
Diferenciación de cepas virulentas de *Salmonella enteritidis*: aplicación al diagnóstico clínico y al control sanitario

Differentiation of virulent strains of Salmonella enteritidis: application to clinical diagnosis and health control

C. Solano¹, B. Sesma², M. Álvarez³, I. Dorronsorro⁴, R. Díaz¹, E. Urdaneta⁵, C. Gamazo¹

INTRODUCCIÓN

Las infecciones e intoxicaciones de origen alimentario son todavía una importante causa de morbilidad, manteniéndose una alta incidencia en los últimos años, a pesar de las campañas de educación sanitaria que se vienen realizando. Una vez más, *Salmonella enteritidis* es el agente causal más frecuentemente detectado, tanto en los brotes de toxoinfecciones alimentarias como en el ambiente. Entre 1976 y 1989 se registraron en España 4.596 brotes de toxoinfecciones alimentarias, de los que 1.384 (30%) se debieron a *S. enteritidis*. Durante 1992 el Centro Nacional de Referencia recogió 4.650 cepas de *Salmonella* (excluida *S. typhi*) de las que 3.413 fueron de origen humano. Durante 1992 y 1993, *S. enteritidis* continuó siendo el serotipo de *Salmonella* más frecuentemente aislado en Navarra.

A pesar de todo, se conoce muy poco sobre los factores asociados a la virulencia de *S. enteritidis* aunque son muchos los estudios publicados al respecto, no existiendo un factor claramente correlacionado con la virulencia. Una gran parte de los estudios sobre marcadores de virulencia de *Salmonella* se han aplicado, a nuestro juicio, a poblaciones mal diferenciadas, en base solo a su origen (clínico o ambiental) y no a su capacidad real de producir o no un efecto deletéreo.

Existe actualmente una gran controversia respecto a la dosis infectiva mínima de *Salmonella*, concepto de gran trascendencia en salud pública, lo que nos hace sospechar de la existencia de cepas de baja virulencia. Por ello, en este trabajo se tomaron cepas de *S. enteritidis* de origen humano y animal, y de entornos ambientales (aguas y alimentos), estudiando las características sero-bioquímicas que pre-

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 103-111.

1. Departamento de Microbiología. Universidad de Navarra.
2. Instituto de Salud Pública.
3. Laboratorio Municipal.
4. Departamento de Microbiología. Hospital de Navarra.
5. Departamento de Fisiología. Universidad de Navarra

Correspondencia:

Begoña Sesma Bea
Instituto de Salud Pública de Navarra
Leyre, 15
31003 Pamplona
Tfno. 948 423451
Fax 948 423474
e-mail: spubli01@cfnavarra.es

sentan las cepas, así como su virulencia en un modelo de infección experimental. Una vez diferenciadas las dos poblaciones de cepas virulentas y baja virulencia de *S. enteritidis*, se estudió la expresión diferencial en las mismas de factores asociados con la virulencia, para su aplicación en pruebas rápidas de diagnóstico. Por último, se obtuvieron diferentes complejos antigénicos de una de las cepas clínicas para su aplicación en el diagnóstico serológico de la infección por *S. enteritidis* en gallinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diagnóstico serológico

Sueros

Se estudiaron un total de 128 sueros procedentes de otras tantas gallinas de los que de 72 se disponía del coprocultivo del mismo animal.

Antígenos

Se obtuvieron cuatro preparaciones antigénicas de una cepa virulenta de *S. enteritidis* (aislamiento clínico en el Hospital de Navarra). A continuación se describe brevemente la obtención y nomenclatura empleada para las diferentes preparaciones. La cepa de *S. enteritidis* se incubó en caldo de cultivo TSB. Una vez alcanzada la fase exponencial del crecimiento se inactivaron mediante la adición de fenol (concentración final 0,5%). Tras centrifugación (4.000 x g, 20 min) se recogió el sobrenadante, que fue entonces ultracentrifugado (100.000 x g, 6 h), obteniéndose el sobrenadante (SS) y el sedimento subcelular (SD). A partir del sedimento celular original se procedió a la extracción del lipopolisacárido (LPS). Brevemente, 20 g (peso húmedo) de bacterias se resuspendieron en 100 ml de agua desionizada, y fueron tratadas con un volumen igual de fenol a 65 °C, mediante agitación constante, durante 20 min. Tras centrifugar (4.000 x g, 30 min) se recogió el sobrenadante, rico en LPS, que sería posteriormente purificado mediante digestión con DNasa, RNasa y proteínasa K. Finalmente, se dializó y liofilizó. A partir del LPS se obtuvo una última fracción antigénica, de naturaleza polisacárida. Para su obten-

ción, se resuspendió la fracción de LPS en ácido acético al 2% (2 mg peso seco/ml) y se hidrolizó a 100 °C, vapor fluente, durante 1 hora. Tras la hidrólisis, se centrifugó a 100.000 x g, 6 h. El sobrenadante (PS) así como el sedimento (PSD) resultantes se dializaron y liofilizaron.

Técnicas serológicas

IDDEX comercial: Esta técnica inmunoenzimática comercial es del tipo ELISA-competitivo. Brevemente, los sueros se incubaron en las microplacas conteniendo el antígeno durante 60 min a 25 °C. A continuación, se añadió un anticuerpo monoclonal específico de *S. enteritidis*. El suero anti-Fc de Ig de gallina conjugado con peroxidasa de rábano se incubó durante 30 min a 25 °C.

ELISA experimental: Una concentración fija del correspondiente antígeno (5 μ g/ml) se fijó en microplacas de poliestireno en tampón carbonato (pH 9,6) durante 12 h a 4°C. Los sueros de gallinas se diluyeron en dichas placas sensibilizadas (1:100 y 1:1000 en PBS - 0,05% Tween - 5% leche descremada). Tras una incubación a 37°C durante 4 h, se añadió el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti-IgG de gallina, Nordic Labs., Tilburg, Netherland), a una dilución 1:5000 en PBS-Tween, incubándose durante 30 min a 37°C. Como sustrato-cromógeno de la reacción se utilizó H₂O₂-ABTS. Las lecturas de la densidad óptica se efectuaron con un espectrofotómetro de microplacas (Titertek-Multiskan).

Estudio sobre la virulencia

Cepas bacterianas utilizadas

En este estudio se ha utilizado un total de 29 cepas bacterianas, de las cuales 27 correspondieron a *Salmonella enteritidis* (Tabla 1). Todas las cepas de *Salmonella enteritidis* fueron identificadas mediante métodos bioquímicos y serológicos como (1.9.12;g.m). El origen de los aislamientos fue diverso (Tabla 1)

Modelo de Infección Experimental

Se infectaron grupos de seis pollos machos recién nacidos ISA Brown de tipo "layer", por vía intraperitoneal, con 2×10^7 - 2×10^6 UFC de la cepa correspondiente. Los

Tabla 1. Correlación entre capacidad de formación del biofilm en ATM y virulencia de *Salmonella enteritidis*.

nº de cepa	Origen	Formación del biofilm	log ₁₀ DL ₅₀ día 3 postinfección
SA-20	ambiental	+	2,61
SA-27	ambiental	+	2,83
SA-33	ambiental	+	2,25
SA-57	ambiental	+	2,45
1167/97	ambiental	+	2,03
1168/97	ambiental	+	2,21
1170/97	ambiental	+	1,42
49/97	ambiental	+	1,96
SA-942	ambiental	-	5,29
SA-45	ambiental	-	4,00
SA-1162	ambiental	-	4,11
4839/96	alimento	-	4,60
5161/96	alimento	+	1,14
PT4 C	alimento	+	1,39
PT4 I	alimento	+	1,97
830	alimento	+	2,93
PT4 C6B	animal	+	3,06
120/Bar	animal	+	2,57
126/Bar	animal	+	1,05
3934	clínica	+	1,79
1344	clínica	+	2,87
4271	clínica	+	2,26
5507	clínica	+	3,18
5996	clínica	+	2,89
6268	clínica	+	2,94
PT4 E	clínica	+	3,15
PT4 A	clínica	+	2,45

pollos se observaron durante doce días después de la infección, anotando cada 12 h el número de animales muertos. La dosis letal 50 (DL₅₀) se calculó mediante el programa Grafit (Erithacus Software Limited. Version 3.0) a los tres días postinfección. Los animales en estudio se mantuvieron en un cabina de seguridad con presión negativa (IFFA CREDO, L'Arbresle, Francia), a temperatura y humedad constante, recibiendo comida y agua *ad libitum*.

Inducción selectiva de adhesión y autoagregación

Las cepas almacenadas a -80 °C fueron cultivadas en agar de tripticasa soja (TSA) durante una noche a 37 °C. Se inoculó un matraz con 50 ml de caldo de tripticasa soja (TSB) con tres colonias del anterior cultivo y se incubó en un baño a 37°C con agitación (200 rpm) durante aproximada-

mente cuatro horas hasta alcanzar una DO₅₉₀ 0,4 (fase exponencial). Las células se centrifugaron a 14.000 x g durante cinco minutos y se resuspendieron en el medio ATM (60 mM ClNa, 30 mM NaHCO₃, 20 mM KCl, 111 mM Glucosa; pH 8,4) hasta una DO₅₉₀ 0,4, en tubos de vidrio que se incubaron durante 1-2 horas con agitación vigorosa a 37 °C⁻¹.

Estudio en cultivos celulares Caco-2

En este estudio se utilizó el sistema de membranas porosas como soporte para el cultivo de la línea celular de enterocitos de carcinoma de colon (Caco-2). Se prepararon monocapas de células diferenciadas sobre "Transwell filter units" (0,33 cm², 3,0 mm diámetro de poro. Costar, Cambridge, MA). Para ello, 10⁵ células aproximadamente se añadieron apicalmente sobre los filtros sumergidos en 1

ml de "medio de incubación" [DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), 10% de FBS (suero fetal bovino, GIBCO)]. Las células en monocapa se utilizaron a los 15 días de incubación (37 °C, 5% de CO₂) tras comprobar la correcta polarización y formación de la monocapa mediante la medida de la resistencia transepitelial (Millicell ERS, Millipore). Las monocapas se infectaron apicalmente con un cultivo en fase exponencial de la cepa correspondiente de *Salmonella*, de forma que la cantidad total inicial de bacterias en la parte apical fue de 10⁷ UFC/ml. A continuación, las células infectadas se incubaron (37 °C, 5% de CO₂) durante 4 horas. Se determinó la resistencia transepitelial de la monocapa en los tiempos 0, 1, 2, y 4 horas de incubación. Las lecturas se corrigieron según la superficie de la monocapa y los datos se expresaron en centímetros cuadrados⁵.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio serológico

El objetivo consistía en el desarrollo de una prueba serológica para el diagnóstico de la infección por *S. enteritidis* en aves. Hasta el momento la técnica más ampliamente utilizada es una prueba inmunoenzimática comercializada (IDDEX); sin embargo, esta técnica presenta los siguientes inconvenientes: existe un cierto porcentaje de falsos negativos en animales infectados (bacteriología positiva); no diferencia los animales vacunados de los infectados; es una técnica muy costosa. Por ello, se estudiaron mediante un ELISA indirecto la sensibilidad y especificidad de diferentes extractos antigénicos obtenidos de una cepa virulenta de origen clínico de *S. enteritidis*. El análisis químico (proteínas y LPS) de estas fracciones antigénicas se incluye en la tabla 2.

Tabla 2. Valores comparativos de Sensibilidad y Especificidad para el IDDEX y el ELISA experimental con cada uno de los antígenos utilizados. Comparación de gallinas sanas vs. infectadas (A), y comparación de "sanas + vacunadas" vs. infectadas (B).

Antígeno	Prot/LPS%	Sensibilidad %(A)	Especificidad %(A)	Sensibilidad %(B)	Especificidad %(B)
LPS	1,3/99,0	70,8	100	70,8	59,9
PS	0,6/17,9	76,4	100	76,4	88,6
SD	31,6/50,7	72,2	100	72,2	52,3
SS	23,8/27,9	75,0	68,2	75,0	47,7
IDDEX comercial		55,6	100	55,6	50,0

En un primer estudio se emplearon un total de 12 sueros de gallinas, que se seleccionaron por ser positivos o negativos mediante la prueba IDDEX (6 sueros positivos y 6 sueros negativos). Los resultados obtenidos en nuestras condiciones demostraron que los sueros negativos por IDDEX lo eran también empleando nuestros antígenos; sin embargo, con respecto a los sueros positivos por IDDEX, encontramos algunos hechos significativos. En primer lugar, dependiendo de la preparación antigénica empleada algunos de los sueros podrían considerarse negativos. En segundo lugar, uno de los sueros (1/6) pudo haberse considerado negativo mediante dicha prueba, y sin embargo, fue claramente positivo utili-

zando algunos de nuestras preparaciones antigénicas (LPS, PS y SED).

Estos resultados sugieren que el IDDEX no es una prueba definitiva en cuanto a su sensibilidad. Por otra parte, la prueba IDDEX quizás presente también problemas de especificidad ya que dos de los sueros (2/6) fueron negativos con algunos de nuestros antígenos. Debe tenerse en cuenta que no se dispone del coprocultivo directo de estas gallinas, por lo que no existe una prueba directa de que estuvieran realmente infectadas. Por ello, con objeto de confirmar estos datos, en un segundo estudio se analizó un mayor número de sueros de gallinas, de las que además disponíamos de los datos del coprocultivo. Así, se emplea-

ron un total de 116 sueros de gallinas distribuidos de la siguiente forma: Grupo 1 (n=72), gallinas infectadas con *S. enteritidis* (coprocultivo positivo); Grupo 2 (22), gallinas sanas; Grupo 3 (22), gallinas vacunadas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Si no consideramos el grupo de aves vacunadas, es decir, si no nos interesa diferenciar vacunados de infectados, el valor de sensibilidad del IDDEX es inferior al obtenido con el antígeno PS (55,6 vs. 76,4%), con una especificidad en ambos casos del 100%. Si, por otra parte, se considera deseable la diferenciación serológica del grupo de animales vacunados de los infectados, la especificidad del IDDEX es de nuevo claramente inferior a la obtenida por ELISA con el antígeno PS (50,0 vs. 88,6%).

En definitiva, los resultados obtenidos sugieren de nuevo que nuestro sistema ELISA podría ser una alternativa válida a la prueba comercial IDDEX, al menos para su uso en nuestra Comunidad.

Estudio sobre la virulencia

Desarrollo de un modelo animal

Se trata de aplicar un modelo sencillo y económico. En primer lugar, con objeto de comprobar su poder discriminatorio, se compararon un aislamiento clínico, y por tanto virulento (*S. enteritidis* 5996), y una cepa rugosa (avirulenta) de *S. minnesota* (SF 1121 Ra1P) tal y como se indica en la sección de material y métodos. Ningún pollo infectado con la cepa de *S. minnesota* murió durante los doce días de observación después de la infección. En cambio la dosis letal 50 (DL₅₀) calculada a los tres días postinfección de la cepa de *S. enteritidis* 5996 fue inferior a mil células (2,89 logs).

Tras esta observación se decidió ampliar el estudio con objeto de alcanzar el primero de los objetivos planteados en este trabajo: comprobar si realmente existían aislamientos de *S. enteritidis* de distinta virulencia y si este modelo era capaz de diferenciarlas. Para ello, se tomaron 27 cepas de *S. enteritidis* de distintos grupos de aislamientos de diferente origen (Tabla 1). Tras la infección de los pollos se calculó la DL₅₀ de las distintas cepas a los tres días postinfección (Tabla 1). Tras realizar

un análisis estadístico de todos los datos de la variable DL₅₀, se encontraron dos grupos con centros "cluster" en log₁₀ DL₅₀ 2,32 (alta virulencia) y 4,50 (baja virulencia). Al aplicar un test de Mann-Whitney, estas diferencias demostraron ser altamente significativas (p<0,0001). Tres de las cuatro cepas incluidas dentro del grupo de baja virulencia fueron aisladas de aguas y la otra cepa fue aislada de una crema no implicada en toxoinfecciones (Tabla 1). Todas las cepas clínicas quedaron incluidas dentro del grupo de alta virulencia, lo que podría considerarse como un control a favor del poder discriminatorio de la virulencia de *S. enteritidis* en este modelo de infección.

En definitiva, mediante este modelo era posible detectar aislamientos de *S. enteritidis* de virulencia estadísticamente distinta, un hecho no descrito en la literatura.

Expresión de una matriz extracelular por las cepas más virulentas de *Salmonella enteritidis*

Como ya se mencionó anteriormente, durante su viaje por el organismo *Salmonella* debe tolerar varias agresiones como el pH gástrico y los péptidos antimicrobianos segregados por los enterocitos. Durante este viaje se produce una interacción íntima entre la bacteria y las células hospedadoras mediante una serie de señales bioquímicas. Luego, durante la invasión, dentro de las células epiteliales y fagocíticas ocurren espectaculares sucesos que invocan también numerosos procesos de inducción⁶.

Así, se puede decir que la virulencia en *Salmonella*, y en la mayoría de otros microorganismos, es una propiedad adquirida⁷. Consiguientemente, osmolaridad, tensión de oxígeno, pH, concentración de cationes libres (hierro, magnesio, etc), influyen significativamente en el fenotipo y la expresión de genes de invasión^{8,9}.

Por todo ello, con el objetivo de la diferenciación *in vitro* de la virulencia, se estudió la expresión de un fenotipo diferencial por las cepas virulentas tras la inducción de una situación de estrés, que podría regular la expresión de los genes específicos involucrados en la virulencia. En un primer ensayo se comparó el comporta-

miento de un aislamiento clínico (cepa 5996, alta virulencia) y uno ambiental (cepa SA-942, baja virulencia) de *S. enteritidis* en un medio (ATM) deficiente en nutrientes esenciales. Además, también se estudió en estas condiciones un aislamiento clínico de *Escherichia coli* O:111. Duran-

te la incubación, se observó la formación de unos filamentos (biofilm) blancos de apariencia mucosa, pegados al vidrio justo en la interfase líquido-aire, sólo en el cultivo correspondiente a la cepa clínica *S. enteritidis* 5996 (Fig. 1). El fenómeno se hizo visible a las tres horas de incubación.



Figura 1. Biofilm producido por la cepa 3934 tras su incubación en ATM.

El biofilm formado fue muy estable y permaneció unido al vidrio incluso después de agitar fuertemente con un vortex. En ninguno de los cultivos se pudo apreciar multiplicación bacteriana, de forma que la DO_{590} a lo largo de 96 horas de incubación se mantuvo constante, excepto en el caso

de la cepa formadora del biofilm, cuya DO_{590} disminuyó progresivamente debido a que, a lo largo de la incubación, parte del cultivo inicial fue integrándose en el biofilm. Posteriormente, se determinó el número de UFC/ml a las 96 horas de incubación mediante siembra en TSA. Para

ello, con ayuda de una jeringuilla se despegó el biofilm y se sonicó (30 seg a 50 Watos; Branson, Sonifier 450) con objeto de disgregar las células formadoras del biofilm. El recuento fue igual al inóculo inicial en el caso de las tres muestras, corroborando que estas bacterias no son capaces de multiplicarse en ATM.

Debido a la relación observada entre alta virulencia (cepa 5996, modelo de infección pollo recién nacido, vía ip) y la capacidad de formación del biofilm en ATM (negativo en la cepa de baja virulencia SA942), se decidió ampliar el estudio a un mayor número de cepas de *S. enteritidis* de conocida virulencia en el modelo ya citado. Para ello, se incubaron 27 cepas del mismo modo ya descrito y se monitorizó visualmente la aparición del biofilm durante 48 horas de incubación. Los resultados se expresan en la tabla 1.

Los resultados indicaron que todas las cepas utilizadas en este estudio incluidas en el grupo de alta virulencia, fueron capaces de formar un biofilm durante su incubación en ATM. Además, en los cultivos de todas las cepas formadoras de biofilm, se

observó la formación de un agregado celular en el fondo del tubo muy difícil de disgregar por agitación. Las cuatro cepas del grupo de baja virulencia, no fueron capaces de formar el biofilm y tampoco se observó la aparición del agregado celular durante las 48 horas de incubación.

Como ya se ha comentado anteriormente, el medio ATM no permite la multiplicación de *S. enteritidis*. Al suplementar el medio con suero de ternera fetal (10%) o con extracto de levadura (3 mg/ml) el fenómeno se inhibió y se produjo una intensa multiplicación bacteriana. A partir de esta observación se decidió estudiar el efecto del estrés nutricional mediante la suplementación del medio con diferentes sales. Los resultados demostraron que el biofilm no se producía cuando el ATM era suplementado con una fuente inorgánica de fósforo, nitrógeno, azufre, magnesio, calcio o hierro (Fe^{3+}). Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria de las sales de nitrógeno, hierro y calcio fueron muy elevadas (10, 20 y 500 veces por encima de la concentración de estas sales en un medio de cultivo estándar) (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima de sales en la formación del biofilm^b por *S. enteritidis*.

Sal suplementada	Concentración en medio normal ^a	CIM ^b	b/a
CaCl ₂	0,01 mg/ml	5 mg/ml	500
FeCl ₃	0,014 mg/ml	0,28 mg/ml	20
NH ₄ Cl	1 mg/ml	10 mg/ml	10
SO ₄ Na ₂	5 mg/ml	10 mg/ml	2
Na ₂ HPO ₄	10 mg/ml	10 mg/ml	1
(NH ₄) ⁺ H ₂ PO ₄	5 mg/ml	5 mg/ml	1
MgCl ₂	0,02 mg/ml	0,018 mg/ml	1

^a Concentración mínima requerida en un medio para bacterias heterótrofas.

Comportamiento de *S. enteritidis* en cultivos Caco-2

En este estudio, nuestro objetivo se centraba en determinar si las cepas más virulentas de *S. enteritidis* eran igualmente más hábiles en su capacidad de invadir enterocitos. Para ello, se utilizó el sistema

de membranas porosas como soporte para el cultivo de la línea celular de enterocitos de carcinoma de colon (Caco-2). Ha sido previamente demostrado que, a diferencia de los simples cultivos sobre plástico, este sistema causa la diferenciación de estas células, mimetizando las condiciones *in*

in vivo. Tras un periodo de incubación, se produce la polarización de los enterocitos. La formación de una monocapa estable y compacta, confluyente, conformada gracias a la formación de las uniones fuertes interlaterales, se puede medir fácilmente mediante un resistómetro.

Monocapas de células Caco-2 diferenciadas se prepararon sobre las membranas porosas ("inserts") (3 mm, diámetro de poro) en microplacas de 24 pocillos. Para ello, 10^4 células en "Dulbecco modified medium" con 5% de suero de ternera fetal se incubaron sobre cada "insert" a 37 °C en una atmósfera 10% CO₂-90% aire, hasta

alcanzar la confluencia, aproximadamente 15 días. El medio fue cambiado diariamente. La medida de la confluencia fue determinada mediante un voltímetro-resistómetro, posicionando los microelectrodos sobre la monocapa y en el medio sobrenadante.

El ensayo de la adherencia sobre los enterocitos se realizó incubando los enterocitos en monocapa sobre el "insert" con 10^7 UFC/ml de la correspondiente cepa de Salmonella a estudio. La mezcla se dejó incubar a 37 °C, determinándose la resistencia eléctrica cada hora. Los resultados obtenidos se expresan en la figura 2, en

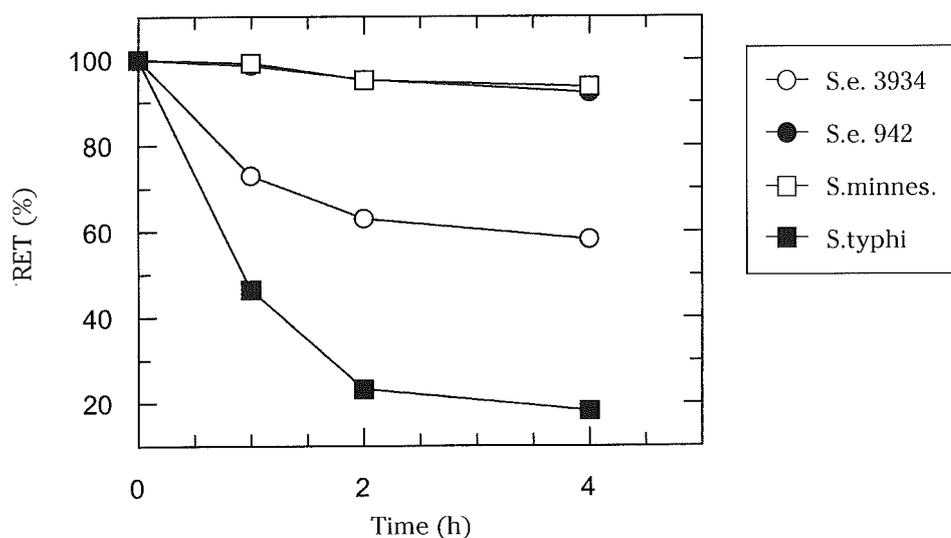


Figura 2. Efecto de la infección de células Caco-2 en monocapa con diferentes cepas de Salmonella. Perturbación de la integridad de la monocapa. Reducción de la resistencia eléctrica transmembrana (RET) en el tiempo (horas)

donde se puede observar que las cepas más virulentas en el modelo animal (nº 3934 y nº 5996) fueron también las que produjeron una mayor perturbación en la monocapa, haciendo disminuir la resistencia en aproximadamente un 80% respecto la resistencia original, indicativo de perturbación de las uniones fuertes intercelu-

lares o incluso de lisis celular, fenómeno éste último que se está estudiando en la actualidad.

Los resultados sugieren que el biofilm formado por las cepas más virulentas de *S. enteritidis* en nuestras condiciones experimentales, pudiera ser un factor de virulencia. Un biofilm se puede definir como una

población de bacterias incluidas en una matriz adheridas unas a otras y/o a una interfase o sustrato biológico (otras células o tejidos, incluyendo matrices poliméricas) o abiológico (mineral o sintético)¹⁰. La significancia real de los biofilms bacterianos ha ido surgiendo gradualmente desde su primera descripción¹¹, y el primer reconocimiento de su ubicuidad¹². Si los biofilms bacterianos fueran simplemente células adheridas a una superficie, su importancia sería mínima, pero hoy sabemos que las diferencias entre las células libres y formando parte del biofilm son muy significativas¹³. Durante el complejo proceso de adhesión, el fenotipo de las células bacterianas se va alterando como respuesta a la proximidad de una superficie^{14,15}. Es posible que los genes que expresan el factor de adherencia en nuestras condiciones experimentales (ATM) sean también activados por señales ambientales del hospedador durante la infección. Sin embargo, aún no tenemos datos concluyentes que demuestren que el biofilm es un factor de virulencia. Se deben ampliar los estudios en cultivos celulares de enterocitos así como demostrar su expresión *in vivo*. De cualquier forma, los resultados obtenidos sugieren que la formación de un biofilm en ATM pudiera ser utilizado como una herramienta diagnóstica en la discriminación de las cepas virulentas de *S. enteritidis*.

Agradecimientos

Agradecemos a M^a José Solsona (CESAC-Reus) los sueros utilizados en este trabajo. Igualmente, agradecemos a Montserrat Saco (Laboratorio Agrario-Barcelona) y a Ildefonso Perales (Laboratorio de Salud Pública-Vizcaya) el envío de algunas de las cepas estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- GAMAZO C, SOLANO C, DÍAZ R, DORRONSORO I, ALVAREZ M, SESMA B. Procedimiento para la diferenciación *in vitro* de las cepas virulentas de *Salmonella enteritidis*. (Patente española nº. 9700408), 1997.
- SOLANO C, SESMA B, ALVAREZ M, HUMPHREY TJ, THORNS CJ, GAMAZO C. Discrimination of strains of *Salmonella enteritidis* with differing levels of virulence by an *in vitro* glass adherence test. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 674-678.
- SOLANO C, BOURGI O, SESMA B, ALVAREZ M, DÍAZ R, DORRONSORO I, GAMAZO C. Release of an extracellular matrix from virulent strains of *Salmonella enteritidis*. XV International Symposium of Salmonellosis and Brucellosis. Limassol-Cyprus. 16-21 Febr, 1997.
- ALVAREZ M, SOLANO C, SESMA B, GAMAZO C. Biofilm produced in starvation from virulent strains of *Salmonella enterica enteritidis*. International Symposium of Salmonella and Salmonellosis. Ploufragan-Francia. 20-22 Mayo, 1997.
- MADARA, JL, DHARMSATHAPORN K. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *J Cell Biol* 1985; 101: 2124-2133.
- FINLAY BB, LEUNG KY, ROSENSHINE I, GARCÍA DEL PORTILLO F. *Salmonella* interactions with the epithelial cell. *ASM News* 1992; 58: 486-489.
- GROISMAN EA, OCHMAN H. How to become a pathogen. *Trends Microbiol* 1994; 289: 421-427.
- GALAN JE. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into the host cells. *Mol Microbiol* 1996; 20: 263-271.
- LEE CA, FALKOW SA. Entry of *Salmonella* into epithelial cells. En: F. Cabello, C. Hormaeche, P. Mastroeni and L. Bonina (editors), *Biology of Salmonella*. Plenum Press, New York, 1993.
- PALMER RJ, WHITE DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol* 1997; 11: 435-440.
- ZOBELL CE, ANDERSON DQ. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored seawater and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol Bull Woods Hole* 1936; 71: 324-342.
- COSTERTON JW, GEESEY GG, CHENG KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238: 86-95.
- COSTERTON JW, LEWANDOWSKY Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPIN-SCOTT HM. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
- FLETCHER M. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv Microb Physiol* 1991; 32: 53-85.
- LAPPIN-SCOTT HM, COSTERTON JW.(Editors). *Microbial Biofilms*. Cambridge: Cambridge Univ. Press. In press, 1995.