. R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P Ø., Høiby, N. 2013. The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology.* 21(9): 466-474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.06.002>
- Brichta-Harhay, D.M., Guerini, M.N., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M., 2008. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: An evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6289–6297. <https://doi.org/10.1128/AEM.00700-08>
- Burton, E., Yakandawala, N., LoVetri, K., Madhyastha, M.S., 2006. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0086-3>
- Cosgrove, D. J., 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 6(11): 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2012. Influence of serotype on the growth

- kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 31, 173–80. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.012>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fletcher, S.M., McLaws, M.-L., Ellis, J.T., 2013. Prevalence of gastrointestinal pathogens in developed and developing countries: systematic review and meta-analysis. *J. Public Health Res.* 2, 9. <https://doi.org/10.4081/jphr.2013.e9>
- Galanis, E., Wong, D.M.A.L.F., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., Wegener, H.C., 2006. Web-based Surveillance and Global *Salmonella* Distribution, 2000–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 381–388. <https://doi.org/10.3201/eid1205.050854>
- Goldman, M.P., 2004. Sodium Tetradecyl Sulfate for Sclerotherapy Treatment of Veins: Is Compounding Pharmacy Solution Safe? *Dermatologic Surg.* 30, 1454–1456. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2004.30502.x>
- Hall, C. W., Mah, T. F., 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 41(3): 276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R. V, 2002. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* 129, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268802006842>
- Humphrey, S., Clark, L.F., Humphrey, T.J., Jepson, M. a., 2011. Enhanced recovery of *Salmonella* Typhimurium DT104 from exposure to stress at low temperature. *Microbiology* 157, 1103–1114. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045666-0>
- Humphrey, T., 2004. *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 504–509. <https://doi.org/10.1038/nrmicro907>
- Kalai-Chelvam, K., Yap, K.P., Chai, L.C., Thong, K.L., 2015. Variable Responses to Carbon Utilization between Planktonic and Biofilm Cells of a Human Carrier Strain of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *PLoS One* 10, e0126207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126207>
- Kirk, M.D., Pires, S.M., Black, R.E., Caipo, M., Crump, J.A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C.L., Hald, T., Hall, A.J., Keddy, K.H., Lake, R.J., Lanata, C.F., Torgerson, P.R., Havelaar, A.H., Angulo, F.J., 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLOS Med.* 12, e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., 2017. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews*

Microbiology 15(12): 740-755. doi:10.1038/nrmicro.2017.99

- Kopp, R., Müller, J., Lemme, R., 1966. Inhibition of Swarming of *Proteus* by Sodium Tetradecyl Sulfate, beta-Phenethyl Alcohol, and p-Nitrophenylglycerine. *Appl. Microbiol.* 14, 873–8.
- Lamas, A., Miranda, J.M., Vázquez, B., Cepeda, A., Franco, C.M., 2016. Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in *Salmonella enterica* decrease under anaerobic conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.043>
- Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M., 2018a. *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assessment from farm to fork. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.8945>
- Lamas, A., Paz-Mendez, A. M., Regal, P., Vazquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A., Franco, C. M., 2018b. Food preservatives influence biofilm formation, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. *LWT.* 97: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.042>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.002>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2011. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiol.* 28, 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.006>
- López, F.E., de las Mercedes Pescaretti, M., Morero, R., Delgado, M. a., 2012. *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? *Food Res. Int.* 45, 842–851. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.009>
- MacKenzie, K.D., Palmer, M.B., Köster, W.L., White, A.P., 2017. Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic *Salmonella* Strains to Colonize Multiple Host Species. *Front. Vet. Sci.* 4, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00138>
- Mallinson, E.T., Miller, R.G., de Rezende, C.E., Ferris, K.E., de Graft-Hanson, J., Joseph, S.W., 2000. Improved Plating Media for the Detection of *Salmonella* Species with Typical and Atypical Hydrogen Sulfide Production. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 12, 83–87. <https://doi.org/10.1177/104063870001200119>
- Martins, M., McCusker, M.P., McCabe, E.M., O’Leary, D., Duffy, G., Fanning, S., 2013. Evidence of Metabolic Switching and Implications for Food Safety from the Phenome(s) of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Cultured at Selected Points across the Pork Production Food Chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5437–5449. <https://doi.org/10.1128/AEM.01041-13>
- Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266–77. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Petersen, A., Heegaard, P. M., Pedersen, A. L., Andersen, J. B., Sørensen, R. B., Frøkiær, H., Lahtinen, S.J., Ouwehand, A. C., Poulsen, M., Licht, T. R., 2009. Some putative

- prebiotics increase the severity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiology*. 9(1): 245. doi:10.1186/1471-2180-9-245
- Okoro, C.K., Kingsley, R.A., Connor, T.R., Harris, S.R., Parry, C.M., Al-Mashhadani, M.N., Kariuki, S., Msefula, C.L., Gordon, M.A., de Pinna, E., Wain, J., Heyderman, R.S., Obaro, S., Alonso, P.L., Mandomando, I., MacLennan, C.A., Tapia, M.D., Levine, M.M., Tennant, S.M., Parkhill, J., Dougan, G., 2012. Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat. Genet.* 44, 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/ng.2423>
- Olsen, S.J., Bishop, R., Brenner, F.W., Roels, T.H., Bean, N., Tauxe, R. V., Slutsker, L., 2001. The Changing Epidemiology of *Salmonella*: Trends in Serotypes Isolated from Humans in the United States, 1987–1997. *J. Infect. Dis.* 183, 753–761. <https://doi.org/10.1086/318832>
- Paytubi, S., Cansado, C., Madrid, C., Balsalobre, C., 2017. Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in *Salmonella*. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02160>
- Ranieri, M.R., Whitchurch, C.B., Burrows, L.L., 2018. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.006>
- Saggers, E.J., Waspe, C.R., Parker, M.L., Waldron, K.W., Brocklehurst, T.F., 2008. *Salmonella* must be viable in order to attach to the surface of prepared vegetable tissues. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1239–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03795.x>
- Solomon, E.B., Niemira, B. a, Sapers, G.M., Annous, B. a, 2005. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *J. Food Prot.* 68, 906–912. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.906>
- Spector, M.P., Kenyon, W.J., 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res. Int.* 45, 455–481. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>
- Staib, L., Fuchs, T.M., 2014. From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens. *Microbiology* 160, 1020–1039. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078105-0>
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45, 502–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C., 2014. The Molecular Epidemiological Characteristics and Genetic Diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS One* 9, e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>
- Tan, M.S.F., Rahman, S., Dykes, G.A., 2016. Pectin and Xyloglucan Influence the Attachment of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* to Bacterial Cellulose-Derived Plant Cell Wall Models. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 680–688.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02609-15>

- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G., 2013. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>
- Wang, H., Dong, Y., Wang, G., Xu, X., Zhou, G., 2016. Effect of growth media on gene expression levels in *Salmonella* Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. *Food Control* 59, 546–552. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.026>
- Wiesner, M., Zaidi, M.B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J.J., Silva, C., 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* 9, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>
- Xu, H., Lee, H.-Y., Ahn, J., 2010. Growth and Virulence Properties of Biofilm-Forming *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium under Different Acidic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7910–7917. <https://doi.org/10.1128/AEM.01508-10>

CAPÍTULO III

Análisis de virulencia *in vitro* e *in vivo* de cepas del genotipo ST213 de *Salmonella enterica* Typhimurium aisladas de alimentos

1. Introducción

La especie *Salmonella enterica* se considera uno de los principales patógenos asociados a alimentos contaminados en todo el mundo, causando diversos padecimientos como gastroenteritis, fiebre tifoidea y septicemia (Álvarez-Ordóñez et al., 2012). Se estima que cada año ocurren alrededor de 93.8 millones de casos de enfermedades gastrointestinales asociadas a diversos serotipos de *S. enterica*, siendo Typhimurium y Enteritidis los serotipos no asociados a tifoidea los más frecuentes en la contaminación de alimentos (Majowicz et al., 2010).

S. enterica coloniza e invade la mucosa intestinal de una amplia variedad de hospederos, es ingerida por vía oral y es capaz de sobrevivir al tránsito por el bajo pH del estómago, así como evadir las múltiples defensas del intestino delgado para acceder al epitelio. Este patógeno se internaliza preferentemente en las células M, utilizándolas para transportarse a las células linfoides en las placas de Peyer. Una vez que cruza el epitelio, los serotipos asociados con enfermedades sistémicas ingresan en los macrófagos intestinales y se diseminan por el sistema retículo-endotelial, mientras que otros serotipos inducen una respuesta inflamatoria local temprana, que da como resultado la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la luz intestinal, lo que provoca la diarrea (Haraga et al., 2008; LaRock et al., 2015).

La interacción *Salmonella*-hospedero ha sido estudiada en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, lo que ha permitido generar información detallada sobre los factores de virulencia necesarios en los mecanismos de internalización, así como de los procesos de interacción con las células del hospedero y generado modelos adecuados sobre la respuesta inmune (Coburn et al., 2007; Herrero-Fresno y Olsen, 2018; Ibarra y Steele-Mortimer, 2009; Knodler, 2015; Kurtz et al., 2017; Wotzka et al., 2017). En humanos, *S. enterica* induce una gastroenteritis autolimitada y en algunos casos puede ocasionar bacteriemia, mientras que en modelos murinos se desarrolla una enfermedad sistémica. En ratones, la exposición a dosis orales superiores a 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc) suele ser letal, mientras que las ratas desarrollan enfermedad clínica solo a dosis superiores a 10^8 ufc y rara vez sucumben a la infección (Havelaar et al., 2001).

No obstante que los modelos de infección *in vitro* e *in vivo* empleando cepas de referencia han generado información valiosa sobre aspectos citológicos, bioquímicos, genéticos e inmunológicos de la relación hospedero-patógeno, evidencia clínica y experimental indica claramente que existen diferencias significativas en la severidad de las infecciones causadas por diferentes cepas de *S. enterica*. En términos clínicos, en EUA los índices de mortalidad entre diferentes serotipos de *S. enterica* presentan variaciones hasta de 100 veces y las proporciones de casos de hospitalización van del 14% al 67% (Jones et al., 2008). El análisis comparativo inicial entre las cepas de referencia de *S. enterica* ATCC SL1344 y ATCC 14028, ambas del serotipo Typhimurium, documentó que la segunda es menos invasiva y durante el proceso de invasión induce plegamientos de membrana más pequeños en células MDCK que la segunda (Clark et al., 2011). Diferencias en las manifestaciones epidemiológicas y clínicas entre cepas del mismo serotipo se han documentado en cepas del serotipo Enteritidis (Feasey et al., 2016).

Recientemente se ha reportado el reemplazo de genotipos predominantes, establecidos mediante secuencia tipo (ST), en diferentes países. En Sudáfrica, el genotipo ST313 ha reemplazado al ST19 como el de mayor prevalencia (Okoro et al., 2012); en Guangdong, China, el genotipo ST34 se ha establecido como uno de los más abundantes, junto con el ST19 (Sun et al., 2014). En México, se ha observado un fenómeno similar, ya que en muestras clínicas y de alimentos analizadas en el periodo 2002-2005 se encontró que el genotipo ST213 desplazó al ST19 como el de mayor prevalencia (Wiesner et al., 2009), fenómeno también observado por nuestro grupo de trabajo en aislados de alimentos de 2008-2011 (Vázquez-Garcidueñas, datos no publicados). Además, la información reportada indica que el genotipo ST213 podría ser originario de México (Achtman et al., 2012; Wiesner et al., 2009), aunque ha comenzado a dispersarse a otras regiones del mundo como, EUA, Reino Unido y Holanda (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>).

Algunos de los genotipos emergentes involucrados en procesos de reemplazo presentan características clínicas y patológicas diferentes a los de las cepas de genotipos establecidos o de las cepas de referencia comúnmente analizadas en estudios de patología y virulencia. Por ejemplo, el genotipo ST313 presenta un mayor número de bacterias en ratones BALB/c infectados experimentalmente que aquellos infectados con el genotipo ST19 (Ramachandran et al., 2017). En contraste, cuando monos Rhesus se infectan con ambos

genotipos, aquellos infectados con el ST19 son los únicos que desarrollan diarrea severa. Dichas observaciones clínicas concuerdan con el comportamiento clínico observado para el genotipo ST313 en África. Por otra parte, el genotipo ST34 que se ha establecido en ciertas regiones de China, presenta patrones de resistencia a antibióticos particulares, distintos a los de cepas del genotipo ST19 aisladas de la misma región (Sun et al., 2014). Por lo anterior, el estudio de cepas de genotipos emergentes involucrados en procesos de reemplazo para establecerse como los de mayor prevalencia en muestras ambientales, de alimentos y clínicas, es de relevancia en epidemiología y salud pública. Además, las comparaciones patológicas y de virulencia entre variantes genéticas de un mismo serotipo de *S. enterica* contribuyen a un mejor entendimiento de los fenómenos microevolutivos y/o epigenéticos relacionados con su adaptación como patógeno (Okoro et al., 2012, 2015).

Previamente se ha documentado que cepas del genotipo ST213 provenientes de pacientes con infecciones sistémicas no establecen la misma infección en ratones BALB/c (Wiesner et al., 2016). No obstante, se ha documentado una variación intra-genotipo en características de patogenicidad y virulencia de cepas ST313, incluida la capacidad de invasión *in vitro* (Almeida et al., 2017; Carden et al., 2015; Singletary et al., 2016). A pesar de la relevancia en salud pública subyacente a esta variabilidad, dicha variación no ha sido evaluada entre cepas del genotipo emergente ST213. Por ello, en el presente trabajo se evaluó la virulencia de cinco cepas del genotipo ST213 provenientes de alimentos en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, contrastando los resultados con los de dos cepas del genotipo ST19, una de las cuales fue aislada de alimentos de la misma región que las del genotipo ST213. Se empleó como cepa de referencia la ATCC 14028.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas

Las cepas de estudio fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán y pertenecen a los genotipos ST19 y ST213 serotipo Typhimurium. La cepa ATCC 14028 de *S. enterica* serotipo Typhimurium fue usada como referencia con fines comparativos. La información de las cepas se muestra en la tabla 1. Para la asignación de secuencia tipo se empleó el esquema de 7 loci de acuerdo al protocolo descrito en el sitio

web MLST (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html), determinando los perfiles alélicos para los genes de mantenimiento *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* y *thrA*. Los números de alelos y secuencias tipo fueron asignadas de acuerdo a la base de datos MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>).

2.2. Condiciones de cultivo

Se obtuvieron pre-cultivos de las cepas de estudio antes de cada ensayo, para lo cual se inoculó una colonia en 10 ml de caldo Luria-Bertani (LB) y se incubó toda la noche a 37°C y 180 rpm. Una vez concluido el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 1500xg durante 10 minutos y la pastilla de bacterias resultante se re-suspendió en 10 ml de PBS estéril. Se ajustaron los cultivos para tener 1×10^8 UFC/ml.

2.3. Ensayos de invasión en un modelo celular

Los ensayos de invasión se realizaron en células Caco-2 utilizando el ensayo de protección con gentamicina como se ha descrito previamente (Alva-Murillo et al., 2015) con algunas modificaciones. Las células Caco-2 se infectaron con las cepas de estudio con una multiplicidad de infección (MOI) de 20:1 bacterias por célula. Para esto, las células Caco-2 se inocularon con suspensiones bacterianas a 1×10^8 UFC/ml y se incubaron durante 2 h en 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, las células Caco-2 se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con gentamicina (80 µg/ml) durante 1 h a 37°C para eliminar las bacterias extracelulares. Finalmente, las células Caco-2 se despegaron con tripsina-EDTA (Sigma, USA) y se lisaron con 250 µl de agua destilada estéril y fría. Se hicieron diluciones seriadas con los lisados de Caco-2, se colocaron en agar LB por triplicado y se incubaron durante la noche a 37°C. Las UFC se contaron utilizando el equipo Scan® 500 automatic colony counter (Interscience, Saint Nom, Francia). Los datos se presentan como la proporción UFC/Caco-2.

2.4. Citotoxicidad de células Caco-2

La muerte celular en respuesta a la infección se midió utilizando el kit Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity Assay Kit (Sigma, USA). La actividad de la LDH liberada al medio extracelular se midió en el sobrenadante del cultivo de células infectadas (2 h de infección, MOI 20:1 bacterias por célula) y se normalizó con los valores obtenidos de un lisado total de células no infectadas. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.5. Citocinas pro-inflamatorias secretadas por células Caco-2 infectadas

La secreción de citocinas pro-inflamatorias en el sobrenadante del cultivo celular infectado (2 h de infección, MOI 20:1 bacteria por célula) se midió con el kit Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines (BD Bioscience, USA) usando un BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Bioscience, USA). Las citocinas medidas fueron interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6). Solo se evaluaron células Caco-2 infectadas con las cepas ATCC 14028, SAL004 (ST19) y SAL115 (ST213). El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.6. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar libres de patógenos de 6-9 semanas de edad. De 1-2 semanas antes de los ensayos se colocaron en cajas metálicas individuales. El alimento y agua fueron proveídos *ad libitum*. Se utilizaron un total de 36 ratas, distribuidas en 6 grupos, 1 grupo control (inoculado con solución salina) y 5 grupos experimentales (inoculados con los genotipos de interés de *S. enterica*).

2.7. Ensayo *in vivo*

Se les retiró el alimento a los animales 14 h antes de la inoculación. Después del ayuno, se administraron 0.5 ml de una solución estéril de NaHCO₃ al 6% (w/v) mediante una cánula gástrica y 5 minutos después 1 ml de la suspensión bacteriana (1x10⁸ UFC/ml). Inmediatamente después de la inoculación (día 0), el alimento y agua fueron proveídos *ad libitum*. Se hicieron evaluaciones periódicas de la temperatura rectal, el peso del animal y el peso de las heces, por un lapso de 5 días. Las heces fueron evaluadas macroscópicamente (consistencia) y microbiológicamente. Los animales fueron sacrificados en el día 5 mediante una dosis letal de pentobarbital sódico. Se removieron de manera aséptica el íleon, ciego, hígado y bazo. Se determinó el peso de cada tejido, para posteriormente realizar un análisis microbiológico y patológico. El uso y manejo de los animales en el presente trabajo fue autorizado por el comité de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. de Hermosillo, Sonora, México.

2.8. Análisis microbiológico

Las muestras de heces, hígado, bazo e íleon fueron diluídas y homogenizadas 1:10 (w/v) en solución salina-peptonada (PPS) estéril. Se hicieron las diluciones apropiadas y se esparció 0.1 ml en placas de agar verde brillante (BGA). Las cajas así inoculadas fueron incubadas a 37°C por 24 h para posteriormente contar el número de UFC/ml.

2.9. Análisis patológico

Inmediatamente después del sacrificio, se hizo un análisis macroscópico de anomalías en los tejidos del animal. Se removió el íleon y el ciego. Los órganos fueron fijados en formalina. Después de la fijación, los tejidos fueron embebidos en parafina, cortados en secciones de 4-5 µm de grosor y teñidos con hematoxilina-eosina. Se evaluó el nivel de daño celular con base en criterios como: la proporción vellosidad-cripta, presencia y tamaño de tejido linfoide, presencia de infiltrado inflamatorio en lámina propia y submucosa, erosión de vellosidades y atrofia de las criptas. El análisis histopatológico fue realizado por un patólogo.

2.10. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando pruebas ANOVA con ajuste *post hoc* Tukey o Dunnett dependiendo del experimento. Se consideró una $p < 0.05$ como significativo. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar (S.D.). Se utilizó el GraphPad Prism software Version 6.01 para el análisis de los datos.

Tabla 1. Cepas de *Salmonella enterica* usadas en este estudio.

Cepa	Serotipo	Secuencia Tipo (ST)	Fuente de aislamiento	Sitio de aislamiento
ATCC 14028	Typhimurium	ST19	Cepa de laboratorio	-----
SAL004	Typhimurium	ST19	Queso	Ciudad Hidalgo, México
SAL016	Typhimurium	ST213	Carne de res	Morelia, México
SAL109	Typhimurium	ST213	Carne de res	Zamora, México
SAL115	Typhimurium	ST213	Queso	Tehuacan, México
SAL127	Typhimurium	ST213	Carne de res	La Piedad, México
SAL196	Typhimurium	ST213	Chorizo	Pátzcuaro, México

3. Resultados

3.1. Análisis de la virulencia de las cepas de *S. enterica* en células Caco-2

Se evaluó la capacidad de las cepas de estudio para internalizar en células Caco-2 (Fig. 1). No se observó internalización de la cepa SAL004 (ST19) (0.004), mientras que si se observó internalización de las cepas del genotipo ST213 así como la cepa ATCC. De las cinco cepas del genotipo ST213, la que mayor internalización presentó fue la cepa SAL109 (0.79), seguida por las cepas SAL115 (0.52) y SAL196 (0.45), mientras que las cepas SAL016 (0.18) y SAL127 (0.14) mostraron valores similares a la cepa ATCC (0.12).

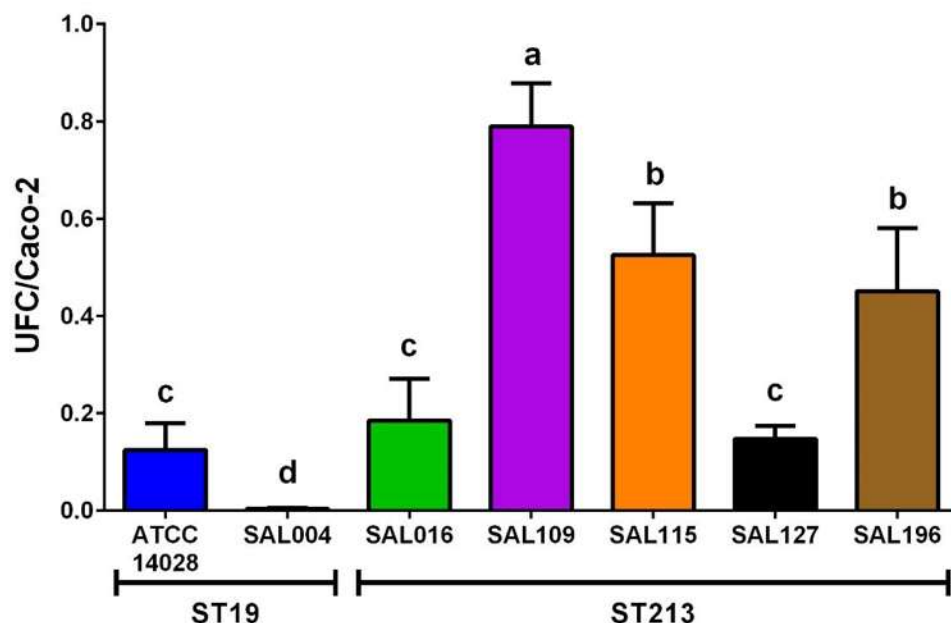


Figura 1. Internalización de las cepas de *Salmonella enterica* en células Caco-2. Se muestra la internalización de los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium* en células Caco-2 a una MOI de 20:1 bacterias por célula por 2 h. Los datos se representan como la media ± D.E. de la tasa de invasión (UFC/Caco-2). Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$), ANOVA *post hoc* Tukey.

Posteriormente se evaluó si la diferencia en la capacidad de internalización de las cepas de estudio tenía un impacto sobre la viabilidad de las células Caco-2, determinando la actividad de la enzima LDH (Fig. 2). Después de 2 h de infección de las células Caco-2 con las diferentes cepas, se observó un porcentaje de muerte celular de alrededor del 0.4% con todas las cepas evaluadas, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

También se evaluó la secreción de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 por parte de las células Caco-2 en los ensayos con las cepas ATCC, SAL004 (ST19) y SAL115 (ST213) (Fig. 3). Los valores observados de IL-1 β fueron por debajo de los 2 pg/ml, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre las tres cepas y el control de células sin infección. En cuanto a la IL-6, las tres cepas promovieron una mayor secreción en comparación con las células control sin infectar (7.6 pg/ml). La mayor secreción de esta citocina fue ocasionada por la cepa ATCC (34.63 pg/ml), seguida por la cepa SAL115 (ST213) (29.98 pg/ml) y por último la cepa SAL004 (ST19) (17.42 pg/ml). En cuanto a la citocina IL-8, no se observó secreción en células sin infectar, mientras que la cepa SAL115 (ST213) promovió la mayor secreción de esta citocina (22.77 pg/ml), seguida de la cepa ATCC (15.29 pg/ml) y la cepa SAL004 (ST19) (6.97 pg/ml).

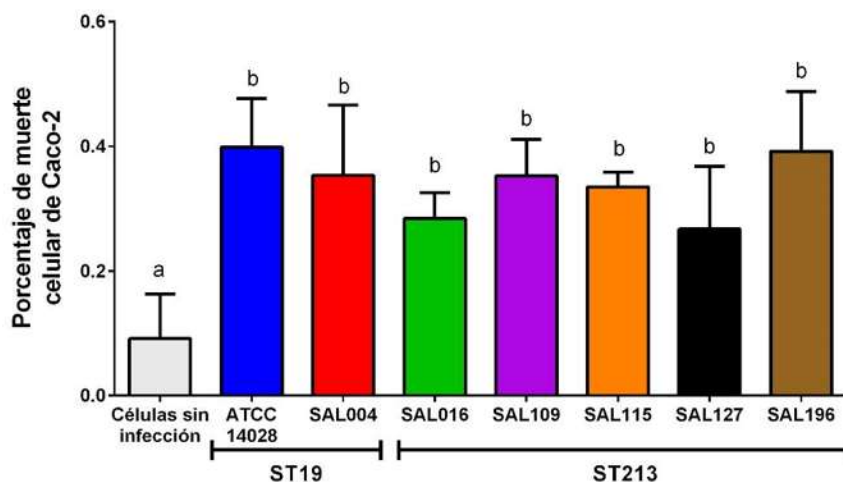


Figura 2. Porcentaje de muerte celular ocasionado por las cepas de *Salmonella enterica*. Células Caco-2 infectadas con *S. Typhimurium* ST19 y ST213 a una MOI de 20:1 bacterias por célula por 2 h. Los datos se representan como la media \pm D.E. del porcentaje de muerte celular. Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), ANOVA *post hoc* Tukey.

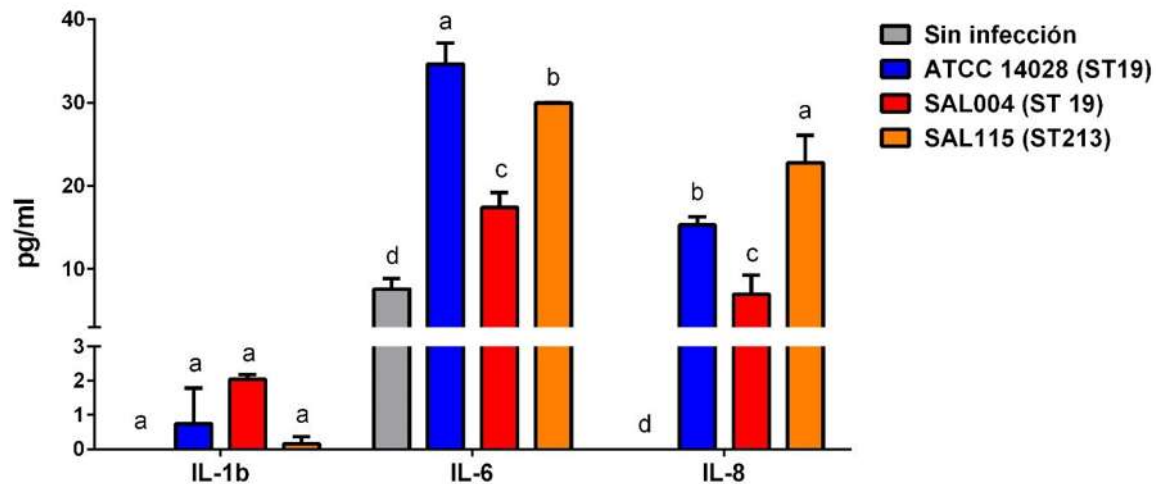


Figura 3. Concentración de citocinas pro-inflamatorias secretadas por las células Caco-2 durante el proceso de infección. Concentración de IL-1 β , IL-6 e IL-8 liberadas al medio extracelular de células infectadas con *S. Typhimurium* ST19 y ST213 a una MOI de 20:1 bacterias por célula por 2 h. Los datos se representan como la media \pm D.E. de la concentración de citocinas expresado en pg/ml. Medias con letras diferentes para cada citocina son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), ANOVA *post hoc* Tukey.

3.2. Observaciones clínicas de animales infectados con *S. enterica*

Al observar diferencias entre las cepas en los ensayos *in vitro*, se decidió evaluar la virulencia en un modelo *in vivo*. Para esta parte se seleccionaron tres cepas del genotipo ST213 (SAL109, SAL115, SAL127) que presentaron diferencias significativas en el proceso de invasión celular *in vitro*, así como las cepas ATCC y SAL004, ambas del genotipo ST19. Los datos clínicos que se midieron de forma cuantitativa fueron la temperatura rectal, el peso corporal y el peso de las heces. El día que se inoculó a los animales con las bacterias se muestra como el día cero, y a partir de ahí se registraron los datos clínicos especificados hasta el día cinco, cuando se sacrificó a los animales. En cuanto a la temperatura rectal, se consideró la media de la temperatura del día cero como temperatura basal y se comparó con la media de los demás días dentro de cada grupo. No se observaron diferencias en la temperatura en el grupo de animales sin infección a lo largo del periodo monitoreado, ni tampoco en el grupo infectado con SAL109 perteneciente al genotipo ST213 (Fig. 4). La cepa ATCC produjo un aumento en la temperatura ($\sim 1^\circ\text{C}$) de los animales en los días 4 y 5. Con las cepas SAL004 (ST19) y SAL115 (ST213) solo se observó un aumento ($\sim 0.5^\circ\text{C}$) al día 5, mientras que la cepa SAL127 fue la que produjo un mayor aumento en la temperatura ($0.5\text{-}1^\circ\text{C}$) de los animales en los días 2, 4 y 5.

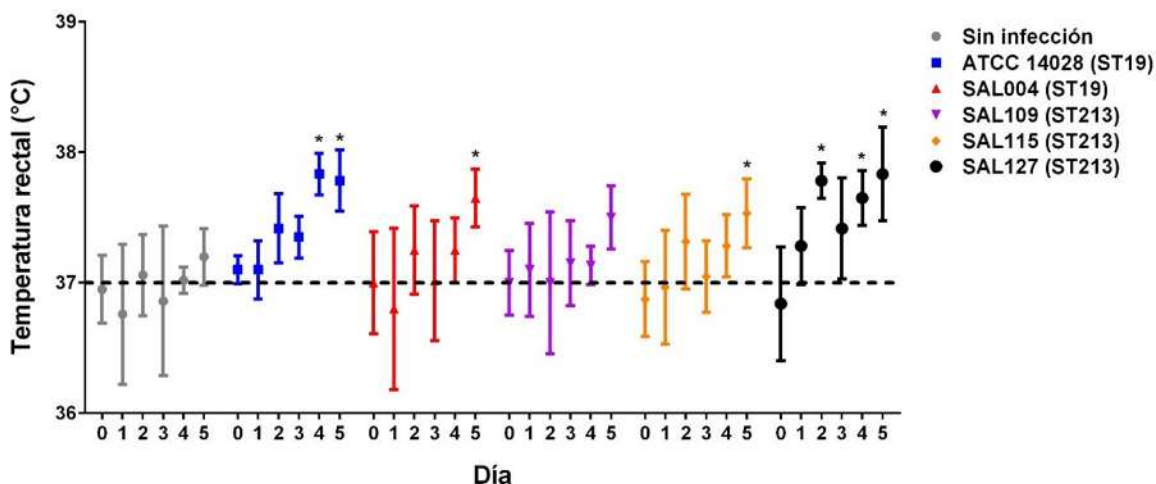


Figura 4. Temperatura rectal de ratas infectadas con las cepas de genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica*. Temperatura rectal de animales infectados con *S. Typhimurium* ST19 y ST213 del día 0 al día 5 *post* infección. Los datos se representan como la media \pm D.E. de la temperatura rectal en °C. Medias con “*” son estadísticamente diferente a la media del día 0 para cada grupo ($p < 0.05$). ANOVA *post hoc* Dunnett.

Otro dato clínico que se evaluó fue la ganancia o pérdida de peso de las ratas como resultado de la infección con las distintas cepas de *S. enterica* (Fig. 5). Se tomó como peso basal el registrado en el día -1 y este valor se restó al de los demás días para disminuir la variabilidad de peso inicial de cada animal. Al día cero todos los animales tuvieron una pérdida de peso, debido a que se les mantuvo sin alimento 14 h previo a la infección con las bacterias. El grupo sin infección recuperó su peso al día 1 y continuó ganando peso, siendo significativa la diferencia al día 4 (12 g) y 5 (16.3 g). De manera similar se comportaron los grupos infectados con las cepas ATCC y SAL127 (ST213), en los cuales se observó una ganancia de peso a los días 4 (8.9 y 10.1 g, respectivamente) y 5 (14.3 y 15.3 g respectivamente). Los animales infectados con la cepa SAL109 (ST213) recuperaron su peso después del día cero; sin embargo, no hubo diferencia estadística respecto al peso basal. Mientras que los grupos de animales infectados con SAL004 (ST19) y SAL115 (ST213) mostraron una pérdida de peso considerable durante todos los días monitoreados, siendo mayor al día tres del experimento con valores de -13.6 y -21.3 g, respectivamente.

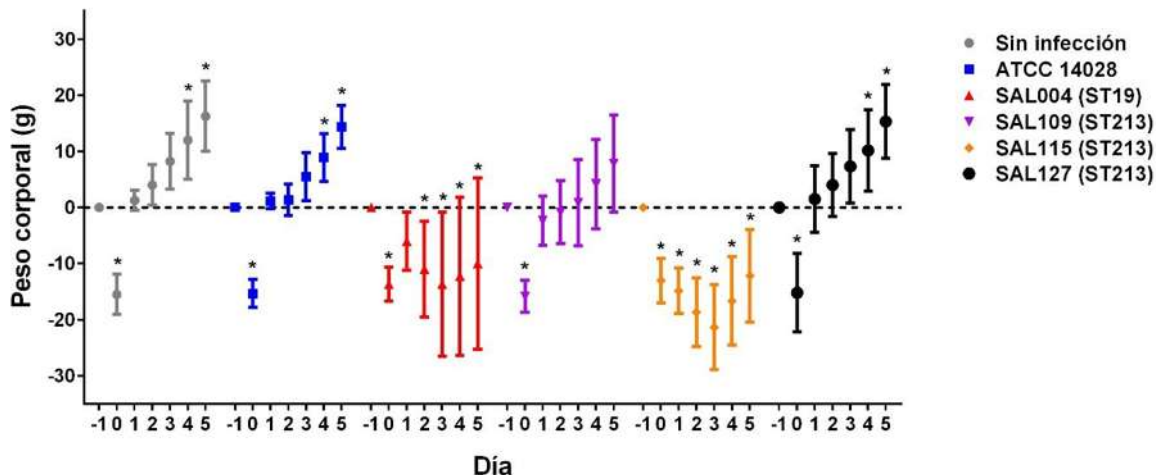


Figura 5. Ganancia de peso corporal de ratas infectadas con las cepas de *Salmonella enterica*. Peso corporal de animales infectados con *S. Typhimurium* ST19 y ST213 del día -1 al día 5 *post* infección. Los datos se representan como la media \pm D.E. del peso corporal en gramos. Medias con “*” son estadísticamente diferente a la media del día -1 para cada grupo ($p < 0.05$). ANOVA *post hoc* Dunnett.

Al evaluar el peso húmedo de las heces, en todos los grupos de animales hubo un descenso en dicho parámetro en el día 0, debido a que se retiró el alimento por 14 h antes de la infección (Fig. 6). En el grupo sin infección, así como en los grupos infectados con las cepas ATCC y SAL127 (ST213), el peso de las heces después del día 0 fue similar al registrado en el día -1. En el grupo infectado con SAL109 (ST213) solo se observó una disminución en el peso de las heces, además del día 0, en el día 3 *post* infección. Sin embargo, en el grupo infectado con la cepa SAL004 (ST19) hubo menor peso de las heces a los días 3, 4 y 5. Mientras que en el grupo infectado con la cepa SAL115 (ST213) el peso de las heces en todos los días *post* infección fue menor al registrado el día -1. En estos dos grupos (SAL004 y SAL115) se observó que los animales presentaban marcados signos de enfermedad como reducción de la ingesta de agua y alimento, pérdida de peso, piloerección y postración.

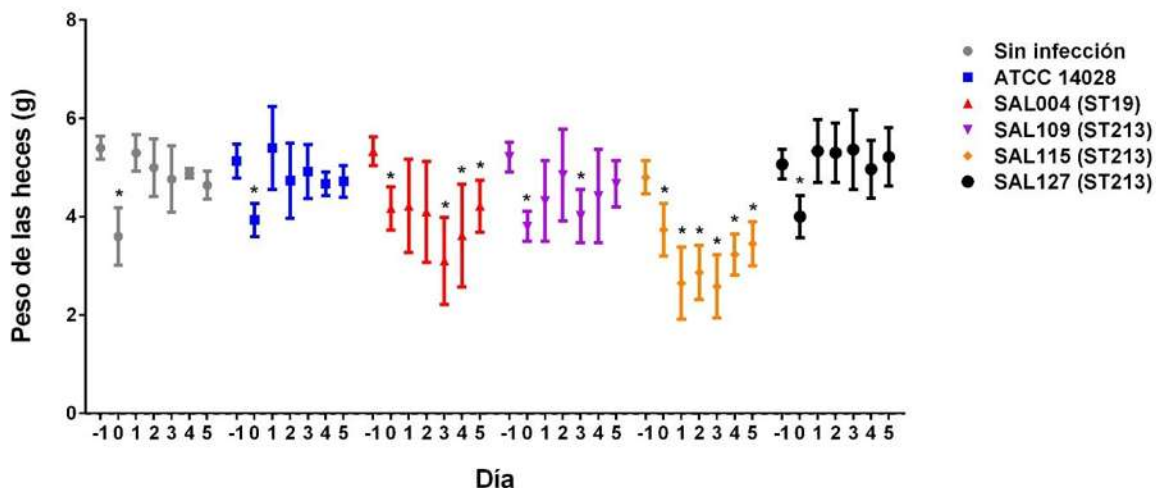


Figura 6. Peso húmedo de las heces de ratas infectadas con las cepas de estudio de *Salmonella enterica*. Peso húmedo de las heces de animales infectados con *S. Typhimurium* ST19 y ST213 del día -1 al día 5 *post* infección. Los datos se representan como la media \pm D.E. del peso húmedo de las heces en gramos. Medias con “*” son estadísticamente diferente a la media del día -1 para cada grupo ($p < 0.05$). ANOVA *post hoc* Dunnett.

3.3. Análisis microbiológico de las heces y tejidos

Al analizar el contenido microbiológico de las heces en los días 1, 3 y 5 en el grupo control sin infección no se encontró la presencia de *S. enterica* (Tabla 2). En todos los grupos infectados con las cepas de estudio se encontró carga bacteriana, siendo mayor en los días 3 (2.56-5.02) y 5 (3.19-4.48). En el día 1, en los tres grupos infectados con las cepas del genotipo ST213 se encontró mayor cantidad de UFC (3.42-4.47) en comparación con el grupo infectado con la cepa ATCC (1.81), mientras que solo el grupo de animales infectados con SAL127 (ST213) mostró mayor cantidad de UFC (4.47) en comparación con el infectado con SAL004 (ST19) (2.59). En el día 3, el grupo infectado con SAL109 (ST213) tuvo mayor cantidad de UFC (5.02) en comparación con ATCC (2.56) y SAL004 (ST19) (3.36), pero no existió diferencia con los otros genotipos ST213, mientras que las heces de los animales infectados con SAL127 (ST213) tenían mayor carga bacteriana (4.43) en comparación solo con los infectados con ATCC (2.56). En el día 5 no existió diferencia entre los diferentes grupos de animales infectados.

Al final del experimento, los animales fueron sacrificados y se removió parte del íleon, hígado y bazo para su análisis microbiológico. Se observó la presencia de *S. enterica*

en los tres tejidos de todos los grupos de animales infectados (Tabla 2). En el bazo se encontraron valores de entre 1.31 a 2.59 \log_{10} CFU g^{-1} sin encontrar diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos. En el hígado se presentó una mayor cantidad de bacterias únicamente en el grupo infectado con SAL115 (ST213) (3.31), en comparación con los animales infectados con ATCC (1.70), mientras que entre los demás grupos no se observó diferencia. Finalmente, en el íleon, el grupo infectado con SAL115 (ST213) mostró la mayor cantidad de bacterias (2.53) en comparación con los grupos SAL109 (1.31) y SAL127 (1.84) ambos genotipos ST213. Estos dos últimos grupos también mostraron menor cantidad de bacterias en comparación con el grupo ATCC (3.03).

Tabla 2. Análisis microbiológico (\log_{10} CFU g^{-1}) de heces y tejidos de ratas infectadas.

Genotipo/Cepa	Heces			Íleon	Hígado	Bazo
	Día 1	Día 3	Día 5			
ST19						
ATCC 14028	1.81 ± 1.15 ^c	2.56 ± 1.15 ^c	4.48 ± 0.94 ^a	3.03 ± 0.63 ^{ab}	1.70 ± 0.77 ^b	1.38 ± 0.87 ^a
SAL004	2.59 ± 1.16 ^{bc}	3.36 ± 1.08 ^{bc}	3.26 ± 1.03 ^a	3.01 ± 0.96 ^{abc}	2.56 ± 0.55 ^{ab}	2.59 ± 0.85 ^a
ST213						
SAL109	3.42 ± 1.13 ^{ab}	5.02 ± 0.39 ^a	3.45 ± 1.10 ^a	1.97 ± 0.93 ^{bc}	2.43 ± 0.55 ^{ab}	1.31 ± 0.88 ^a
SAL115	4.02 ± 1.05 ^{ab}	3.87 ± 1.04 ^{abc}	4.17 ± 0.59 ^a	4.38 ± 0.68 ^a	3.31 ± 0.37 ^a	2.53 ± 0.85 ^a
SAL127	4.47 ± 0.90 ^a	4.43 ± 0.91 ^{ab}	3.19 ± 1.02 ^a	1.60 ± 1.01 ^c	2.59 ± 0.54 ^{ab}	1.84 ± 0.86 ^a

Los valores para un mismo tipo de muestra biológica o tejido que tienen letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa. ANOVA *post hoc* Tukey, $p < 0.05$.

3.4. Análisis histopatológico

Al sacrificar a los animales se hizo un análisis macroscópico de los tejidos y no se encontró indicios de una enfermedad sistémica. Solo en dos animales infectados con la cepa SAL115 (ST213) y uno con SAL004 (ST19), se encontraron pequeñas protuberancias en algunas regiones del íleon. También se encontró únicamente en un animal infectado con SAL115 (ST213) indicios de daño hepático, el hígado presentaba pequeñas ulceraciones con un ligero cambio de color y mostró mayor volumen y peso en comparación a los hígados de los otros animales. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis histopatológico (Tabla 3 y Fig. 7). Se evaluó el nivel de daño celular con base en criterios como: la proporción vellosidad-cripta,

presencia y tamaño de tejido linfoide, presencia de infiltrado inflamatorio en lámina propia y submucosa, erosión de vellosidades y atrofia de las criptas. Con estos criterios se determinó si no hubo daño o si este fue leve, moderado o marcado.

Tabla 3. Análisis histológico de íleon y ciego de animales infectados con dos genotipos distintos de *Salmonella enterica*.

Genotipo/Cepa	Severidad del daño ¹	
	Íleon	Ciego
Sin infección (control)	-	-
ST19		
ATCC 14028	+	+
SAL004	++	+
ST213		
SAL109	+	+
SAL127	+	+
SAL115	+++	+++

¹ Severidad del daño ocasionado por la infección: - sin daño, + leve, ++ moderado, +++ marcado.

En los animales del grupo sin infección, no se encontró daño en el epitelio del íleon ni del ciego. En los grupos infectados con ATCC, SAL109 (ST213) y SAL127 (ST213) se observó un daño leve tanto en íleon como en ciego. Se encontraron ligeras alteraciones en las vellosidades y la presencia de infiltrado inflamatorio en la lámina propia, en algunas regiones del epitelio se observó también una ligera erosión de las vellosidades. En el grupo infectado con SAL004 (ST19), se observó un daño moderado en íleon, presentándose aquí un ensanchamiento del tejido linfoide asociado a zonas donde existía erosión de las vellosidades y pérdida de la continuidad de la arquitectura típica del epitelio intestinal. También se observó una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio en la submucosa en comparación con el grupo sin infección y los grupos donde existió un daño leve. En el ciego de animales infectados con SAL004 (ST19) el daño observado fue leve. El grupo infectado con SAL115 (ST213) fue el que más daño presentó, tanto en íleon como en ciego, catalogándose como marcado en ambos. En este grupo se observaron regiones con pérdida

total de las vellosidades, infiltrado inflamatorio en lámina propia y submucosa, así como alargamiento y ensanchamiento de las placas de Peyer. En el ciego se encontró la presencia de tejido linfoide asociado a zonas donde se perdió la continuidad y arquitectura típica de las criptas, además de infiltrado inflamatorio en la lámina propia y submucosa.

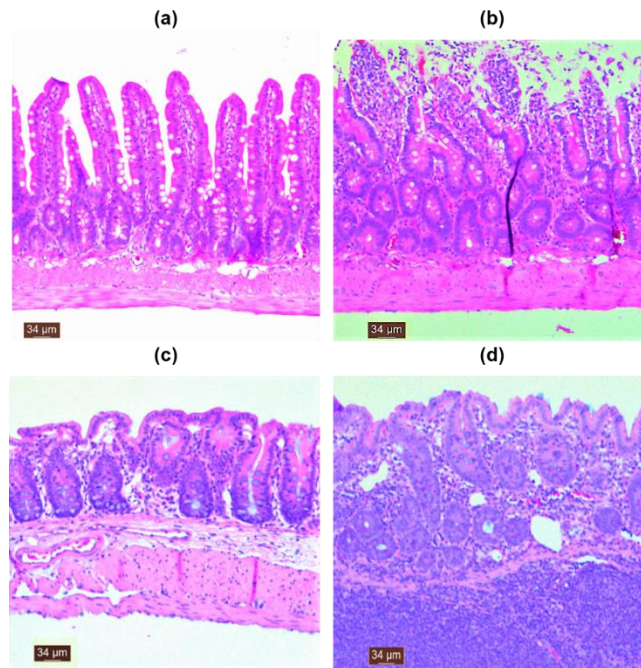


Figura 7. Histología de ratas sanas e infectadas con cepas de *Salmonella enterica*. (a) íleon de una rata sin infección, (b) íleon de una rata infectada con la cepa SAL115 (ST213), (c) ciego de una rata sin infección, (d) ciego de una rata infectada con la cepa SAL115 (ST213). Los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina. La barra es de 34 µm. Las imágenes son representativas de un total de 6 ratas por grupo sacrificadas al día 5 *post* infección.

4. Discusión

En la actualidad existen al menos tres casos documentados sobre la emergencia de nuevos genotipos o genotipos previamente descritos de *S. enterica*, tipificados mediante secuencia tipo (ST), que se han ido posicionando como los más prevalente en muestras clínicas o ambientales. En África, el genotipo ST313 se ha vuelto un genotipo predominante como causante de salmonelosis invasiva no tifoidea (iNTS, por sus siglas en inglés) (Kingsley et al., 2009). El genotipo ST34 ha emergido, como el más abundante en muestras de pacientes con diarrea en la Provincia de Guangdong, China (Sun et al., 2014). En México, el genotipo ST213 se ha ido convirtiendo como el más prevalente en muestras clínicas de

pacientes con diarrea y en muestras de alimentos (Wiesner et al., 2009). Los genotipos mencionados, tanto en el caso de China como en el de México, han ido desplazando al ST19, mientras que en el caso de África el otro genotipo aislado de las muestras clínicas de iNTS es también el ST19. Lo anterior es relevante ya que el genotipo ST19 es el de más amplia distribución global, el más abundante en diversas regiones del mundo y se ha propuesto como el genotipo fundador de las otras ST en el serotipo Typhimurium (Achtman et al., 2012). Después de la identificación inicial las secuencias tipo ST313 y ST213 como genotipos emergentes en África y México, respectivamente, estas han sido ya reportadas en otras regiones geográficas, lo que los convierte en genotipos de relevancia en salud pública a nivel global.

La evidencia generada muestra que cepas del genotipo ST313 han experimentado un proceso de reducción genómica y poseen características metabólicas y patogénicas únicas en comparación con otros linajes del serotipo Typhimurium (Carden et al., 2015; Okoro et al., 2015). También se ha reportado su deficiente capacidad de formar biofilm y para sobrevivir a estrés por desecación en comparación con ST19, lo que podría indicar que carece de mecanismos que le permitan sobrevivir fuera del ambiente de hospedero (Ramachandran et al., 2016). Todo lo anterior indica que el genotipo ST313 ha estado adaptándose a un estilo de vida asociado con una mayor especialización para causar enfermedad en poblaciones humanas, transmitiéndose directamente entre individuos infectados, aunque aún mantiene la habilidad de infectar y causar enteritis en múltiples hospederos (Ramachandran et al., 2017; Singletary et al., 2016; Yang et al., 2015). Por otra parte, previamente se ha reportado que cepas ST213 aisladas de humanos con infección sistémica muestran una virulencia atenuada en comparación con el genotipo ST19 en un modelo de infección en ratones (Wiesner et al., 2016). No obstante, nuestro grupo de trabajo ha documentado recientemente que el genotipo ST213 presenta mayor resistencia a las condiciones de estrés asociadas a la preservación de alimentos que el genotipo ST19 (Gómez-Baltazar et al., 2019, Capítulo I). Debido a que la resistencia al estrés muestra una correlación muy estrecha con el incremento de virulencia, y al hecho de que las cepas del presente trabajo provienen de muestras de alimentos contaminados, en contraste con las de muestras clínicas previamente analizadas del genotipo ST213 (Wiesner et al., 201; Wiesner et al., 2016), en este trabajo se analizó la patogenicidad entre cepas de los genotipos ST213 y ST19 provenientes de alimentos.

En los ensayos de internalización *in vitro* se observó variabilidad entre las cepas ST213; sin embargo, las cinco cepas de dicho genotipo evaluadas presentaron mayor internalización en comparación con el genotipo ST19. Las cepas evaluadas en este estudio fueron aisladas de diferentes tipos de alimentos procedentes de regiones geográficas con distintas condiciones climáticas, por lo que una explicación posible es que las diferencias intragenotipo observadas se deban al hecho de que cada cepa haya estado sujeta a condiciones particulares de estrés fuera del hospedero. Por ejemplo, se ha documentado que cuando *S. Typhmuriium* permanece largos periodos en agua de mar incrementa su capacidad de adherencia e invasión de hacia células Caco-2 (Chakroun et al., 2017). Así, a futuro sería interesante estudiar la variabilidad en la invasión *in vitro* entre cepas de genotipo ST213 y entre estas y las del genotipo ST19 cuando provienen de condiciones de estrés asociada a la preservación de alimentos, para evaluar en detalle la relación estrés-patogenicidad de este genotipo emergente.

Durante el proceso de infección *S. enterica* se adhiere e invade las células epiteliales no fagocíticas provocando un reordenamiento del citoesqueleto que causa plegamientos en la membrana plasmática para internalizar a las células bacterianas. Este proceso está mediado por el sistema de secreción de tipo III codificado por SPI-1 (T3SS-1), un complejo tipo “jeringa” con una aguja especializada empleada para unirse, formar un poro de “translocón” e inyectar proteínas de virulencia (efectores) en las células hospederas (Ayra et al., 2017). De manera interesante, la diferencia en la capacidad de invasión hacia células MDCK entre las cepas de referencia de *S. Typhimurium* ATCC SL1344 y ATCC 14028 se asoció estrechamente con diferencias en los patrones de expresión de genes de la isla de patogenicidad I (SPI-1) (Clark et al., 2011). Así, es posible que existan diferencias en los patrones de expresión del T3SS-1 entre el genotipo ST213 y el ST19, e inclusive, entre cepas del genotipo ST213, algo que debe de ser evaluado experimentalmente.

Las diferencias genómicas entre las cepas de los genotipos de estudio son una posibilidad adicional para explicar sus diferencias en las características de invasión *in vitro*. Las condiciones de estrés en ambientes fuera del hospedero previamente mencionadas, y la posibilidad de que algunas de las cepas hayan experimentado también condiciones de estrés, son factores que favorecen el reordenamiento del genoma, actuando como una presión selectiva que guía la evolución de la virulencia de microorganismos patógenos (Arnold et al.,

2007). En el caso de genotipos emergentes de *S. Typhimurium*, el análisis filogenético entre linajes ST313 de Reino Unido y África revelan un proceso común de degradación genómica, pero el linaje africano lleva un repertorio característico de genes de profagos y resistencia a antibióticos no presente en las cepas inglesas, lo que sugiere una fuerte presión de selección guiada en parte por la adquisición horizontal de elementos del genoma accesorio (Ashton et al., 2017). La secuenciación genómica de las cepas aquí estudiadas aportará evidencia para evaluar si en el genotipo ST213 se está presentando una disminución en el tamaño del genoma que pueda contribuir a un incremento en su virulencia hacia el ser humano.

Los resultados aquí obtenidos mostraron que no obstante las diferencias en la capacidad de internalización entre las cepas de estudio, los valores de muerte celular fueron similares y bajos. Sin embargo, al evaluar el perfil de expresión de citocinas proinflamatorias se observó que el genotipo ST213 promueve una mayor secreción de IL-6 e IL-8, en comparación con ST19. Gonzales et al., (2017) observaron que *S. Typhimurium* y *S. Typhi* inducen la secreción de IL-8, pero encontraron porcentajes menores al 5% de muerte en células *M-like* en todas las cepas evaluadas. Se sabe que tanto el factor de virulencia SopE2, introducido a la célula hospedera a través del SPI-1 T3SS, así como la flagelina, componente estructural del flagelo bacteriano, inducen la liberación de IL-8, un importante quimioattractor de neutrófilos en las células epiteliales (Gewirtz et al., 2001; Huang et al., 2004). Esto concuerda con la mayor internalización y secreción de IL-8 provocada por ST213. Por otro lado, la IL-6 es una citocina que puede activar señalización a través de un receptor de membrana y un receptor soluble. Curiosamente, estas dos vías difieren fuertemente en sus consecuencias biológicas. Mientras que la señalización a través del receptor unido a la membrana es principalmente regenerativa y protectora, la señalización a través del IL-6R soluble es bastante proinflamatoria (Schaper y Rose-John, 2015). Para los resultados aquí observados, la IL-6 podría estar ejerciendo un efecto regenerativo y protector en las células Caco-2 en una etapa temprana de la infección, lo que concordaría con la escasa muerte celular observada. Las diferencias en la producción de IL-6 e IL-8 encontradas en este estudio indican que la invasión por ST213 induce una respuesta inflamatoria de fase aguda, lo que puede contribuir al daño del epitelio intestinal. Por lo anterior, sería interesante realizar un monitoreo por tiempos más prolongados de infección para evaluar si se presenta un

porcentaje más alto de muerte, debido a los valores altos de producción de citocinas pro-inflamatorias en las etapas tempranas de infección.

El uso de cultivos celulares ha permitido dilucidar la compleja interacción de *S. enterica* con células del hospedero; sin embargo, la verdadera naturaleza de los efectos bacterianos en el sistema inmunológico no puede ser fácilmente estudiado *in vitro* (Finlay y Brumell, 2000). Así, el uso de modelos *in vivo* permite tener una mayor comprensión de la interacción patógeno-hospedero, aunque también tiene desventajas, ya que no hay un modelo experimental que replique todos los aspectos de una infección en humanos (Law et al., 2013). Es por ello que la combinación de modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* es la forma más adecuada de abordar el estudio de las interacciones patógeno-hospedero (Allen et al., 2001; Finlay y Brumell, 2000; Law et al., 2013).

Las ratas y los ratones son vectores importantes en la propagación de *S. enterica* en el medio ambiente y son un modelo útil para algunos aspectos de la salmonelosis en humanos, ya que los patrones de transporte intestinal y de electrolitos, factores importantes en las infecciones por *S. enterica*, son similares en ratas y en humanos (Naughton et al., 1996). Después de la administración vía oral de *S. enterica* en ratas, el intestino es rápidamente colonizado y puede ser detectada en 2 h, concentrándose principalmente en el íleon distal, el ciego y en las heces excretadas. La invasión se establece rápidamente a través de las células M en las placas de Peyer a las 8 h y la subsecuente infección sistémica resulta en la presencia de un gran número de bacterias en hígado y bazo (Havelaar et al., 2001). Por ello, también se evaluó aquí el efecto de las cepas de estudio en un modelo *in vivo*, utilizando un modelo experimental en ratas.

Todas las cepas fueron capaces de establecer una infección en el modelo, ya que se observó la presencia del patógeno en las heces y en los tejidos de los animales *post* infección. La cepa SAL115 (ST213) fue la más exitosa para infectar, ya que provocó marcados síntomas clínicos de enfermedad en los animales, alto contenido microbiológico en heces y tejidos, así como mayor daño a nivel tisular en comparación con las demás cepas y el control. Sin embargo, la cepa SAL004 (ST19) también provocó signos clínicos de enfermedad, daño tisular y no se observó diferencia en el contenido microbiológico tanto en heces como en tejidos en comparación con SAL115 (ST213). Esto no concuerda con lo observado en el

modelo *in vitro*, ya que con la cepa SAL004 (ST19) no se observó internalización ni muerte celular, así como una baja inducción de secreción de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, se ha demostrado que ciertas condiciones presentes en el intestino delgado son capaces de estimular la invasión de *S. enterica*. Por ejemplo, la baja concentración de oxígeno, la alta osmolaridad y el pH cercano a neutro, son capaces de inducir la expresión de genes de SPI-1 a través de HilA (Altier, 2005). También se ha demostrado que el acetato, ácido graso de cadena corta producido por microorganismos anaerobios del intestino grueso, a la concentración encontrada en el íleon, induce la invasión y la expresión de genes de SPI-1 (Lawhon et al., 2002). De igual manera se sabe que la mucosidad presente en el intestino delgado podría ser clave en la adherencia e internalización de *S. enterica*, ya que se ha observado una mayor internalización en células productoras de mucosidad como HT29-MTX en comparación con Caco-2 que no es capaz de secretar moco (Gagnon et al., 2013). Sin embargo, cabe resaltar que tanto en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, las cepas ST213 fueron capaces de infectar al hospedero. Esto es de relevancia, ya que estas cepas fueron aisladas de alimentos, por lo que constituyen un factor de riesgo a la salud pública asociado a la cadena de producción y distribución de alimentos. La capacidad de resistir condiciones ambientales y de estrés asociada a la preservación de alimentos (Gómez-Baltazar et al., 2019, Capítulo I), de sobrevivir y replicarse dentro de un hospedero y su multi-resistencia a antibióticos, podría explicar el éxito de este genotipo tanto para dispersarse geográficamente, como para llegar al hospedero y provocar enfermedad.

Referencias

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S., 2012. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* 8, e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Allen, C.A., Fedorka-Cray, P.J., Vazquez-Torres, A., Suyemoto, M., Altier, C., Ryder, L.R., Fang, F.C., Libby, S.J., 2001. In Vitro and In Vivo Assessment of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Virulence. *Infect. Immun.* 69, 4673–4677. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4673-4677.2001>
- Almeida, F., Seribelli, A.A., da Silva, P., Medeiros, M.I.C., Dos Prazeres Rodrigues, D., Moreira, C.G., Allard, M.W., Falcão, J.P., 2017. Multilocus sequence typing of *Salmonella Typhimurium* reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil.

- Infect. Genet. Evol. 51, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.009>
- Altier, C., 2005. Genetic and environmental control of salmonella invasion. *J. Microbiol.* 43 Spec No, 85–92.
- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Mol. Immunol.* 68, 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.025>
- Alvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Prieto, M., Messens, W., Lopez, M., Bernardo, A., Hill, C., 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology* 157, 3268–3281. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050351-0>
- Arnold, D.L., Jackson, R.W., Waterfield, N.R., Mansfield, J.W., 2007. Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. *Trends Genet.* 23, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.017>
- Arya, G., Holtslander, R., Robertson, J., Yoshida, C., Harris, J., Parmley, J., Nichani, A., Johnson, R., Poppe, C., 2017. Epidemiology, Pathogenesis, Genosertotyping, Antimicrobial Resistance, and Prevention and Control of Non-Typhoidal *Salmonella* Serovars. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* 4, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0057-7>
- Ashton, P.M., Owen, S. V., Kaindama, L., Rowe, W.P.M., Lane, C.R., Larkin, L., Nair, S., Jenkins, C., de Pinna, E.M., Feasey, N.A., Hinton, J.C.D., Dallman, T.J., 2017. Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella* Typhimurium epidemic in Africa. *Genome Med.* 9, 92. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0480-7>
- Calva, E., Silva, C., Zaidi, M.B., Sanchez-Flores, A., Estrada, K., Silva, G.G.Z., Soto-Jiménez, L.M., Wiesner, M., Fernández-Mora, M., Edwards, R.A., Vinuesa, P., 2015. Complete Genome Sequencing of a Multidrug-Resistant and Human-Invasive *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain of the Emerging Sequence Type 213 Genotype. *Genome Announc.* 3, e00663-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00663-15>
- Carden, S., Okoro, C., Dougan, G., Monack, D., 2015. Non-typhoidal *Salmonella* Typhimurium ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis. *Pathog. Dis.* 73, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu023>
- Chakroun, I., Cordero, H., Mahdhi, A., Morcillo, P., Fedhila, K., Cuesta, A., Bakhrouf, A., Mahdouani, K., Esteban, M. Á., 2017. Adhesion, invasion, cytotoxic effect and cytokine production in response to atypical *Salmonella* Typhimurium infection. *Microbial Pathogenesis.* 106: 40-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.004>
- Clark, L., Perrett, C. A., Malt, L., Harward, C., Humphrey, S., Jepson, K. A., Martinez-Argudo, I., Carney, L. J., La Ragione, R. M., Humphrey, T. J., Jepson, M. A., 2011. Differences in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain invasiveness are associated with heterogeneity in SPI-1 gene expression. *Microbiology.* 157(Pt 7): 2072

–2083. doi: 10.1099/mic.0.048496-0

- Coburn, B., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2007. Salmonella , the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85, 112–118. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>
- Feasey, N. A., Hadfield, J., Keddy, K. H., Dallman, T. J., Jacobs, J., Deng, X., Wigley, P., Barquist, L., Langridge, G. C., Feltwell, T., Harris, S. R., et al., 2016. Distinct Salmonella Enteritidis lineages associated with enterocolitis in high-income settings and invasive disease in low-income settings. *Nature Genetics.* 48(10): 1211-1217. doi:10.1038/ng.3644.
- Finlay, B.B., Brummell, J.H., 2000. Salmonella interactions with host cells: in vitro to in vivo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 623–31. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0603>
- Gagnon, M., Zihler Berner, A., Chervet, N., Chassard, C., Lacroix, C., 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *J. Microbiol. Methods* 94, 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
- Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., Madara, J.L., 2001. Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *J. Immunol.* 167, 1882–1885. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1882>
- Gonzales, A.M., Wilde, S., Roland, K.L., 2017. New Insights into the Roles of Long Polar Fimbriae and Stg Fimbriae in Salmonella Interactions with Enterocytes and M Cells. *Infect. Immun.* 85, e00172-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00172-17>
- Gómez-Baltazar, A., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Larsen, J., Kuk-Soberanis, M. E., Vázquez-Marrufo, G., 2019. Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of Salmonella enterica serotype Typhimurium. *Food Microbiology.* 82: 303-315. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.010>
- Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I., 2008. Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
- Havelaar, A.H., Garssen, J., Takumi, K., Koedam, M.A., Dufrenne, J.B., Van Leusden, F.M., De La Fonteyne, L., Bousema, J.T., Vos, J.G., 2001. A rat model for dose-response relationships of Salmonella Enteritidis infection. *J. Appl. Microbiol.* A. H., Garssen, J., Tak. K., Koedam, M. A., Dufrenne, J. B., Van Leusden, F. M., La Fonteyne, L., Bousema, J. T. Vos, J. G. ‘A rat Model dose-response relationships Salmonella Enteritidis 91, 442–452. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01399.x>
- Herrero-Fresno, A., Olsen, J.E., 2018. Salmonella Typhimurium metabolism affects virulence in the host - A mini-review. *Food Microbiol.* 71, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.016>
- Huang, F.-C., Werne, A., Li, Q., Galyov, E.E., Walker, W.A., Cherayil, B.J., 2004. Cooperative Interactions between Flagellin and SopE2 in the Epithelial Interleukin-8 Response to Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection. *Infect. Immun.* 72, 5052–5062. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5052-5062.2004>

- Ibarra, J.A., Steele-Mortimer, O., 2009. Salmonella--the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell. Microbiol.* 11, 1579–86. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01368.x>
- Jones, T. F., Ingram, L. A., Cieslak, P. R., Vugia, D. J., Tobin-D'Angelo, M., Hurd, S., Medus, C., Cronquist, A., Angulo, F. J., 2008. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *The Journal of Infectious Diseases.* 198(1): 109-114. DOI: 10.1086/588823
- Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Thomson, N.R., Kariuki, S., Holt, K.E., Gordon, M.A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M.E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C.A., Heyderman, R.S., Dougan, G., 2009. Epidemic multiple drug resistant Salmonella Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Res.* 19, 2279–2287. <https://doi.org/10.1101/gr.091017.109>
- Knodler, L.A., 2015. Salmonella enterica: living a double life in epithelial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.10.010>
- Kurtz, J.R., Goggins, J.A., McLachlan, J.B., 2017. Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunol. Lett.* 190, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>
- LaRock, D.L., Chaudhary, A., Miller, S.I., 2015. Salmonellae interactions with host processes. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro3420>
- Law, R.J., Gur-Arie, L., Rosenshine, I., Finlay, B.B., 2013. In Vitro and In Vivo Model Systems for Studying Enteropathogenic Escherichia coli Infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a009977–a009977. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009977>
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M., Altier, C., 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter Salmonella typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* 46, 1451–1464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03268.x>
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M., 2010. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 50, 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Naughton, P.J., Grant, G., Spencer, R.J., Bardocz, S., Pusztai, A., 1996. A rat model of infection by Salmonella typhimurium or Salm. enteritidis. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 651–6.
- Okoro, C.K., Barquist, L., Connor, T.R., Harris, S.R., Clare, S., Stevens, M.P., Arends, M.J., Hale, C., Kane, L., Pickard, D.J., Hill, J., Harcourt, K., Parkhill, J., Dougan, G., Kingsley, R. a., 2015. Signatures of Adaptation in Human Invasive Salmonella Typhimurium ST313 Populations from Sub-Saharan Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003611. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003611>
- Okoro, C.K., Kingsley, R.A., Connor, T.R., Harris, S.R., Parry, C.M., Al-Mashhadani, M.N., Kariuki, S., Msefula, C.L., Gordon, M.A., de Pinna, E., Wain, J., Heyderman, R.S., Obaro, S., Alonso, P.L., Mandomando, I., MacLennan, C.A., Tapia, M.D., Levine, M.M., Tennant, S.M., Parkhill, J., Dougan, G., 2012. Intracontinental spread

- of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat. Genet.* 44, 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/ng.2423>
- Ramachandran, G., Aheto, K., Shirtliff, M.E., Tennant, S.M., 2016. Poor biofilm-forming ability and long-term survival of invasive *Salmonella* Typhimurium ST313. *Pathog. Dis.* 74, 1–35. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw049>
- Ramachandran, G., Panda, A., Higginson, E.E., Ateh, E., Lipsky, M.M., Sen, S., Matson, C.A., Permala-Booth, J., DeTolla, L.J., Tennant, S.M., 2017. Virulence of invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 in animal models of infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005697. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005697>
- Schaper, F., Rose-John, S., 2015. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.004>
- Shi, C., Singh, P., Ranieri, M.L., Wiedmann, M., Moreno Switt, A.I., 2013. Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. *Crit. Rev. Microbiol.* 7828, 309–325. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.837862>
- Silva, C., Calva, E., Calva, J.J., Wiesner, M., Vinuesa, P., Fernández-Mora, M., Puente, J.L., Vinuesa, P., 2015. Complete Genome Sequence of a Human-Invasive *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Strain of the Emerging Sequence Type 213 Harboring a Multidrug Resistance IncA / C Plasmid and a bla CMY-2 -. *Genome Announc.* 3, 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01323-15>. Copyright
- Singletary, L.A., Karlinsey, J.E., Libby, S.J., Mooney, J.P., Lokken, K.L., Tsohis, R.M., Byndloss, M.X., Hirao, L.A., Gaulke, C.A., Crawford, R.W., Dandekar, S., Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Heyderman, R.S., Fang, F.C., 2016. Loss of Multicellular Behavior in Epidemic African Nontyphoidal *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium ST313 Strain D23580. *MBio* 7, e02265. <https://doi.org/10.1128/mBio.02265-15>
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C., 2014. The Molecular Epidemiological Characteristics and Genetic Diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS One* 9, e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>
- Wiesner, M., Calva, E., Fernández-Mora, M., Cevallos, M. a, Campos, F., Zaidi, M.B., Silva, C., 2011. *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiol.* 11, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-9>
- Wiesner, M., Calva, J.J., Bustamante, V.H., Pérez-Morales, D., Fernández-Mora, M., Calva, E., Silva, C., 2016. A multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the bla CMY-2 gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC Microbiol.* 16, 18. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0633-7>
- Wiesner, M., Zaidi, M.B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J.J., Silva, C., 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella* enterica serovar

Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* 9, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>

Wotzka, S.Y., Nguyen, B.D., Hardt, W.-D., 2017. Salmonella Typhimurium Diarrhea Reveals Basic Principles of Enteropathogen Infection and Disease-Promoted DNA Exchange. *Cell Host Microbe* 21, 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.009>

Yang, J., Barrila, J., Roland, K.L., Kilbourne, J., Ott, C.M., Forsyth, R.J., Nickerson, C. a., 2015. Characterization of the Invasive, Multidrug Resistant Non-typhoidal Salmonella Strain D23580 in a Murine Model of Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003839. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003839>

CAPÍTULO IV

Variabilidad de la respuesta a estrés de cepas de *Salmonella enterica* Typhimurium ST213 aisladas de alimentos

1. Introducción

Salmonella enterica es una bacteria Gram-negativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y representa una gran carga de morbilidad y mortalidad en salud pública y animal, lo que tiene un fuerte impacto social y económico a nivel mundial (Arya et al., 2017). Las enfermedades ocasionadas por *S. enterica* no tifoidea (NTS) son la mayor causa de enfermedades diarreicas a nivel mundial, estimándose 93 millones de infecciones entéricas y 155,000 muertes por diarrea anualmente. Sin embargo, estas estimaciones no incluyen las enfermedades ocasionadas por NTS invasivas (iNTS), las cuales solo en 2010 provocaron 3.4 millones de casos de enfermedad y más de 600 mil muertes, y que por lo general no están asociadas a enfermedades diarreicas (Ao et al., 2015).

S. enterica está ampliamente distribuida en la naturaleza, es capaz de sobrevivir en ambientes relacionados con el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de hospederos, así como en ambientes relacionados con la producción de alimentos (Carrasco et al., 2012). En estos ambientes deben de sobrevivir a una amplia variedad de condiciones que pueden ser adversas para su crecimiento y replicación. Para ello cuentan con respuestas fisiológicas que se activan en presencia de estas condiciones de estrés para sobrevivir y replicarse una vez que las condiciones sean más favorables (Spector y Kenyon, 2012). Algunas de estas respuestas incluyen la activación de sistemas que restablezcan la homeostasis celular, síntesis de proteínas relacionadas con la protección y reparación del ADN, modificaciones de la membrana, activación de bombas de eflujo, formación de filamentos y formación de biofilm, entre otras (Álvarez-Ordóñez et al., 2008; Justice et al., 2008; Lianou y Koutsoumanis, 2012; Spector y Kenyon, 2012).

La vigilancia epidemiológica de *S. enterica* en muchas regiones del mundo se centra en su identificación mediante la serotipificación; sin embargo, ésta presenta una serie de desventajas (Shi et al., 2013). Múltiples herramientas genético-moleculares han sido utilizadas para la tipificación y seguimiento de brotes de *Salmonella*, siendo una de ellas es el *Multilocus Sequence Typing* (MLST). La tipificación mediante MLST tiene el potencial de reemplazar completamente la serotipificación, sobre el cual posee múltiples ventajas (Achtman et al., 2012). Mediante el uso de MLST se ha logrado identificar fenómenos de reemplazo de una ST por otra en regiones geográficas en particular, por ejemplo en África el

genotipo ST313 es uno de los genotipos dominantes en la región (Kingsley et al., 2009), en China es ST34 (Sun et al., 2014), mientras que en México ST213 es el más prevalente (Wiesner et al., 2009) desplazando en todos los casos a ST19 que es la más abundante en otras regiones del mundo (Achtman et al., 2012).

Hasta donde se sabe, son pocos los estudios realizados con ST involucradas en fenómenos de reemplazo. La más ampliamente estudiada es ST313 de origen africano, con la cual se han hecho análisis de genomas, capacidades metabólicas, potencial enteropatogénico y su habilidad para sobrevivir fuera del hospedero (Carden et al., 2015; Okoro et al., 2015; Ramachandran et al., 2017, 2016; Singletary et al., 2016; Yang et al., 2015). En el caso de ST213, fue detectada por primera vez en México en 2001 y ha sido aislada de humanos y de alimentos de origen animal, estando presente en mayor porcentaje en alimentos que en humanos (Wiesner et al., 2009), se ha asociado con un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (Wiesner et al., 2011), se han secuenciado 2 genomas de cepas ST213 aisladas de humanos con infecciones sistémicas (Calva et al., 2015; Silva et al., 2015) y se probaron estas dos cepas en un modelo de infección en ratones donde observaron una virulencia atenuada en comparación con ST19 (Wiesner et al., 2016).

Previamente, nuestro grupo de trabajo realizó un análisis comparativo entre la capacidad de resistir condiciones de estrés asociadas a la preservación de los alimentos entre una cepa ST19 y una ST213 aisladas de alimentos en México, observando que ST213 tenía una mayor capacidad de resistir condiciones de estrés en comparación con ST19 (Gómez-Baltazar et al., 2019, Capítulo I). Sin embargo, se desconoce si esta capacidad de resistir estrés ambiental se comparte entre más cepas del genotipo ST213, por lo que en este estudio, se evaluó la capacidad de resistir condiciones de estrés asociadas a la preservación de los alimentos entre diferentes cepas de *S. enterica* Typhimurium pertenecientes al genotipo ST213.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas

Las cepas de estudio pertenecen al genotipo ST213 de *Salmonella enterica* Typhimurium y fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán. La información de las cepas se muestra en la tabla 1. Para la asignación de secuencia tipo

(ST) se utilizó el esquema Multilocus Sequence Typing (MLST), determinando los perfiles alélicos para los genes de mantenimiento *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* y *thrA* empleando el esquema de 7 loci de acuerdo al protocolo descrito en el sitio web MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica.html>). Los números de alelos y secuencias tipo fueron asignadas de acuerdo a la base de datos MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>).

5.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos de las cepas de estudio se obtuvieron inoculando una colonia en 10 ml de caldo Luria-Bertani (LB) e incubando por toda la noche a 37°C y 180 rpm. Estos cultivos fueron usados como control de bacterias sin estrés. Para simular las condiciones de estrés se utilizó un esquema que simula las condiciones de preservación de los alimentos descrito previamente (Humphrey et al., 2011). Para ello se modificó la formulación del caldo LB (170 mM NaCl, pH 7.0) con NaCl y HCl hasta lograr la concentración de sal y pH deseados de la siguiente manera: 685 mM NaCl, pH 7.0 (LBraw), 170 mM NaCl, pH 3.5 (LBac) y 685 mM NaCl, pH 3.5 (LBraw-ac). Los cultivos bacterianos con estrés fueron preparados inoculando una colonia en 10 ml de caldo LB y se incubó por toda la noche a 37°C y 180 rpm. El cultivo se centrifugó a 1360 x g por 5 minutos y el pellet se re-suspendido en 10 ml de caldo LBraw, LBac o LBraw-ac. Los cultivos fueron incubados estáticamente a temperatura ambiente ($\approx 22^{\circ}\text{C}$) o en refrigeración (4°C) por 8 días.

2.3. Viabilidad de cepas ST213 sometidas a estrés

La viabilidad de las cepas de estudio se evaluó partiendo de cultivos estresados por 8 días bajo las diferentes condiciones de estrés y de cultivos sin estrés. Se utilizó el kit LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Este kit contiene una mezcla 1:1 de los marcadores SYTO-9 y yoduro de propidio, los cuales son capaces de teñir los ácidos nucleicos. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor. El porcentaje de bacterias vivas y muertas se evaluó usando un citómetro BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.4. Curvas de crecimiento *post* estrés

Después del periodo de estrés, los cultivos se centrifugaron (1360 x g, 5 min), la pastilla celular se resuspendió y diluyó 1:200 (v/v) en 10 ml de caldo LB, incubando a 37°C

y 180 rpm. Cada 2 h se midió la densidad óptica (OD_{600}) de los cultivos en crecimiento durante 6 h.

2.5. Formación de células filamentosas

Las cepas de estudio fueron incubadas en la condición de estrés LBraw y en medio control LB previamente descritos, a temperatura ambiente o en refrigeración por 8 días. Después del periodo de estrés, se evaluó la formación de células filamentosas mediante la tinción de Gram. Las células teñidas fueron visualizadas con un microscopio Leica® equipado con una cámara ICC50 HD. Aquellas células que presentaron un tamaño tres veces mayor que el de células normales (2 a 3 μm) se consideraron como filamentosas.

2.6. Formación y actividad metabólica del biofilm

La formación de biofilm se evaluó utilizando el ensayo colorimétrico tiñendo con cristal violeta (Burton et al., 2006). Cultivos de toda la noche se diluyeron 1:100 en 10 ml de los distintos medios (LB, LBraw, LBac y LBraw-ac) y 200 μl de estas diluciones se colocaron en placas de 96 pozos de poliestireno. Las placas se incubaron a temperatura ambiente o en refrigeración por 8 días. Después del periodo de incubación, se removió el medio con cuidado, cada pozo se lavó tres veces con 200 μl de PBS (0.1 M, pH 7.4) y se dejó secar por 15 min. Las células unidas a la placa se tiñeron con 200 μl de cristal violeta (0.4%) por 15 min a temperatura ambiente. El colorante no unido a las células se removió y cada pozo se lavó tres veces con 200 μl de PBS. Se dejó secar la placa y se adicionaron 200 μl de ácido acético (33%). La placa se agitó por 60 segundos y se leyó a 595 nm usando el lector Microplate Reader iMark (Bio-Rad, USA). Para evaluar la actividad metabólica se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente pero con algunas modificaciones (Trafny et al., 2013). En lugar de añadir cristal violeta a cada pozo, se agregaron 190 μl de PBS más 10 μl de una solución de 5 mg/ml de 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma, USA). La placa se incubó por 2 h a 37°C en oscuridad. Posteriormente se removió el contenido de cada pozo, se adicionaron 200 μl de isopropanol/HCl (19:1 v/v) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. La placa se agitó por 60 segundos y se leyó a 595 nm usando el lector Microplate Reader iMark (Bio-Rad, USA).

2.7. Motilidad de las cepas ST213

Para evaluar la motilidad bacteriana se realizaron ensayos de nado para cada cepa de estudio bajo condiciones sin estrés. A partir de cultivos de toda la noche, se inoculó por picadura en el centro de placas de agar LB (0.3% agar). Las placas se incubaron a 37°C por 8 h. La región visible de propagación de las cepas en el medio se midió en milímetros (Martins et al., 2013).

2.8. Ensayos de invasión en un modelo celular

Los ensayos de invasión se realizaron en células Caco-2 utilizando el ensayo de protección con gentamicina como se ha descrito previamente (Alva-Murillo et al., 2015) con algunas modificaciones. Los cultivos bacterianos de toda la noche y estresados por 8 días se centrifugaron (1360 x g, 5 min) y se diluyeron para obtener una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC/ml. Las células Caco-2 se infectaron con estas suspensiones bacterianas con una multiplicidad de infección (MOI) de 20:1 bacterias por célula y se incubaron durante 2 h en 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, las células Caco-2 se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con gentamicina (80 µg/ml) durante 1 h a 37°C para eliminar las bacterias extracelulares. Finalmente, las células Caco-2 se despegaron con tripsina-EDTA (Sigma, USA) y se lisaron con 250 µl de agua destilada estéril y fría. Se hicieron las diluciones apropiadas con los lisados de Caco-2, se esparcieron 100 µl en placas de agar LB y se incubaron durante la noche a 37°C. Las UFC se contaron utilizando un equipo *Scan 500 automatic colony counter* (Interscience, Saint Nom, Francia).

2.9. Análisis de agrupamiento

Con los datos obtenidos de viabilidad, crecimiento *post* estrés, formación de biofilm, actividad metabólica del biofilm e invasión, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) para separar a las cepas ST213 en diferentes clases. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para medir la similitud y el agrupamiento se realizó con el algoritmo UPGMA. El HCA y los dendrogramas se realizaron con el software PAST 3.20.

2.10. Análisis estadístico

Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado para cada experimento. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism

Version 6.01. Para cada experimento se calculó la media y desviación estándar (S.D.) y se realizaron pruebas ANOVA con ajuste *post hoc* Tukey para observar si existían diferencias entre los grupos, considerando una $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 1. Datos de las cepas de *Salmonella enterica* ST213 usadas en este estudio.

Cepa	Especie	Serotipo	Secuencia Tipo (ST)	Fuente de aislado	Lugar de aislado
SAL016	<i>S. enterica</i>	Typhimurium	ST213	Carne de res	Morelia, México
SAL109	<i>S. enterica</i>	Typhimurium	ST213	Carne de res	Zamora, México
SAL115	<i>S. enterica</i>	Typhimurium	ST213	Queso	Tanhuato, México
SAL127	<i>S. enterica</i>	Typhimurium	ST213	Carne de res	La Piedad, México
SAL196	<i>S. enterica</i>	Typhimurium	ST213	Chorizo	Pátzcuaro, México

3. Resultados

3.1. Viabilidad y crecimiento *post* estrés

Se evaluó la viabilidad de las diferentes cepas al término de los 8 días de incubación en condiciones de estrés (Fig. 1) y posteriormente, al retirar el estrés, su capacidad de crecer en condiciones óptimas por 6 h (Tabla 2). Para observar si existía *a priori* una diferencia entre las cepas ST213 estudiadas, se evaluó la viabilidad y crecimiento de cultivos de toda la noche sin estrés. No se observó diferencia en la viabilidad entre las diferentes cepas, siendo esta de alrededor del 90%. Al diluir y recuperar el crecimiento de las células provenientes de dichos cultivos por 6 h, tampoco se observó diferencia en el área bajo la curva (AUC) de las cinéticas de crecimiento que presentaban cada cepa. Posteriormente, se evaluó la viabilidad y crecimiento *post* estrés de las cepas sometidas a condiciones de preservación de los alimentos por 8 días (Fig. 1 y tabla 2). Cuando se incubó en LBraw a temperatura ambiente (RT) se presentaron variaciones en la viabilidad de las diferentes cepas. Mientras que las cepas SAL016 y SAL127 presentaban porcentajes de viabilidad alrededor del 90%, las demás cepas mostraron porcentajes de viabilidad por debajo del 70%; sin embargo, no se observaron diferencias en el AUC de las cinéticas de crecimiento *post* estrés. Por otro lado, cuando se incubaron en LBraw en refrigeración, se presentaron valores de viabilidad más altos en comparación con la incubación en el mismo medio pero a RT para las cepas SAL109 y SAL115 (~70%), aunque siguió siendo inferior a los valores mostrados por las cepas SAL016 y SAL127 (~90%). Cuando se evaluó el crecimiento *post* estrés, solo la cepa SAL127 presentó un menor crecimiento en comparación con SAL016 y SAL196.

Otra condición de estrés evaluada fue por un pH ácido (LBac), en la cual interesantemente cuando se incubó a RT se presentaron diferencias significativas entre las cepas de estudio. En particular, la cepa SAL115 presentó el valor más bajo de viabilidad (29%). Sin embargo, al incubar en condiciones de refrigeración, 4 de las cepas se comportaron de manera similar, siendo la cepa SAL016 la que mostró el menor porcentaje de viabilidad (45%) en comparación con el resto (~85%). Al evaluar el crecimiento *post* estrés bajo estas condiciones, las células que provenían de refrigeración mostraron los valores más bajos de AUC en comparación con el resto de cinéticas, a pesar de los altos valores de viabilidad presentados por la mayoría, siendo la cepa SAL127 la que menor crecimiento tuvo, tanto en refrigeración como en RT (35 y 20, respectivamente). Cuando se combinaron el estrés osmótico y ácido (LBraw-ac) se observaron valores de viabilidad por debajo del 70% para todas las cepas, tanto en refrigeración como en RT. En esta última condición de temperatura la cepa SAL127 presentó la viabilidad más alta (70%), en comparación con SAL016, SAL109 y SAL196 (~50%). En refrigeración la cepa SAL115 fue la que menor viabilidad presentó (38%), en comparación con el resto de cepas. Al evaluar el crecimiento *post* estrés bajo esta condición de tipos de estrés en RT, solo las cepas SAL016 y SAL109 mostraron curvas similares (~115). El resto presentaron cinéticas diferentes, siendo SAL196 la de mayor crecimiento (139) y SAL127 la de menor crecimiento (99). Al observar las curvas de las cepas provenientes de LBraw-ac en refrigeración, también se presentaron valores bajos de AUC, al igual que cuando provenían de LBac en refrigeración, existiendo diferencia entre todas las cepas. Así, la combinación de estrés ácido y refrigeración fue la que más afectó el crecimiento *post* estrés de las cepas evaluadas.

Tabla 2. Área bajo la curva (AUC) del crecimiento *post* estrés de las cepas de *Salmonella enterica* ST213.

Cepa	Sin estrés	Condiciones de estrés					
		LB raw		LB ac		LB raw – ac	
		RT	4°C	RT	4°C	RT	4°C
SAL016	99.95 ± 1.42 a	109.6 ± 2.99 a	121.3 ± 1.01 a	111.7 ± 2.08 a	64.61 ± 2.01 a	115.4 ± 1.94 c	31.33 ± 1.27 d
SAL109	110.2 ± 8.99 a	96.10 ± 1.89 a	98.78 ± 5.50 ab	97.69 ± 8.34 a	58.65 ± 9.85 a	112.2 ± 1.04 c	70.87 ± 1.79 a
SAL115	130.3 ± 16.40 a	102.8 ± 10.77 a	100.3 ± 10.0 ab	86.05 ± 19.39 a	49.22 ± 13.24 a	127.6 ± 2.05 b	36.17 ± 2.41 c
SAL127	126.2 ± 17.64 a	97.30 ± 14.61 a	81.37 ± 7.74 b	35.43 ± 5.60 b	20.27 ± 2.73 b	99.74 ± 1.17 d	11.75 ± 1.36 e
SAL196	118.9 ± 10.75 a	107.0 ± 3.15 a	113.8 ± 7.15 a	109.5 ± 3.75 a	44.76 ± 7.19 ab	139.1 ± 1.81 a	58.83 ± 1.75 b

Letras distintas en cada columna indican diferencia estadísticamente significativa. ANOVA *post hoc* Tukey, p<0.05.

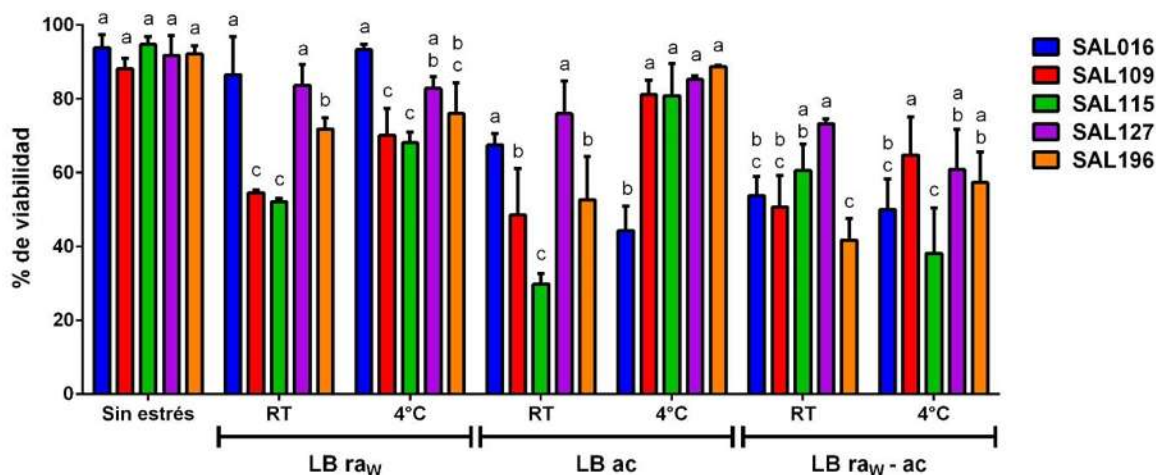


Figura 1. Viabilidad de las cepas de *S. Typhimurium* ST213 después de ser incubadas en condiciones de estrés. Las condiciones de estrés simularon baja actividad de agua (LB_{ra_w}), pH 3.5 (LB_{ac}) y la combinación de ambas (LB_{ra_w}-ac), incubadas a temperatura ambiente (RT) o refrigeración (4°C) por 8 días. Los datos se representan como la media ± D.E. Medias con diferentes letras dentro de cada condición evaluada son diferentes estadísticamente (p<0.05). ANOVA con comparación múltiple de Tukey.

3.2. Formación de células filamentosas

Para evaluar la formación de células filamentosas, se seleccionaron únicamente las condiciones de LB y LB_{ra_w} tanto a RT como a 4°C (Tabla 3). Se observó que en LB a RT solo la cepa SAL127 fue capaz de formar células filamentosas, mientras que en LB_{ra_w} a RT todas las cepas a excepción de SAL016 formaron filamentos. Interesantemente, cuando se incubaron a 4°C tanto en LB como en LB_{ra_w}, todas las cepas fueron capaces de formar filamentos, por lo que la refrigeración está de algún modo activando respuestas fisiológicas que conllevan a la formación de estas células elongadas.

Tabla 3. Formación de células filamentosas en las cepas de *Salmonella enterica* ST213 después de 8 días bajo condiciones de estrés.

Cepa	Condiciones de estrés				
	LB		LB _{ra_w}		
	RT	4°C	RT	4°C	
SAL016	-	+	-	+	
SAL109	-	+	+	+	
SAL115	-	+	+	+	
SAL127	+	+	+	+	
SAL196	-	+	+	+	

LB_{ra_w}: NaCl 685mM, RT: Temperatura ambiente

+, formación de filamentos

-, no hubo formación de filamentos

3.3. Formación y actividad metabólica del biofilm bajo condiciones de estrés

En la formación de biofilm también se encontró que las distintas cepas pertenecientes a ST213 respondían de manera diferencial (Fig. 2). Las cepas SAL016 y SAL196 mostraron una baja producción de biofilm (valores por debajo de 0.3 OD) en todas las condiciones evaluadas (LB, LB_{raw}, LB_{ac}, LB_{raw-ac}) tanto en RT como en refrigeración. Las cepas SAL109, SAL115 y SAL127 mostraron valores más altos de formación de biofilm en algunas condiciones (rango de valores de 0.2 a 1.6 OD). Así, la cepa SAL115 mostró una mayor producción de biofilm (~1.5 OD) que el resto de cepas cuando se incubó en LB a 4°C, LB_{raw} en RT y 4°C, así como en LB_{raw-ac} a 4°C. En el resto de condiciones evaluadas dicha cepa mostró la misma capacidad de formación de biofilm que las cepas SAL109 y SAL127. Interesantemente, en medios ácidos (LB_{ac} y LB_{raw-ac}) la formación de biofilm de SAL115 fue inferior que cuando se incubó en LB y LB_{raw}.

Posteriormente, se evaluó si el biofilm formado después de 8 días de incubación se mantenía viable. Para ello se empleó la actividad metabólica del biofilm como un marcador indirecto de su viabilidad (Fig. 3). De manera general se encontró que en la mayoría de condiciones evaluadas, el biofilm formado se mantenía metabólicamente activo. Sin embargo, en LB_{raw-ac} a 4°C la actividad fue muy baja para todas las cepas (~0.2 OD), incluso en aquellas que se había observado la formación de biofilm, por lo que esta condición resultó ser la más letal para todas las cepas. Interesantemente, se observó que la actividad metabólica del biofilm formado por SAL109 fue superior en LB a RT (1.38 OD) y LB_{ac} a 4°C (0.98 OD), en comparación con SAL115 (0.84 y 0.44 OD, respectivamente), no obstante que por cristal violeta se presentó un valor similar de formación de biofilm entre ambas cepas bajo estas condiciones. Por su parte, la cepa SAL115 mostró una clara diferencia en la actividad metabólica cuando se incubó en LB a 4°C (0.86 OD) y LB_{raw}, tanto en RT (1.71 OD) como en 4°C (0.87 OD), en comparación con el resto de cepas.

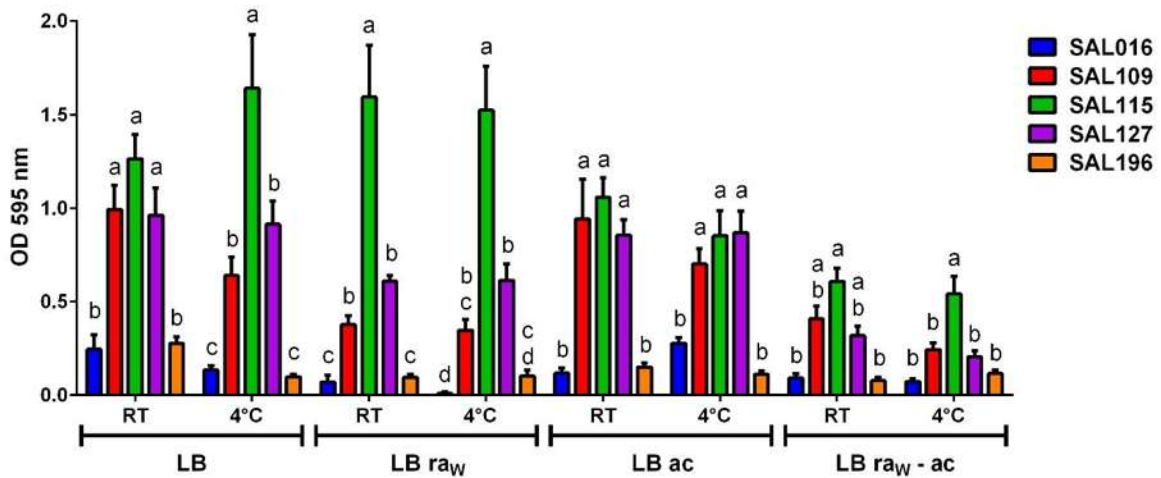


Figura 2. Formación de biofilm de las cepas ST213 de *Salmonella enterica* bajo condiciones de estrés. Las cepas se incubaron en medio LB, baja actividad de agua (LB_{ra_w}), pH 3.5 (LB_{ac}) y la combinación de baja actividad de agua y pH 3.5 (LB_{ra_w-ac}), a temperatura ambiente (RT) o refrigeración (4°C) por 8 días. Los datos se representan como la media ± D.E. Medias con diferentes letras dentro de cada condición evaluada son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$). ANOVA con comparación múltiple de Tukey.

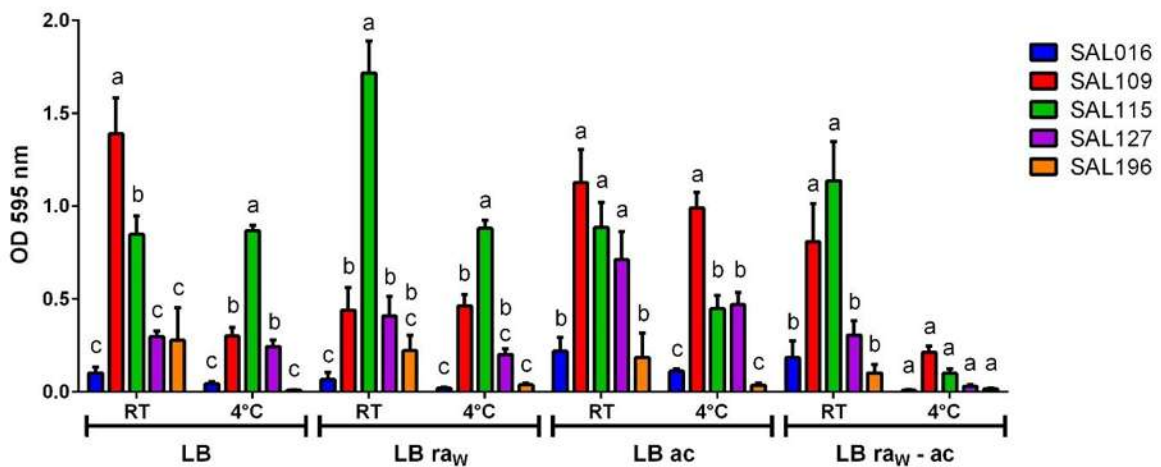


Figura 3. Actividad metabólica del biofilm formado por las cepas ST213 de *Salmonella enterica* bajo condiciones de estrés. Las cepas se incubaron en medio LB, baja actividad de agua (LB_{ra_w}), pH 3.5 (LB_{ac}) y la combinación de baja actividad de agua y pH 3.5 (LB_{ra_w-ac}), a temperatura ambiente (RT) o refrigeración (4°C) por 8 días. Los datos se representan como la media ± D.E. Medias con diferentes letras dentro de cada condición evaluada son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$). ANOVA con comparación múltiple de Tukey.

3.4. Motilidad de las cepas ST213 sin estrés

Al evaluar la motilidad de las cepas ST213 (Fig. 4), la cepa SAL115 presentó la mayor motilidad (40.5 mm), seguida por la cepa SAL109 (33.75 mm), lo que concuerda con el hecho de que estas cepas fueron las de mayor producción de biofilm. Las cepas SAL016 y SAL196 mostraron una menor motilidad (~25 mm) y la cepa SAL127 fue la de menor motilidad (15.5

mm), a pesar de que mostró una mayor formación de biofilm en comparación con SAL016 y SAL196.

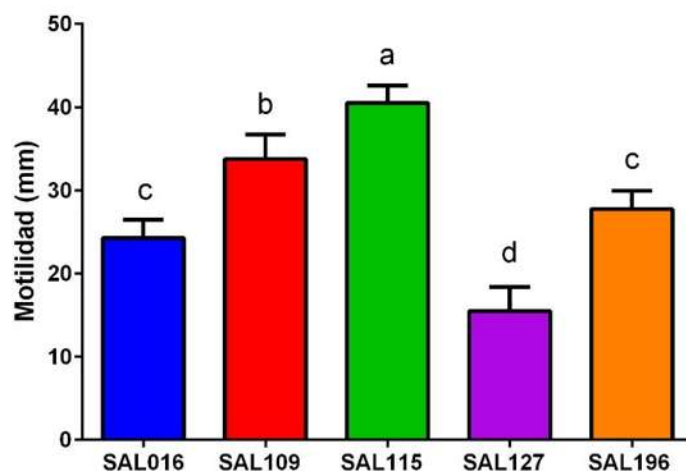


Figura 4. Motilidad de las cepas ST213 de *Salmonella enterica*. Se inocularon cultivos overnight por picadura en el centro de placas al 0.3% de agar LB. Los datos se representan como la media \pm D.E. Medias con diferentes letras son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$). ANOVA con múltiple comparación de Tukey.

3.5. Invasión de células Caco-2 por cepas ST213

Se evaluó la capacidad de las cepas ST213 de internalizar en células Caco-2 posterior al estrés por 8 días (Fig. 5). Primero se determinó si las cepas de estudio presentaban alguna diferencia en su capacidad de internalización provenientes de condiciones sin estrés. La cepa SAL109 presentó una mayor capacidad de internalizar (0.79 UFC/Caco-2) en comparación con el resto de cepas. Las cepas SAL115 y SAL196 mostraron valores similares de internalización (~ 0.5 CFU/Caco-2), mientras que las cepas SAL016 y SAL127 fueron las de menor internalización (~ 0.18 CFU/Caco-2). Al someter a las cepas a condiciones de estrés por 8 días previos al ensayo, la internalización de todas disminuyó significativamente. Las cepas SAL016 y SAL109 mostraron una mayor tendencia de internalización que el resto de cepas bajo las condiciones LBraw a 4°C, LBac a RT y en LBraw-ac a RT. En el resto de condiciones la tendencia observada fue una baja internalización, sin encontrar diferencia entre las cepas.

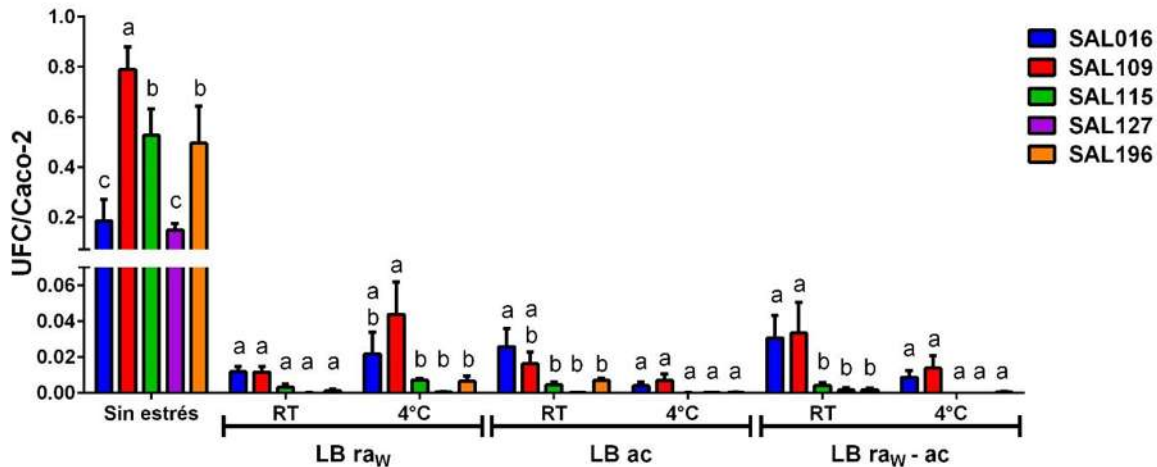


Figura 5. Internalización de las cepas ST213 de *Salmonella enterica* después de ser incubadas en condiciones de estrés. Las condiciones de estrés simularon baja actividad de agua (LBra_w), pH 3.5 (LBac) y la combinación de ambas (LBra_w-ac), incubadas a temperatura ambiente (RT) o refrigeración (4°C) por 8 días. Los datos se representan como la media ± D.E. Medias con diferentes letras dentro de cada condición evaluada son diferentes estadísticamente (p<0.05). ANOVA con comparación múltiple de Tukey.

3.6. Análisis de agrupamiento jerárquico

Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) con los datos de viabilidad, crecimiento *post* estrés, formación de biofilm, actividad metabólica de biofilm e internalización de las diferentes cepas ST213. Al utilizar los valores obtenidos bajo condiciones sin estrés (Fig. 6A) la similitud entre las cepas fue alta (>0.975). Las cepas SAL109, SAL115, SAL127 y SAL196 se agruparon con una similitud muy cercana entre ellas, mientras que solo la cepa SAL016 se agrupó en un clado distinto al resto de cepas. Cuando el agrupamiento se realizó con base en la temperatura de incubación bajo las diferentes condiciones de estrés (LBra_w, LBac y LBra_w-ac), al ser incubadas en temperatura ambiente, la cepa SAL016 mostró un comportamiento más cercano a las cepas SAL109, SAL115 y SAL196 (Fig. 6B) con una similitud entre ellas superior a 0.960, mientras que la cepa SAL127 se agrupó en un clado distinto. Empleando la temperatura de refrigeración (Fig. 6C) la diferencia entre las cepas se incrementó, siendo más cercanas entre si las cepas SAL109, SAL115 y SAL196, mientras que las cepas SAL016 y SAL127 se comportaron de manera distinta al resto de cepas.

Al agrupar por condición de estrés empleando los datos obtenidos por LBra_w (Fig. 6D), LBac (Fig. 6E) y LBra_w-ac (Fig. 6F), tanto en refrigeración como en temperatura

ambiente, las cepas SAL109, SAL115 y SAL196 continuaron agrupadas con valores de similitud altos. Dichas cepas mostraron un comportamiento distinto pero cercano a la cepa SAL016, mientras que la cepa SAL127 se agrupó en un clado diferente, siendo más evidente la diferencia en la condición LBac. Finalmente, al utilizar los datos bajo todas las condiciones de estrés y temperaturas de incubación (Fig. 6G), las cepas SAL109 y SAL196 se agruparon con una similitud de alrededor de 0.99, mostrando una similitud de alrededor de 0.975 con la cepa SAL115, seguidas por la cepa SAL016 con una similitud de alrededor de 0.95, y finalmente la cepa SAL127 fue la que presentó una mayor distancia con el resto de las cepas, con una similitud de alrededor de 0.91.

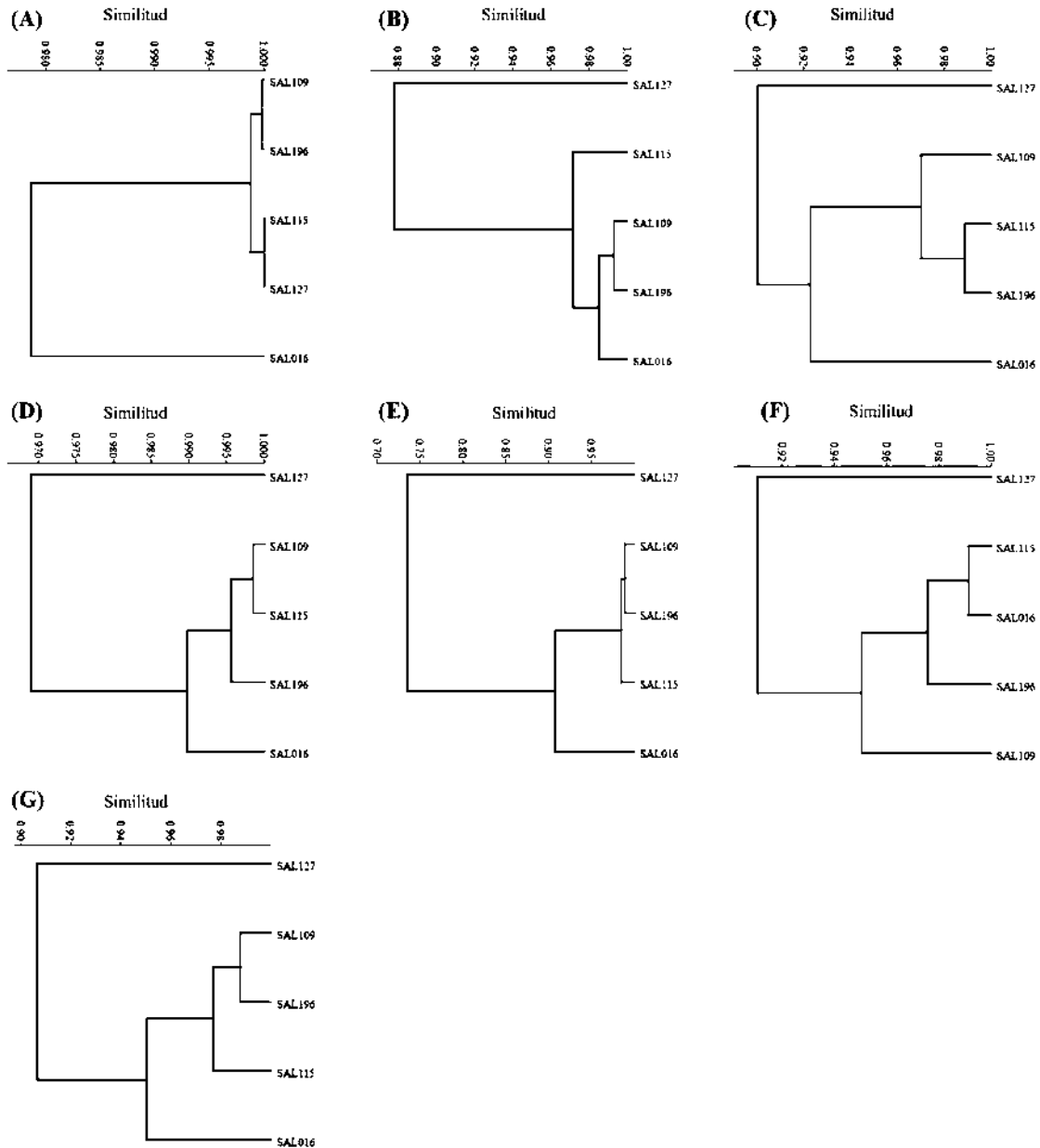


Figura 6. Análisis de agrupamiento de las cepas ST213 de *Salmonella enterica* con base en las características fenotípicas evaluadas. Se utilizaron las medias de viabilidad, AUC de crecimiento, formación y actividad metabólica de biofilm, e internalización. Incubación: sin estrés (A), temperatura ambiente en LBraw, LBac y LBraw-ac (B), 4°C en LBraw, LBac y LBraw-ac (C), LBraw a temperatura ambiente y 4°C (D), LBac a temperatura ambiente y 4°C (E), LBraw-ac a temperatura ambiente y 4°C (F), utilizando los datos bajo todas las condiciones evaluadas (G). El análisis se realizó con el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el algoritmo UPGMA.

4. Discusión

En este estudio se evaluó la variación intra-genotipo de cepas de *Salmonella enterica* Typhimurium ST213 en respuesta al estrés que simula las condiciones empleadas en la preservación de los alimentos, como osmolaridad alta, acidez y temperaturas de refrigeración (Humphrey et al., 2011). Previamente, nuestro grupo de trabajo evaluó esta respuesta entre cepas de los genotipos ST19 y ST213, encontrando diferencias significativas entre estas (Gómez-Baltazar et al., 2019, Capítulo I). No obstante, en dicho trabajo previo solo se estudió una cepa de cada genotipo, por lo que el interés aquí fue analizar un número mayor de cepas ST213.

En las cinco cepas ST213 aquí analizadas se observó variabilidad en los parámetros de viabilidad bajo condiciones de estrés, crecimiento *post* estrés, formación de biofilm, formación de filamentos, motilidad e invasión de células epiteliales. Existen diversos estudios que han demostrado la variabilidad fenotípica entre aislados que pertenecen al mismo serotipo de *S. enterica*, los cuales han asociado dicha diferencia con parámetros genéticos (Betancor et al., 2009; Lianou y Koutsoumanis, 2013; Zhou et al., 2013; Feasey et al., 2016). Sin embargo, hasta donde sabemos, son pocos los estudios donde se han comparado estas respuestas fenotípicas en cepas de *S. enterica* de genotipos emergentes, caracterizadas mediante el análisis por MLST, involucrados en procesos de reemplazo en determinados países o áreas geográficas.

La secuencia tipo emergente más estudiada es la ST313, la cual se ha relacionado con salmonelosis invasiva por *S. enterica* no tifoidea (iNTS) en el África subsahariana, identificándose inicialmente dos linajes estrechamente relacionados (Okoro et al., 2015). Estos linajes muestran distintas características metabólicas y patogénicas en comparación con cepas de *S. Typhimurium* que no pertenecen a los linajes ST313 (Carden et al., 2015; Okoro et al., 2015; Ramachandran et al., 2017, 2015). Si bien, el análisis mediante MLST, ha demostrado ser una herramienta valiosa para la identificación de agrupaciones genéticas y para proporcionar una visión rápida de la estructura poblacional de aislados de *S. enterica* en ciertas regiones geográficas (Achtman et al., 2012), en algunos casos no es posible detectar la variabilidad de cepas estrechamente relacionadas genéticamente (Leekitcharoenphon et al., 2012; Li et al., 2009). Por ejemplo, al comparar cepas de *S. Typhimurium* ST313

provenientes de África y Reino Unido se observó una diversidad entre ellos, si bien se observó la reducción del genoma que se conservaba en ambos linajes, el linaje africano lleva un repertorio característico de genes de profagos y resistencia a antibióticos, lo que sugiere una fuerte presión de selección, guiada en parte por la adquisición horizontal de elementos del genoma accesorio (Ashton et al., 2017). De igual manera, los aislados pertenecientes a ST313 detectados posteriormente en Brasil, presentan diferencias genéticas y fenotípicas significativas en comparación con los linajes africanos (Almeida et al., 2017; Panzenhagen et al., 2018). Aún más, el análisis de secuenciación genómica también ha mostrado linajes distintos del genotipo ST19 entre Brasil y otras partes del mundo, y dichas diferencias genómicas se asocian con diferencias fenotípicas, incluyendo la capacidad para invadir células HeLa *in vitro* (Almeida et al., 2017; Panzenhagen et al., 2018).

Así, es posible que variaciones genómicas relacionadas con genes de patogenicidad y virulencia, o de genes relacionados con la resistencia a estrés sean la causa subyacente en las características fenotípicas detectadas en las cepas del genotipo ST213 del presente trabajo. Se ha documentado que en *S. enterica*, la formación de linajes bacterianos puede involucrar mecanismos como el reordenamiento genético programado y la contracción o expansión de elementos repetitivos de ADN en regiones del genoma conocidas como *loci* de contingencia; mientras que en otros casos, la formación de linajes se produce por mecanismos epigenéticos, sin alteración de la secuencia de ADN (García-Pastor et al., 2018). También se ha sugerido que la variabilidad fenotípica entre cepas de *S. enterica* podría deberse a mutaciones puntuales o mayores en ciertos genes involucrados en respuestas a estrés, por ejemplo *rpoS*, lo que podría afectar la traducción de la proteína RpoS o la generación de una proteína inestable que genere una baja expresión de genes dependientes de RpoS (Jørgensen et al., 2000). Por ejemplo, se sabe que en un ambiente con osmolaridad alta, se induce la acumulación intracelular de moléculas osmoprotectoras, como la prolina, glicina, betaína, ectoína o trehalosa, las cuales son transportadas a la célula desde el entorno extracelular (Empadinhas y da Costa, 2008). Si no existen estas moléculas en el ambiente extracelular, *S. enterica* puede inducir la biosíntesis de trealosa, a través de las enzimas trealosa-6-fosfato fosfatasa y trealosa-6-fosfato sintasa codificadas por el operón *otsAB*, el cual está controlado por RpoS, que se sabe que también regula otros genes implicados en el estrés osmótico (Spector y Kenyon, 2012).

En presencia de un ambiente ácido, *S. enterica* es capaz de activar la respuesta de tolerancia ácida (ATR). Esta respuesta está regulada por varias proteínas, entre ellas RpoS. Algunas de las proteínas de choque-ácido (ASP) inducidas durante ATR son dependientes de RpoS, las cuales participan en la regulación celular, metabolismo energético, transcripción, traducción, síntesis de fimbrias, regulación de las envolturas celulares, colonización y virulencia (Alvarez-Ordóñez et al., 2015). En cuanto a la temperatura de refrigeración, esta puede influir directamente sobre la tasa de crecimiento, la actividad enzimática, la composición celular y los requerimientos nutricionales (Beales, 2004). Además, se ha observado que puede tener un efecto protector cruzado con el estrés por ácido, activando genes asociados con la homeostasis del pH, estrés oxidativo y reparación de ADN, de manera dependiente de RpoS (McMeechan et al., 2007; Shah et al., 2013; Xu et al., 2008). La supervivencia y adaptación de *S. enterica* a estas condiciones, requiere de grandes cantidades de energía que le permitan mantener su fisiología celular para sobrevivir y crecer cuando las condiciones sean óptimas (Beales, 2004). Por todo lo anterior, el análisis de genomas completos de las cepas ST213 es necesario para evaluar si algunos de los procesos de cambio genómico descritos tienen relación con la variabilidad fenotípica de éstas.

No solo las variantes genómicas dentro de un mismo genotipo pueden explicar la variación fenotípica aquí descrita entre cepas del genotipo ST213. Las cepas ST213 analizadas en este estudio provienen de diferentes tipos de alimentos y de distintas zonas geográficas del estado de Michoacán, México, con variaciones climáticas significativas. Algunos datos sugieren que ciertos aditivos o condiciones de procesamiento en la industria alimentaria pueden provocar cambios fenotípicos, provocando la adaptación e incrementando la supervivencia de *S. enterica* en condiciones adversas (Martins et al., 2013). Por otra parte, se ha documentado que las condiciones ambientales de crecimiento son una fuente importante de variabilidad fenotípica entre diferentes aislados de *S. enterica* (Lianou y Koutsoumanis, 2013, 2012, 2011). La variabilidad fenotípica se ha observado incluso en poblaciones clonales de células microbianas, donde las fluctuaciones en los componentes celulares que determinan los estados celulares pueden causar dos subpoblaciones distintas, una propiedad llamada biestabilidad (Veening et al., 2008). La biestabilidad permite que las poblaciones de bacterias clonales se dividan en subpoblaciones con rasgos fenotípicos

distintos, y esto puede facilitar la adaptación a entornos variables e impredecibles (Ackermann, 2013; Lambert y Kussell, 2014; Veening et al., 2008).

A pesar de las medidas establecidas para prevenir la salmonelosis, la incidencia y la gravedad de esta enfermedad han aumentado significativamente. Aunque el desarrollo de tecnologías de detección y clasificación de este organismo (Lee et al., 2015) contribuyen de manera importante en el establecimiento de medidas de control, la aparición de genotipos emergentes y los cambios en incidencia y distribución de genotipos impiden que la salmonelosis enteropatógena e invasiva sean controladas de manera eficiente. Para entender mejor estos procesos de recambio y modificación de incidencias es necesario el análisis integrado de la capacidad patogénica experimental con la combinación de herramientas ómicas que contribuyan a conocer mejor los procesos microevolutivos de *S. enterica*. Este tipo de aproximación es importante para seguir evaluando la diversificación fisiológica y genómica de las cepas de genotipo ST213 en México y las aisladas en otras regiones del mundo. Esto permitirá seguir conociendo el riesgo para la salud pública nacional y global de un patógeno con posible centro de origen en nuestro país.

Referencias

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S., 2012. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* 8, e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Ackermann, M., 2013. Microbial individuality in the natural environment. *ISME J.* 7, 465–467. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.131>
- Almeida, F., Seribelli, A.A., da Silva, P., Medeiros, M.I.C., Dos Prazeres Rodrigues, D., Moreira, C.G., Allard, M.W., Falcão, J.P., 2017. Multilocus sequence typing of *Salmonella Typhimurium* reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 51, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.009>
- Alva-Murillo, N., Medina-Estrada, I., Báez-Magaña, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J.E., 2015. The activation of the TLR2/p38 pathway by sodium butyrate in bovine mammary epithelial cells is involved in the reduction of *Staphylococcus aureus* internalization. *Mol. Immunol.* 68, 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.025>
- Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., Prieto, M., 2015. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 99–109.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004>

- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R., Bernardo, A., 2008. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.015>
- Ao, T.T., Feasey, N.A., Gordon, M.A., Keddy, K.H., Angulo, F.J., Crump, J.A., 2015. Global Burden of Invasive Nontyphoidal *Salmonella* Disease, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 941–949. <https://doi.org/10.3201/eid2106.140999>
- Arya, G., Holtslander, R., Robertson, J., Yoshida, C., Harris, J., Parmley, J., Nichani, A., Johnson, R., Poppe, C., 2017. Epidemiology, Pathogenesis, Genoserotyping, Antimicrobial Resistance, and Prevention and Control of Non-Typhoidal *Salmonella* Serovars. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* 4, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0057-7>
- Ashton, P.M., Owen, S. V., Kaindama, L., Rowe, W.P.M., Lane, C.R., Larkin, L., Nair, S., Jenkins, C., de Pinna, E.M., Feasey, N.A., Hinton, J.C.D., Dallman, T.J., 2017. Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella Typhimurium* epidemic in Africa. *Genome Med.* 9, 92. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0480-7>
- Beales, N., 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3, 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>
- Betancor, L., Yim, L., Fookes, M., Martinez, A., Thomson, N. R., Ivens, A., Peters, S., Bryant, C., Algorta, G., et al., 2009. Genomic and phenotypic variation in epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates. *BMC Microbiology*, 9(1): 237. doi:10.1186/1471-2180-9-237
- Burton, E., Yakandawala, N., LoVetri, K., Madhyastha, M.S., 2006. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0086-3>
- Calva, E., Silva, C., Zaidi, M.B., Sanchez-Flores, A., Estrada, K., Silva, G.G.Z., Soto-Jiménez, L.M., Wiesner, M., Fernández-Mora, M., Edwards, R.A., Vinuesa, P., 2015. Complete Genome Sequencing of a Multidrug-Resistant and Human-Invasive *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain of the Emerging Sequence Type 213 Genotype. *Genome Announc.* 3, e00663-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00663-15>
- Carden, S., Okoro, C., Dougan, G., Monack, D., 2015. Non-typhoidal *Salmonella Typhimurium* ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis. *Pathog. Dis.* 73, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu023>
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., García-Gimeno, R.M., 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Res. Int.* 45, 545–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>
- Empadinhas, N., da Costa, M.S., 2008. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes:

- distribution of compatible solutes. *Int. Microbiol.* 11, 151–61.
<https://doi.org/10.2436/20.1501.01.55>
- Feasey, N. A., Hadfield, J., Keddy, K. H., Dallman, T. J., Jacobs, J., Deng, X., Wigley, P., Barquist, L., Langridge, G. C., Feltwell, T., Harris, S. R., et al., 2016. Distinct *Salmonella* Enteritidis lineages associated with enterocolitis in high-income settings and invasive disease in low-income settings. *Nature Genetics.* 48(10): 1211-1217.
[doi:10.1038/ng.3644](https://doi.org/10.1038/ng.3644).
- García-Pastor, L., Puerta-Fernández, E., Casadesús, J., 2018. Bistability and phase variation in *Salmonella enterica*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 0–1.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.01.003>
- Gómez-Baltazar, A., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Larsen, J., Kuk-Soberanis, M. E., Vázquez-Marrufo, G., 2019. Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Food Microbiology.* 82: 303-315.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.010>
- Humphrey, S., Clark, L.F., Humphrey, T.J., Jepson, M. a., 2011. Enhanced recovery of *Salmonella* Typhimurium DT104 from exposure to stress at low temperature. *Microbiology* 157, 1103–1114. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045666-0>
- Jørgensen, F., Leach, S., Wilde, S.J., Davies, A., Stewart, G.S.A.B., Humphrey, T., 2000. Invasiveness in chickens, stress resistance and RpoS status of wild-type *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium definitive type 104 and serovar enteritidis phage type 4 strains. *Microbiology* 146 Pt 12, 3227–35.
<https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3227>
- Justice, S.S., Hunstad, D. a, Cegelski, L., Hultgren, S.J., 2008. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 162–168.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1820>
- Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Thomson, N.R., Kariuki, S., Holt, K.E., Gordon, M.A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M.E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C.A., Heyderman, R.S., Dougan, G., 2009. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Res.* 19, 2279–2287.
<https://doi.org/10.1101/gr.091017.109>
- Lambert, G., Kussell, E., 2014. Memory and Fitness Optimization of Bacteria under Fluctuating Environments. *PLoS Genet.* 10, e1004556.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004556>
- Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T.J., Phillips, R., Hsieh, J., 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control* 47, 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>
- Leekitcharoenphon, P., Lukjancenko, O., Friis, C., Aarestrup, F.M., Ussery, D.W., 2012. Genomic variation in *Salmonella enterica* core genes for epidemiological typing. *BMC Genomics* 13, 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-88>
- Li, W., Raoult, D., Fournier, P.-E., 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS*

- Microbiol. Rev. 33, 892–916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2013. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.016>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.002>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2011. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiol.* 28, 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.006>
- Martins, M., McCusker, M.P., McCabe, E.M., O’Leary, D., Duffy, G., Fanning, S., 2013. Evidence of Metabolic Switching and Implications for Food Safety from the Phenome(s) of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Cultured at Selected Points across the Pork Production Food Chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5437–5449. <https://doi.org/10.1128/AEM.01041-13>
- McMeechan, A., Roberts, M., Cogan, T.A., Jorgensen, F., Stevenson, A., Lewis, C., Rowley, G., Humphrey, T.J., 2007. Role of the alternative sigma factors E and S in survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during starvation, refrigeration and osmotic shock. *Microbiology* 153, 263–269. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29235-0>
- Okoro, C.K., Barquist, L., Connor, T.R., Harris, S.R., Clare, S., Stevens, M.P., Arends, M.J., Hale, C., Kane, L., Pickard, D.J., Hill, J., Harcourt, K., Parkhill, J., Dougan, G., Kingsley, R. a., 2015. Signatures of Adaptation in Human Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 Populations from Sub-Saharan Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003611. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003611>
- Panzenhagen, P.H.N., Paul, N.C., Conte, C.A., Costa, R.G., Rodrigues, D.P., Shah, D.H., 2018. Genetically distinct lineages of *Salmonella* Typhimurium ST313 and ST19 are present in Brazil. *Int. J. Med. Microbiol.* 308, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.01.005>
- Ramachandran, G., Aheto, K., Shirtliff, M.E., Tennant, S.M., 2016. Poor biofilm-forming ability and long-term survival of invasive *Salmonella* Typhimurium ST313. *Pathog. Dis.* 74, 1–35. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw049>
- Ramachandran, G., Panda, A., Higginson, E.E., Ateh, E., Lipsky, M.M., Sen, S., Matson, C.A., Permala-Booth, J., DeTolla, L.J., Tennant, S.M., 2017. Virulence of invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 in animal models of infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005697. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005697>
- Ramachandran, G., Perkins, D.J., Schmidlein, P.J., Tulapurkar, M.E., Tennant, S.M., 2015. Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 with naturally attenuated flagellin elicits reduced inflammation and replicates within macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e3394. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003394>
- Shah, J., Desai, P.T., Chen, D., Stevens, J.R., Weimer, B.C., 2013. Preadaptation to Cold Stress in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Increases Survival during

- Subsequent Acid Stress Exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7281–7289.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02621-13>
- Shi, C., Singh, P., Ranieri, M.L., Wiedmann, M., Moreno Switt, A.I., 2013. Molecular methods for serovar determination of Salmonella. *Crit. Rev. Microbiol.* 7828, 309–325. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.837862>
- Silva, C., Calva, E., Calva, J.J., Wiesner, M., Vinuesa, P., Fernández-Mora, M., Puente, J.L., Vinuesa, P., 2015. Complete Genome Sequence of a Human-Invasive Salmonella enterica Serovar Typhimurium Strain of the Emerging Sequence Type 213 Harboring a Multidrug Resistance IncA / C Plasmid and a bla CMY-2 -. *Genome Announc.* 3, 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01323-15>. Copyright
- Singletary, L.A., Karlinsey, J.E., Libby, S.J., Mooney, J.P., Lokken, K.L., Tsohis, R.M., Byndloss, M.X., Hirao, L.A., Gaulke, C.A., Crawford, R.W., Dandekar, S., Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Heyderman, R.S., Fang, F.C., 2016. Loss of Multicellular Behavior in Epidemic African Nontyphoidal Salmonella enterica Serovar Typhimurium ST313 Strain D23580. *MBio* 7, e02265.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02265-15>
- Spector, M.P., Kenyon, W.J., 2012. Resistance and survival strategies of Salmonella enterica to environmental stresses. *Food Res. Int.* 45, 455–481.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C., 2014. The Molecular Epidemiological Characteristics and Genetic Diversity of Salmonella Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS One* 9, e113145.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>
- Trafny, E.A., Lewandowski, R., Zawistowska-Marciniak, I., Stepińska, M., 2013. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1635–1643.
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1326-0>
- Veening, J.-W., Smits, W.K., Kuipers, O.P., 2008. Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 193–210.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163002>
- Wiesner, M., Calva, E., Fernández-Mora, M., Cevallos, M. a, Campos, F., Zaidi, M.B., Silva, C., 2011. Salmonella Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiol.* 11, 9.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-9>
- Wiesner, M., Calva, J.J., Bustamante, V.H., Pérez-Morales, D., Fernández-Mora, M., Calva, E., Silva, C., 2016. A multi-drug resistant Salmonella Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the bla CMY-2 gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC Microbiol.* 16, 18.
<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0633-7>
- Wiesner, M., Zaidi, M.B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J.J., Silva, C., 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican Salmonella enterica serovar

Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* 9, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>

- Xu, H., Lee, H.Y., Ahn, J., 2008. Cross-protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 290–297. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02429.x>
- Yang, J., Barrila, J., Roland, K.L., Kilbourne, J., Ott, C.M., Forsyth, R.J., Nickerson, C. a., 2015. Characterization of the Invasive, Multidrug Resistant Non-typhoidal *Salmonella* Strain D23580 in a Murine Model of Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003839. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003839>
- Zhou, Z., McCann, A., Litrup, E., Murphy, R., Cormican, M., Fanning, S., Brown, D., Guttman, D. S., Brisse, S., Achtman, M., 2013. Neutral genomic microevolution of a recently emerged pathogen, *Salmonella enterica* serovar Agona. *PLoS Genetics.* 9(4): e1003471. doi:10.1371/journal.pgen.1003471

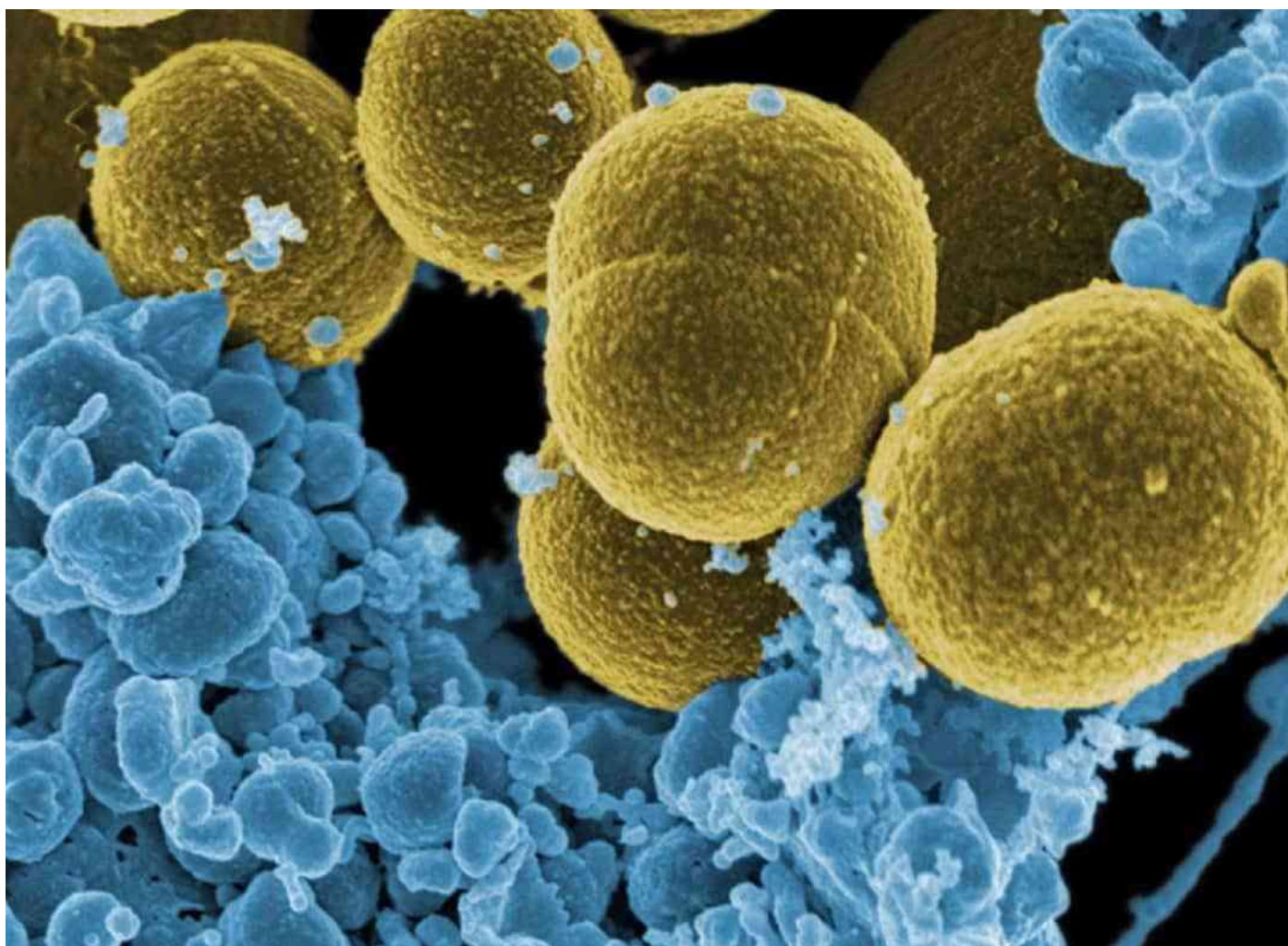
CAPÍTULO V

El Biofilm, una comunidad gobernada por bacterias

ARTÍCULO

El Biofilm, una comunidad gobernada por bacterias

Adrián Gómez Baltazar y Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas



Adrián Gómez Baltazar es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas.

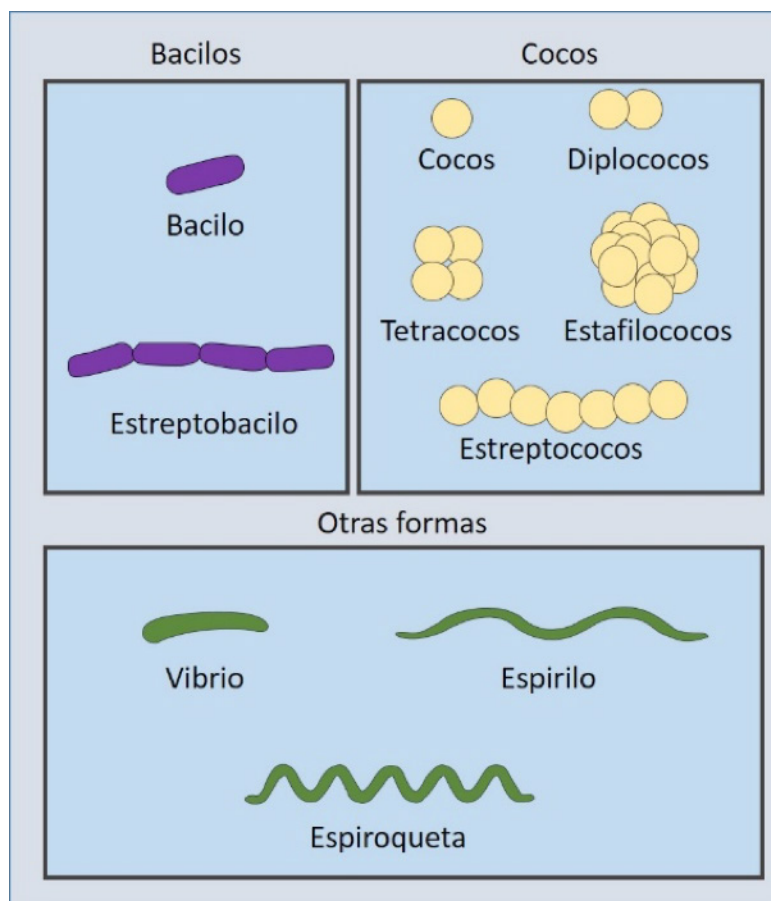
Dra. Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas es profesora investigadora, ambos de la Facultad de Medicina y Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
marisolvaz@yahoo.com

¿Alguna vez has escuchado hablar de las bacterias? y ¿Cómo te las imaginas?

Las bacterias son individuos formados por una sola célula, es decir unicelulares, y poseen diversas formas que van desde casi esferas perfectas hasta filamentos alargados. El tamaño de una célula bacteriana es al menos 10 veces menor a las células de un ser humano (~10-100 μm), por eso solo se pueden observar utilizando un microscopio (*Saber Más 21:10-16*).

Las bacterias son pequeñas, viajeras y sociables

Las bacterias han colonizado prácticamente todos los ecosistemas de nuestro planeta, incluso aquellos donde las condiciones son tan extremas que es difícil o imposible encontrar otras formas de vida ¿Cómo han llegado las bacterias a colonizar los



Principales formas de células bacterianas

ecosistemas? Por su tamaño tan pequeño, las bacterias pueden ser transportadas fácilmente a grandes distancias por el viento y las corrientes de agua.

Como hábiles viajeras, también son transportadas por aves, insectos y mamíferos, incluido el ser humano. Una vez que llegan a un sitio adecuado para colonizar, interactúan con el suelo o cualquier estructura no viva del nuevo ambiente, pero también con la superficie de distintos tejidos u órganos de especies de otros grupos biológicos como las que las transportaron al nuevo sitio.

Pero, lo que quizás más te sorprenda, es que el cuerpo humano alberga más bacterias que el número de las células que conforman nuestros órganos y tejidos. Durante el proceso de viaje y establecimiento en un nuevo ecosistema, las bacterias modifican su comportamiento, pasando de un estado de individualidad a la interacción y convivencia cercana con otros microorganismos de su misma especie, o aun de especies distintas. A las bacterias que se encuentran como células "solitarias", con una interacción física limitada con otras células, se les denomina células "planctónicas".

¡Cuando las células bacterianas se encuentran interactuando íntimamente con otras bacterias en forma de agregados multicelulares, se les denomina biofilms o biopelículas!

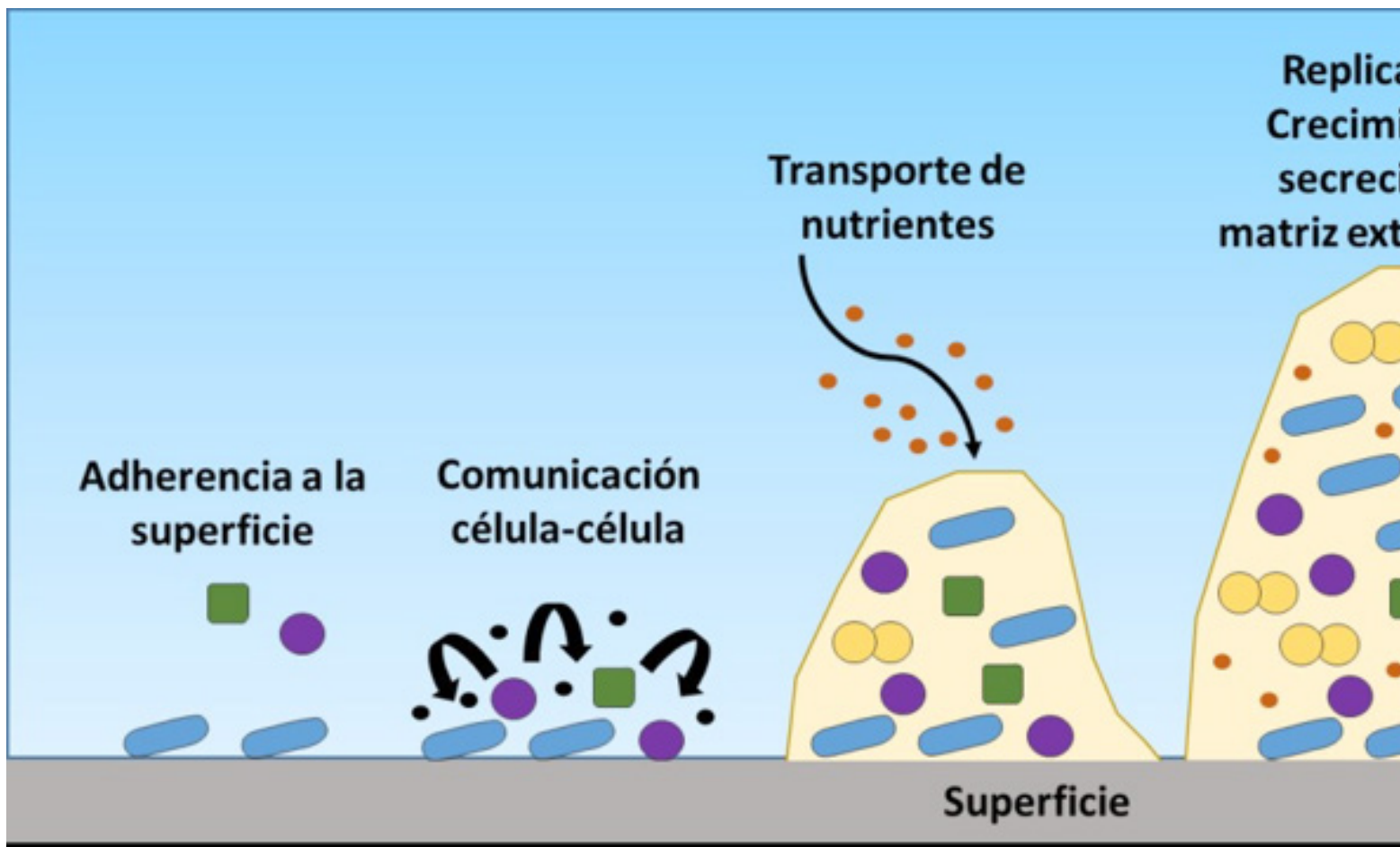
¿Qué es un biofilm?

Un biofilm –o una biopelícula- es una comunidad organizada de células bacterianas englobadas en una matriz que se adhiere a superficies inertes o vivas. Se han encontrado biofilms en materiales como plástico, cemento, acero y vidrio. En el caso de superficies vivas, los biofilms se forman en las hojas o la raíz de plantas, así como en la piel de nuestro cuerpo.

Esta estructura compleja está formada por un 97% de agua, un 15% de biomasa microbiana y un 85% de distintas moléculas orgánicas producidas por las propias bacterias, conocidas como "sustancias poliméricas extracelulares", que forman la matriz extracelular.

¿Cómo se forma un biofilm bacteriano?

La formación de un biofilm inicia cuando las bacterias en estado planctónico se acercan tanto a una superficie, que su capacidad para moverse disminuye. La bacteria se asocia transitoriamente con la superficie inerte o viva, o con otros microorganismos previamente unidos a éstas, buscando el lugar adecuado para establecerse. Una vez que la bacteria forma una asociación estable como miembro de una micro-colonia, comienza a comunicarse con las otras bacterias presentes en ella, proceso conocido como *quorum sensing*. Este concepto técnico indica que cada miembro de la comunidad bacteriana que conforma el biofilm percibe al resto de miembros e intercambia mensajes y respuestas bioquímicas con éstos.



Proceso de formación del biofilm

Se presentan entonces tres procesos: el transporte de nutrientes hacia el interior del biofilm por canales de agua formados entre las células, el metabolismo de esos nutrientes por parte de las bacterias y el transporte de desechos hacia el exterior del biofilm. Estos procesos van acompañados del aumento de tamaño celular, de la división para formar nuevos individuos y de la producción de moléculas orgánicas complejas y extracelulares, haciendo del biofilm una estructura tridimensional.

Ocasionalmente algunas bacterias asociadas al biofilm se desprenden, comportándose nuevamente como células planctónicas que se desplazan a otros microambientes en donde comenzarán el proceso de formación de otro biofilm.

Las bacterias en grupo son más fuertes

La formación del biofilm es una estrategia de supervivencia para las bacterias, ya que las protege contra condiciones adversas, como los cambios de pH, altas concentraciones de sales o la radiación ultravioleta, y evitando el efecto de antibióticos y agentes antimicrobianos utilizados por el ser humano para su eliminación.

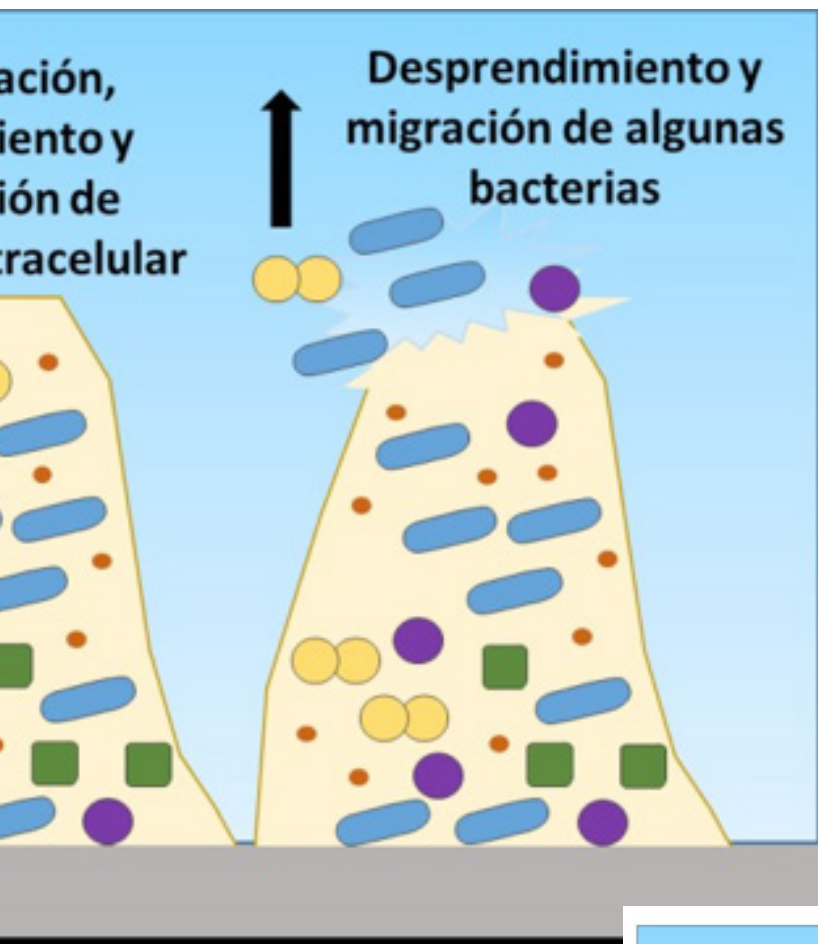
El biofilm ayuda a tener una mayor disponibilidad de nutrientes, ya que permite establecer una cooperación denominada sintrofismo, un caso de simbiosis mutualista entre dos bacterias metabólicamente distintas, que dependen una de otra para utilizar ciertas moléculas orgánicas para cubrir sus requerimientos energéticos, algo que no pueden hacer por separado.

Un fenómeno interesante es que el biofilm favorece la transferencia de genes entre las bacterias, aun de distinta especie, algo relevante para la evolución y generación de diversidad genética de las comunidades microbianas.

El biofilm, un foco de infección en la producción de alimentos

Algunas bacterias patógenas que nos infectan al consumir alimentos contaminados, forman un biofilm para permanecer en las superficies de los equipos y materiales utilizados en la producción de alimentos. Si no se limpian y desinfectan adecuadamente estos instrumentos, las bacterias pasan a la comida que se está elaborando. Los brotes infecciosos en todo el mundo de enfermedades diarreicas provocadas por las bacterias patógenas como *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, se han relacionado con la formación de biofilms. Estos microorganismos forman un biofilm difícil de erradicar, que permite la entrada al cuerpo de otras bacterias patógenas menos habituadas a formarlo.

La contaminación bacteriana es un problema grave para el sistema de almacenamiento y distribución de agua potable, ya que la formación del biofilm en las superficies de las tuberías y los recipientes de distribución al consumidor, representa una de las principales causas de contaminación del vital líquido. Entre los factores que influyen en la formación del biofilm en la red de distribución de agua, están el material de la tubería, la temperatura, el desinfectante utilizado para potabilizar el



agua, así como la resistencia de las bacterias a los desinfectantes. El uso de ciertos desinfectantes promueve la formación de sustancias fácilmente biodegradables que son utilizadas como alimento por los microorganismos, incrementando la formación de biofilms en el sistema de distribución.

Pero ¿El biofilm afecta la salud humana?

Al parecer sí, ya que algunas enfermedades han sido asociadas con la formación de biofilms, como las infecciones relacionadas con implantes médicos (catéteres, válvulas cardíacas, lentes de contacto), otitis media, infecciones urinarias crónicas, caries dental e infecciones nosocomiales, entre muchas otras. El problema con los biofilms asociados a enfermedades crónicas de este tipo, es la resistencia que adquieren las bacterias contra moléculas propias del sistema inmune del paciente y hacia las terapias antimicrobianas suministradas por los profesionales de la salud, complicando la defensa del cuerpo y el tratamiento médico.

SaberMás

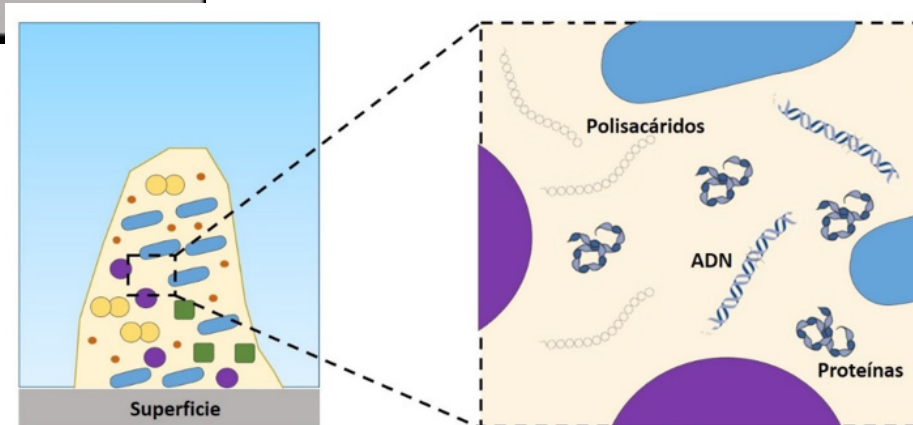
Lasa, I., del Pozo, J.L., Penadés J.R. y Leiva J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales Sis San Navarra*, 28(2):163-175. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es.

Principales estrategias para controlar o eliminar un biofilm

La resistencia de las bacterias presentes en el biofilm hacia agentes antimicrobianos constituye una amenaza para la industria alimentaria y la salud pública. El estudio de los biofilms bacterianos tiene como propósito entender el mecanismo de formación y la consecuente resistencia antimicrobiana, lo que ayudaría a desarrollar estrategias de control efectivas para prevenir su formación y lograr su eliminación.

Las principales estrategias para prevenir la formación de un biofilm son:

1. Limpiar y desinfectar regularmente las superficies antes de que las bacterias se adhieran a ellas, con productos químicos utilizados en la limpieza.
2. Uso de altas temperaturas, con las que sí puede eliminarse y controlarse la formación del biofilm.
3. Uso de biomoléculas como detergentes basados en la acción de enzimas.



Componentes principales de la matriz extracelular del biofilm: proteínas, ADN y polisacáridos.

4. Uso de virus que son capaces de infectar bacterias (fagos) y la bio-regulación. Esto último se refiere al uso de microorganismos no patógenos que compitan por los nutrientes con las bacterias patógenas, inhibiendo el establecimiento del biofilm.

Aún queda mucho por estudiar, y es necesario **Saber más** sobre el impacto de los productos antimicrobianos en la prevención y eliminación de los biofilms bacterianos. El descubrimiento de nuevas estrategias para el control de la formación de biofilms, sigue siendo necesario en la industria alimentaria y en el sector salud.

Loera-Muro, A., Ramírez-Castillo, F.Y., Avelar-González, F.J. y Guerrero-Barrera, A.L. (2012). *Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir*. *Investigación y Ciencia*, 20(54):49-56. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67424408007>

6. DISCUSIÓN GENERAL

A nivel mundial, los datos epidemiológicos de *S. enterica* muestran un patógeno dinámico, con cambios continuos regionales en la prevalencia de serotipos (Galanis et al., 2006; Herikstad et al., 2002; Olsen et al., 2001). Los hallazgos recientes han documentado la dinámica del patógeno a un nivel más sutil al describir el reemplazo de genotipos determinados por secuencias tipo (ST) dentro de diferentes países/áreas geográficas. Por ejemplo, el genotipo ST313 en África (Okoro et al., 2012), ST34 en China (Sun et al., 2014), y ST213 en México (Wiesner et al., 2009).

A pesar de la creciente evidencia sobre el reemplazo mundial de serotipos/genotipos en diferentes países o áreas geográficas, no se ha evaluado en detalle las diferencias genéticas, bioquímicas y fisiológicas subyacentes entre las cepas involucradas en dichas dinámicas, principalmente con el genotipo ST213. Esta falta de conocimiento dificulta la optimización de las estrategias para el control de la contaminación de los alimentos y los programas de vigilancia de la salud pública, ya que la exposición al estrés ambiental y las condiciones adversas para el crecimiento del patógeno generadas por las defensas del hospedero proporcionan ventajas selectivas para la supervivencia de cepas resistentes. Por lo que en este trabajo se evaluó la hipótesis de que la sustitución del genotipo ST19 por el ST213 como el genotipo predominante en aislados de alimentos contaminados en México, y su reciente propagación a otras regiones del mundo, podría explicarse en parte por su resistencia superior al estrés y una mayor virulencia.

Se observó una gran variabilidad en la supervivencia entre las cepas ST19 y ST213 estudiadas en condiciones de estrés que simulan las condiciones empleadas en la preservación de los alimentos, como osmolaridad alta, acidez y temperatura de refrigeración. Además, se observó una mayor capacidad de filamentación, formación de biofilm, motilidad y modificación de la membrana celular en condiciones de estrés del genotipo ST213. La variabilidad entre las cepas de *S. enterica* se ha atribuido a adaptaciones fisiológicas y metabólicas diferenciales en respuesta a condiciones ambientales desfavorables (Xu et al., 2008). Algunos datos sugieren que ciertos aditivos o condiciones de procesamiento en la industria alimentaria pueden provocar un cambio fenotípico, hacia una mejor adaptación y una mayor supervivencia de *S. enterica* (Martins et al., 2013). Además, las condiciones

ambientales de crecimiento podrían ser una fuente importante de variabilidad fenotípica entre diferentes aislados de *S. enterica* (Lianou y Koutsoumanis, 2013, 2012, 2011). Esta variabilidad fenotípica se ha observado incluso en poblaciones clonales de células microbianas, en las que las fluctuaciones en los componentes que determinan ciertos estados celulares pueden causar dos subpoblaciones distintas, una propiedad llamada biestabilidad (Veening et al., 2008). La biestabilidad permite que las poblaciones de bacterias clonales se dividan en subpoblaciones con rasgos fenotípicos distintos, y esto puede facilitar la adaptación a entornos variables e impredecibles (Ackermann, 2013; Lambert y Kussell, 2014; Veening et al., 2008). A la fecha no se han realizado estudios sobre el fenómeno de biestabilidad en genotipos de *S. enterica* emergentes o involucrados en procesos de reemplazo en prevalencia en distintas regiones geográficas. Dicho análisis podría demostrar una alta capacidad de los genotipos para subdividir sus poblaciones, superando así condiciones adversas del entorno afuera y dentro del hospedero. Una hipótesis que todavía no ha sido evaluada.

Además de su relevancia en la tolerancia al estrés, diversas líneas de evidencia relacionan la formación de biofilm con la virulencia en *S. enterica*. Por ejemplo, se ha observado una sobreexpresión de los genes *stn* (enterotoxina) e *invA* en bacterias formando biofilm en comparación con células planctónicas (Xu et al., 2010). Por lo que se comparó la capacidad de crecer y formar biofilm de los genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica* bajo diferentes sustratos y condiciones de estrés. Se observó una respuesta diferencial entre los genotipos ST19 y ST213, siendo mayor la capacidad de ST213 de crecer y formar biofilm bajo más sustratos. Adicionalmente, se observó que las cepas de *S. enterica* previamente estresadas tienen mayor crecimiento en comparación con cepas sin estrés. Son pocos los estudios donde se ha evaluado la capacidad de cepas ambientales de *S. enterica* para crecer y formar biofilm en sustratos únicos empleando la tecnología de microarreglos fenotípicos de Biolog (Kalai-Chelvam et al., 2015; Martins et al., 2013). Sin embargo, se sabe que las condiciones de cultivo tienen un fuerte impacto en el crecimiento y la formación de biofilm (Lamas et al., 2016; Lianou y Koutsoumanis, 2012; Wang et al., 2013; Xu et al., 2010). Por otra parte, existen señales ambientales que pueden activar la formación de biofilm, como la osmolaridad, pH, temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Lamas et al., 2018; Steenackers et al., 2012; Xu et al., 2010). Además se ha reportado que existe variabilidad en

la formación de biofilm de cepas de *S. enterica* provenientes de diversas fuentes (Martins et al., 2013; Solomon et al., 2005), así como en cepas de *S. enterica* de diferentes serotipos bajo diferentes condiciones de estrés ácido, osmótico y de temperatura (Lianou y Koutsoumanis, 2012).

Interesantemente, se encontró que en presencia de ciertos antibióticos se potenciaba la formación de biofilm de cepas del genotipo ST213. En este sentido, se sabe que los antimicrobianos a concentraciones subinhibitorias pueden provocar cambios en la fisiología y el comportamiento de las bacterias que inducen un aumento en la producción de biofilm. Las hipótesis más frecuentes sobre cómo los antibióticos estimulan la formación de biofilm hacen referencia a que las células muertas y sus productos pueden promover la formación de biofilm, o pueden inducir respuestas de estrés u otros cambios fisiológicos por daño subletal, lo que lleva a una mayor formación de biofilm de una manera dosis-dependiente (Ranieri et al., 2018). Por esto, es necesario realizar estudios con los sustratos en los que se observó mayor crecimiento y formación de biofilm, para elucidar de qué manera están modificando las respuestas celulares de las cepas de estudio, y que implicaciones tiene para el sector salud y alimentario.

La capacidad para sobrevivir y responder eficientemente a condiciones de estrés también se ha correlacionado con la virulencia en *S. enterica*. Por lo que se evaluó la interacción patógeno-hospedero de las cepas ST213 en un modelo experimental *in vitro* e *in vivo*. En los ensayos *in vitro* se observó mayor internalización por parte de las cepas del genotipo ST213, así como una mayor secreción de citocinas proinflamatorias por las células Caco-2, con relación al genotipo ST19. Como se mencionó anteriormente, las cepas evaluadas en este estudio fueron aisladas de diferentes tipos de alimentos y diferentes regiones geográficas con distintas condiciones climáticas; lo que sugiere que cada una de las cepas han estado sujetas a diferentes tipos de estrés. Se sabe que las condiciones antimicrobianas generadas por ambientes fuera y dentro de un hospedero podrían favorecer el reordenamiento del genoma actuando como una presión selectiva que guía la evolución de la virulencia de microorganismos patógenos (Arnold et al., 2007). Por ejemplo, el análisis filogenético de cepas pertenecientes al genotipo ST313 de Reino Unido y África ha revelado diversidad que se manifiesta en la formación de linajes distintos en cada país. La disminución del genoma se conserva en ambos linajes, pero el linaje africano lleva un repertorio

característico de genes de profagos y resistencia a antibióticos, lo que sugiere una fuerte presión de selección guiada en parte por la adquisición horizontal de elementos del genoma accesorio (Ashton et al., 2017).

En el modelo *in vivo*, todas las cepas establecieron una infección, ya que se observó la presencia del patógeno en las heces y en los tejidos de los animales *post* infección. La cepa SAL115 (ST213) fue la más exitosa para infectar, ya que provocó marcados síntomas clínicos de enfermedad en los animales, alto contenido microbiológico en heces y tejidos, así como mayor daño a nivel tisular en comparación con las demás cepas y el control. Se ha demostrado que ciertas condiciones presentes en el intestino delgado son capaces de estimular la invasión de *S. enterica*. Por ejemplo, la baja concentración de oxígeno, la alta osmolaridad y el pH cercano a neutro, inducen la expresión de genes de SPI-1 a través de HilA (Altier, 2005). Esto hace necesario evaluar en estudios futuros los patrones de expresión de genes en la isla de patogenicidad I de las cepas ST213 durante el proceso de invasión. En particular, sería interesante cuantificar los niveles de transcripción del T3SS, relacionado con la vía principal utilizadas por *S. enterica* para “inyectar” proteínas efectoras e internalizarse (Galán et al., 2014). Cabe resaltar que tanto en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, las cepas ST213 fueron capaces de infectar al hospedero. Esto es relevante, ya que estas cepas fueron aisladas de alimentos, por lo que además tienen la capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés ambiental. La capacidad de resistir condiciones ambientales y de sobrevivir y replicarse dentro de un hospedero, podría explicar el éxito de este genotipo en su dispersión geográfica.

El seguimiento de los estudios realizados con el genotipo ST313 desde su descripción como variante prevalente en salmonelosis invasiva en África hasta la documentación de variantes en Brasil, muestran claramente la estrategia moderna para el estudio de patógenos emergentes. Dicha estrategia debe de combinar análisis epidemiológico, con la realización de estudios experimentales de patogénesis y virulencia, así como la incorporación de herramientas omicas, particularmente la genómica. La incorporación de dichos componentes de estudio permite ir generando una idea muy clara del proceso de surgimiento de un nuevo patotipo bacteriano, así como estructurar explicaciones a nivel fisiológico, bioquímico y genético para su emergencia. En el presente trabajo se sentaron las bases para generar una estrategia de estudio similar en el genotipo ST213, debido a su relevancia en salud pública

para México, país en el que se describió por primera vez, y para el mundo, dado el proceso de expansión geográfica que dicho genotipo ha presentado en los últimos años.

7. CONCLUSIÓN

A través de este estudio se identificaron diversas estrategias en el genotipo ST213 que le permiten resistir el estrés e interactuar de manera más eficiente con el hospedero, diferenciándose fisiológicamente del genotipo ST19. La generación de filamentos, formación de biofilm, la motilidad, la capacidad de modificar la composición de ácidos grasos de membrana y su versatilidad metabólica parecen tener un papel importante en el éxito que este genotipo tiene para sobrevivir en ambientes fuera del hospedero. Esta resistencia al estrés está relacionada con su virulencia, ya que las cepas del genotipo ST213 también mostraron una mayor capacidad para internalizar células epiteliales e inducir una respuesta inflamatoria (*in vitro*), así como para establecer una infección y síntomas de enfermedad en un modelo *in vivo*. Por lo anterior, se comprobó la hipótesis de este trabajo. No obstante, también se documentó la existencia de variabilidad intra-genotipo en las cepas ST213. Por lo que sería interesante a futuro evaluar los mecanismos y procesos relacionados con la variación fenotípica de dicho genotipo, con la finalidad de saber si se comparten con otros genotipos emergentes relacionados con salmonelosis invasiva no tifoidea, o sigue caminos diferentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackermann, M., 2013. Microbial individuality in the natural environment. *ISME J.* 7, 465–467. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.131>
- Altier, C., 2005. Genetic and environmental control of salmonella invasion. *J. Microbiol.* 43 Spec No, 85–92.
- Arnold, D.L., Jackson, R.W., Waterfield, N.R., Mansfield, J.W., 2007. Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. *Trends Genet.* 23, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.03.017>
- Ashton, P.M., Owen, S. V., Kaindama, L., Rowe, W.P.M., Lane, C.R., Larkin, L., Nair, S., Jenkins, C., de Pinna, E.M., Feasey, N.A., Hinton, J.C.D., Dallman, T.J., 2017. Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella Typhimurium* epidemic in Africa. *Genome Med.* 9, 92. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0480-7>
- Galanis, E., Wong, D.M.A.L.F., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., Wegener, H.C., 2006. Web-based Surveillance and Global Salmonella Distribution, 2000–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 381–388. <https://doi.org/10.3201/eid1205.050854>
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C., Wagner, S., 2014. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annual Review of Microbiology.* 68: 415-438. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155725
- Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R. V., 2002. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* 129, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268802006842>
- Kalai-Chelvam, K., Yap, K.P., Chai, L.C., Thong, K.L., 2015. Variable Responses to Carbon Utilization between Planktonic and Biofilm Cells of a Human Carrier Strain of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *PLoS One* 10, e0126207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126207>
- Lamas, A., Miranda, J.M., Vázquez, B., Cepeda, A., Franco, C.M., 2016. Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in *Salmonella enterica* decrease under anaerobic conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.043>
- Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M., 2018. *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assessment from farm to fork. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.8945>
- Lambert, G., Kussell, E., 2014. Memory and Fitness Optimization of Bacteria under Fluctuating Environments. *PLoS Genet.* 10, e1004556. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004556>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2013. Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.016>

- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.002>
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2011. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiol.* 28, 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.006>
- Martins, M., McCusker, M.P., McCabe, E.M., O’Leary, D., Duffy, G., Fanning, S., 2013. Evidence of Metabolic Switching and Implications for Food Safety from the Phenome(s) of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Cultured at Selected Points across the Pork Production Food Chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5437–5449. <https://doi.org/10.1128/AEM.01041-13>
- Okoro, C.K., Kingsley, R.A., Connor, T.R., Harris, S.R., Parry, C.M., Al-Mashhadani, M.N., Kariuki, S., Msefula, C.L., Gordon, M.A., de Pinna, E., Wain, J., Heyderman, R.S., Obaro, S., Alonso, P.L., Mandomando, I., MacLennan, C.A., Tapia, M.D., Levine, M.M., Tennant, S.M., Parkhill, J., Dougan, G., 2012. Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat. Genet.* 44, 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/ng.2423>
- Olsen, S.J., Bishop, R., Brenner, F.W., Roels, T.H., Bean, N., Tauxe, R. V., Slutsker, L., 2001. The Changing Epidemiology of *Salmonella*: Trends in Serotypes Isolated from Humans in the United States, 1987–1997. *J. Infect. Dis.* 183, 753–761. <https://doi.org/10.1086/318832>
- Ranieri, M.R., Whitchurch, C.B., Burrows, L.L., 2018. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.006>
- Solomon, E.B., Niemira, B. a, Sapers, G.M., Annous, B. a, 2005. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *J. Food Prot.* 68, 906–912. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.5.906>
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 45, 502–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C., 2014. The Molecular Epidemiological Characteristics and Genetic Diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS One* 9, e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>
- Veening, J.-W., Smits, W.K., Kuipers, O.P., 2008. Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 193–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163002>
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G., 2013. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>

- Wiesner, M., Zaidi, M.B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J.J., Silva, C., 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* 9, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>
- Wong, M.H.Y., Yan, M., Chan, E.W.C., Liu, L.Z., Kan, B., Chen, S., 2013. Expansion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ST34 Clone Carrying Multiple Resistance Determinants in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4599–4601. <https://doi.org/10.1128/AAC.01174-13>
- Xu, H., Lee, H.-Y., Ahn, J., 2010. Growth and Virulence Properties of Biofilm-Forming *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium under Different Acidic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7910–7917. <https://doi.org/10.1128/AEM.01508-10>
- Xu, H., Lee, H.Y., Ahn, J., 2008. Cross-protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 290–297. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02429.x>