

Análisis de la capacidad de formación de biofilms en *Salmonella* Typhimurium



Carlota María Fernández San Vicente
Trabajo Fin de Grado de Farmacia
Universidad del País Vasco (UPV/EHU)
Curso 2020-2021

Directores:

Joseba Bikandi Bikandi
Lorena Laorden Muñoz

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS	3
3	DESARROLLO	3
3.1	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE <i>SALMONELLA</i>	3
3.1.1	Antígeno somático (O)	4
3.1.2	Antígeno flagelar (H)	4
3.1.3	Antígeno capsular (Vi)	5
3.2	PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE <i>SALMONELLA</i>	5
3.2.1	Factores de virulencia	7
3.2.1.1	Islas de patogenicidad	8
3.2.1.2	Plásmidos	9
3.3	BIOFILM	9
3.3.1	Generalidades	9
3.3.2	Composición del biofilm	10
3.3.3	Biofilms en <i>Salmonella</i>	11
3.3.3.1	Principales constituyentes de la matriz extracelular de biofilm en <i>Salmonella</i>	11
3.3.3.2	Regulación de la formación de biofilms en <i>Salmonella</i>	12
3.3.4	Evaluación de la capacidad de formación de biofilms por <i>Salmonella</i>	14
3.3.4.1	Clasificación de morfotipos	15
3.3.4.2	Determinación de la producción de celulosa en calcofluor	15
3.3.4.3	Capacidad de formación de biofilm en microplacas de poliestireno en distintas condiciones de crecimiento	16
3.3.4.4	Capacidad de formación de biofilms sobre distintas superficies	18
3.3.4.5	Formación de biofilms en la superficie aire-liquido en tubo	18
4	CONCLUSIONES	19
5	BIBLIOGRAFÍA	20

RESUMEN

Salmonella enterica, patógeno conocido desde el siglo XIX, es el principal microorganismo causante de la mayoría de brotes de origen alimentario por detrás de *Campylobacter jejuni*.

Dentro del género *Salmonella*, uno de los serotipos generalistas más frecuentemente aislados en las muestras clínicas junto con *Salmonella* Enteritidis, es *Salmonella* Typhimurium. Ambos serotipos causan principalmente salmonelosis, una enfermedad auto limitante pero que también puede causar la muerte, por lo que dicho serotipo ha requerido un mayor control y seguimiento epidemiológico.

A finales del siglo XX, emergieron en España nuevas variantes monofásicas del serotipo Typhimurium, causadas principalmente por la pérdida de uno de los flagelos. Actualmente la variante monofásica S. 4,[5],12:i:- es la que se notifica con más frecuencia después de los serotipos S. Typhimurium y S. Enteritidis, como causante de salmonelosis.

Este problema de salud pública nos lleva a la necesidad de analizar la información bibliográfica disponible del serotipo Typhimurium para determinar qué factores de virulencia posee y expresa, los cuales estarán implicados, entre otros en la supervivencia y en la formación de biofilms, capacidad muy significativa a la hora de facilitar la colonización y supervivencia de la bacteria en el intestino humano.

La formación de biofilms está fuertemente influenciada por una compleja red reguladora, permitiendo a S. Typhimurium adaptarse a diferentes entornos, por lo que será necesario conocer dicho proceso para posteriormente poder analizar los distintos métodos que permiten determinar la capacidad de formación de biofilms.

1 INTRODUCCIÓN

Salmonella es miembro de la familia Enterobacteriaceae, en la subdivisión o clase Gamma-proteobacteria. Actualmente se conocen dos especies de *Salmonella*: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última se divide en seis subespecies (*S. enterica* subsp. *enterica* I, *S. enterica* subsp. *salamae* II, *S. enterica* subsp. *arizonae* IIIa, *S. enterica* subsp. *diarizonae* IIIb, *S. enterica* subsp. *houtenae* IV, *S. enterica* subsp. *indica* VI) y éstas a su vez en diferentes serotipos, existiendo actualmente más de 2.600 serotipos de *Salmonella* (Tabla 1) ⁽¹⁾.

Tabla 1. Número de serotipos reconocidos dentro de cada especie/subespecie de *Salmonella* (Adaptado de Guibourdenchea y col., 2009).

Número de serotipos en cada especie y subespecie	
<i>S. enterica</i>	
subsp. <i>enterica</i>	1547
subsp. <i>salamae</i>	513
subsp. <i>arizonae</i>	100
subsp. <i>diarizonae</i>	341
subsp. <i>houtenae</i>	73
subsp. <i>indica</i>	13
<hr/>	
<i>S. bongori</i>	23
Total (género <i>Salmonella</i>)	2610

Los serotipos de *Salmonella* son designados mediante su fórmula antigénica basada en el esquema Kauffmann-White-Le Minor, determinados por la composición del antígeno somático (O), flagelar (H), o de superficie (Vi) después del nombre de la subespecie. El esquema Kauffmann-White es definido por *The World Health Organization* (WHO) en colaboración con el centro de referencia e investigación en *Salmonella* del instituto Pasteur ⁽²⁾.

En las formulas antigénicas de los serotipos de *Salmonella*, primero se escribe el antígeno O, seguido del antígeno Vi (si está presente), y del antígeno(s) H, primero de fase 1 y luego de fase 2. Los antígenos principales se separan mediante dos puntos y los antígenos individuales por comas. Los antígenos H de fase 1 son designados con una letra minúscula de "a" a "z" y a continuación "z1", "z2", "z3", etc. Los antígenos flagelares de fase 2 se asignan mediante números "1", "2", "3", etc. Por ejemplo el serotipo Typhimurium está determinado por la fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:1,2 ⁽³⁾.

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos Gram negativas de 0,7-1,5 µm x 2-5 µm de tamaño, anaerobias facultativas y móviles mediante flagelos de inserción peritrica, aunque existen variantes que carecen de ellos denominadas monofásicas o afásicas en los casos de pérdida de uno o ambos flagelos respectivamente. Crecen a una temperatura óptima de 37 °C aunque pueden multiplicarse en un amplio rango de temperatura de 7 a 48 °C. Tienen un pH óptimo de 6,5-7,5, soportando un rango de pH entre 4,5 y 9,5 ⁽⁴⁾.

Según datos de la *European Food Safety Authority* (EFSA), los dos serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* más frecuentes que causan la enfermedad de salmonelosis en el humano son *S. Typhimurium* responsable de aproximadamente el 60,9 % del total de los casos notificados y *S. Enteritidis* responsable de aproximadamente el 13,8 % de los casos ⁽⁵⁾. Ambos serotipos son generalistas, es decir, son capaces de colonizar y causar enfermedad en diversas especies de mamíferos ⁽⁶⁾. Después de los dos serotipos mencionados anteriormente, la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium (*S.* 4,[5],12:i:-) es la que se notifica con más frecuencia, siendo la responsable de aproximadamente el 4,7 % del total de los casos notificados ⁽⁵⁾.

Dicha variante monofásica es antigénicamente similar a *S. Typhimurium* pero su rasgo principal es la delección del operón responsable de la síntesis de los flagelos de segunda fase, el cual se identifica como 1,2 en la fórmula antigénica de *S. Typhimurium* ⁽³⁾. La primera variante monofásica descrita de *S. Typhimurium*, surgió en España en 1997 ⁽⁷⁾ y se convirtió en el cuarto serovar más común en los aislados clínicos en 1998 ⁽⁸⁾.

La salmonelosis causada por las bacterias mencionadas anteriormente, es una enfermedad intestinal autolimitada, que también puede causar la muerte. Se relaciona con la ingesta de alimentos o aguas contaminadas y la aparición de la enfermedad suele ocurrir entre las 8-48 horas post-ingesta, acompañada de dolor abdominal, vómitos, diarrea y un cuadro febril ⁽⁹⁾. Existen numerosos reservorios animales incluyendo, cerdos, vacas, pollos, además de otros animales tanto domésticos como salvajes.

En el genoma de *S. Typhimurium* existe un elevado número de genes que codifican para factores de virulencia necesarios durante el proceso infeccioso ⁽¹⁰⁾.

La formación de biofilms está asociada a brotes de salmonelosis e infecciones persistentes en pacientes ⁽¹¹⁾. Dichos biofilms son importantes para la propagación de *Salmonella* ya que es resistente a desinfectantes, estrés medioambiental, antibióticos y al sistema inmune de la célula hospedadora, promoviendo la supervivencia de la bacteria y facilitando su posterior dispersión ⁽¹²⁾. Cuando los nutrientes son escasos o cuando las

condiciones de desarrollo se vuelven severas, *Salmonella* crece más lentamente y secreta polímeros extracelulares que forman dichos biofilms en cuyo interior se alojan las células bacterianas. Por lo tanto, la persistencia de *Salmonella* en los biofilms supone una fuente de contaminación y puede significar un importante riesgo para la salud pública como ya hemos mencionado anteriormente ⁽¹²⁾.

2 OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el conocimiento de las generalidades, epidemiología, patogenia y virulencia de *Salmonella* Typhimurium, así como el nuevo serotipo monofásico de S.Typhimurium que emergió en España a finales del siglo XX, para posteriormente:

- Analizar y estudiar los genes implicados en la formación de biofilms y la relación con la capacidad patogénica de *Salmonella*.
- Comprender la compleja red reguladora implicada en la formación de biofilms.
- Estudiar los métodos experimentales disponibles.
- Analizar las estrategias más eficientes para evitar la formación de biofilms.

3 DESARROLLO

3.1 Identificación y caracterización epidemiológica de *Salmonella*

Como se ha comentado, la infección causada por *Salmonella* es una de las enfermedades entéricas principalmente implicadas en brotes causados por alimentos o aguas contaminadas. Por lo tanto, es importante llevar a cabo una exhaustiva vigilancia de dicha bacteria, para poder detectar, controlar y realizar un seguimiento de los casos que puedan surgir. Por ello, el conocimiento de la epidemiología de la salmonelosis constituye la principal herramienta para el control sanitario de esta enfermedad, siendo el serotipo el marcador epidemiológico de elección en este género. La serotipificación es una técnica sencilla que permite el seguimiento de los principales serotipos, pudiendo describir distintos patrones de distribución, virulencia y resistencia a serotipos concretos de *Salmonella*, lo que constituye un elemento importante en la investigación epidemiológica ⁽¹³⁾.

Además de la serotipificación, existen otros métodos de tipificación: el perfil bioquímico, el perfil de resistencia a antimicrobianos, la fagotipificación y métodos de tipificación genotípicos ⁽³⁾.

3.1.1 Antígeno somático (O)

El antígeno somático (O) caracterizado por ser termoestable y alcohol-resistente forma parte del lipopolisacárido (LPS) situado en la membrana externa de la pared celular. Corresponde concretamente a la cadena lateral O del mismo y es un determinante de virulencia importante en la mayoría de las bacterias Gram-negativas ⁽¹⁴⁾.

3.1.2 Antígeno flagelar (H)

Como se ha comentado, un gran porcentaje de cepas de *Salmonella* son móviles mediante flagelos peritricos. La flagelina, proteína estructural de los flagelos, es un antígeno importante de *Salmonella* ⁽⁴⁾.

La variación de fase se define como el cambio en la expresión de los antígenos flagelares en las bacterias, siendo generalmente reversible, pero en el momento que se expresa un antígeno se realiza la represión del otro ⁽³⁾.

Este sistema está regulado de forma que una recombinasa codificada por el gen *hin*, cataliza la inversión reversible de un fragmento de 993 pb que contiene el promotor del operón *fljBA*. En un sentido el promotor dirige la transcripción de los genes *fljB* y *fljA* (Fig. 1) que codifican para la flagelina de segunda fase y para un represor del gen *fliC* (que codifica la flagelina de primera clase) respectivamente. En este caso se expresará el antígeno H de segunda fase. Cuando el fragmento se invierte, los genes *fljA* y *fljB* no se expresan, la expresión de *fliC* no se reprime y la bacteria produce el antígeno flagelar de primera fase ⁽¹⁴⁾.

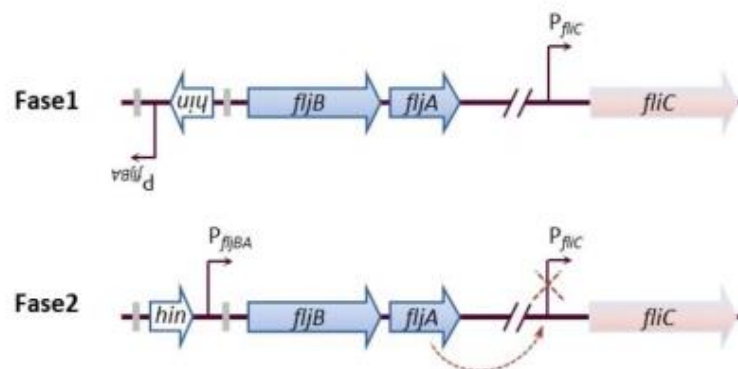


Figura 1. Variación de fase de los flagelos en *Salmonella* según Yamamoto y col., 2006.

Este proceso, proporciona una clara ventaja para las bacterias, ya que los organismos de una determinada población que consigan cambiar de fase durante el proceso de infección

podrán sobrevivir a la respuesta inmune del hospedador ya que, si éste se encuentra produciendo anticuerpos frente a la flagelina de fase 1, aquellas bacterias que cambien de fase y produzcan flagelina de fase 2 podrán escapar a la acción de los anticuerpos específicos frente a la primera ⁽¹⁴⁾.

Las cepas monofásicas no son capaces de expresar los flagelos de segunda fase a diferencia de las bifásicas, ya que su rango principal es la delección del operón responsable de la síntesis de dichos flagelos, el cual se identifica como 1,2 en la fórmula antigénica de *S. Typhimurium* ⁽³⁾.

3.1.3 Antígeno capsular (Vi)

En cuanto al antígeno capsular, el único que se conoce en *Salmonella* es el antígeno Vi, un polisacárido capsular producido por cepas de tres serotipos Typhi, Paratyphi C y Dublin ⁽¹⁶⁾.

3.2 Patogenicidad y virulencia de *Salmonella*

La salmonelosis es causada por toda una serie de serovares no tifoideos, siendo los más relevantes Typhimurium y Enteritidis, seguidos de la variante monofásica *S. 4,[5],12:i:-* ⁽⁵⁾ pudiendo adicionalmente infectar un amplio rango de animales. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas ⁽¹⁷⁾.

El proceso de infección por *Salmonella enterica* se inicia generalmente por la ingestión de agua o productos contaminados. Para la mayoría de los serotipos la dosis infectiva mínima se sitúa alrededor de 10^5 - 10^8 células viables para derivar en la colonización del intestino delgado y grueso. Una vez ingeridas, las bacterias alcanzan el estómago donde se enfrentan al jugo gástrico y a un pH muy ácido, lo que reduce el número de microorganismos viables. Aquellas bacterias capaces de sobrevivir pasarán al intestino donde deberán resistir los ácidos grasos bactericidas producidos por la microbiota del hospedador, la secreción de mucina, y el peristaltismo intestinal que evitarán la colonización ⁽¹⁸⁾. Las bacterias que escapan a la primera línea de defensas intestinales, colonizan el íleon y/o el colon, e invaden el epitelio.

El mecanismo de invasión implica la unión inicial de la bacteria a receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora, seguida por la internalización forzada por la propia bacteria ⁽¹⁹⁾. La invasión depende de la actuación de un sistema de secreción de

tipo III (SST3), codificado por la isla de patogenicidad 1 (SPI1; *Salmonella pathogenicity island 1*). *S. enterica* es la única especie que se conoce que posee dos sistemas de secreción tipo III, codificados por dos islas de patogenicidad distintas (SPI1 y SPI2; *Salmonella pathogenicity island 1* y *Salmonella pathogenicity island 2*). Cada uno de los sistemas parecen jugar papeles diferentes en la patogénesis de *Salmonella*; SPI1 está implicada en la penetración inicial de la bacteria, mientras que SPI2 es importante para los siguientes estadios de la infección ⁽²⁰⁾, a lo que haremos referencia más adelante.

Además, la actuación de este SST3 codificado por la isla de patogenicidad SPI1, inicia la liberación por parte de las células epiteliales, de quimioquinas CXC, como la interleucina 8 (IL8), que ejerce una acción quimiotáctica sobre polimorfonucleares neutrófilos (PMN), importantes agentes defensivos de la respuesta inmune inespecífica del hospedador ⁽²¹⁾.

Una vez invadido el epitelio intestinal, las bacterias se traslocan rápidamente, alcanzando la lámina propia. Aquí, su reconocimiento por receptores localizados tanto en la superficie de macrófagos como en la cara interna de las células intestinales (Fig. 2) origina la producción de más quimioquinas CXC, por ambos tipos de células. Esto provoca la afluencia masiva de PMN, que induce la característica diarrea inflamatoria causada por los serotipos no tifoideos de *S. enterica* ⁽¹⁸⁾.

S. enterica posee la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos, gracias a la actuación de un segundo SST3, codificado por la isla de patogenicidad SPI2, y de otros factores de virulencia. Sin embargo, los macrófagos que han reconocido y fagocitado a las bacterias también liberan interleucina 12 (IL-12), responsable del inicio de la respuesta inmune específica. Esta interleucina actúa sobre los linfocitos T, que a su vez liberan sustancias, como el interferón γ , que activan a macrófagos, adquiriendo éstos la capacidad de destruir a las bacterias que han sobrevivido en su interior ⁽¹⁸⁾.

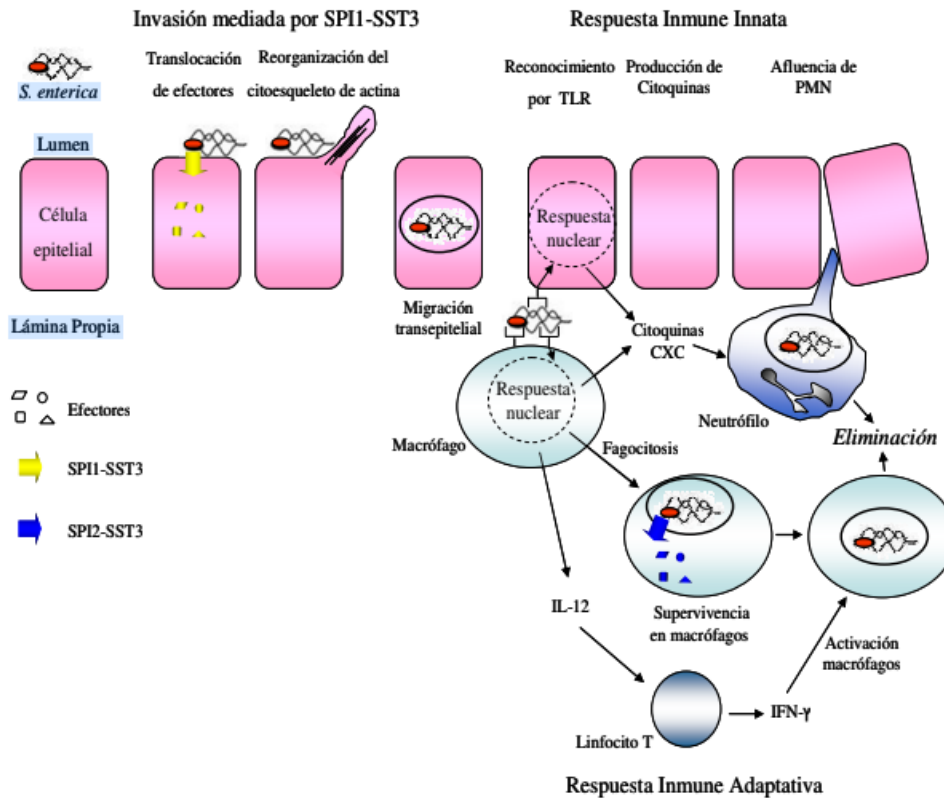


Figura 2: Inducción de enfermedad intestinal por *S. enterica* (Adaptado de Raffatellu y col., 2006).

La aparición de la enfermedad ocurre de 8 a 72 horas después de la ingesta y el cuadro clínico se inicia con náuseas y vómitos seguidos de dolor abdominal y deposiciones diarreicas, normalmente de moderado volumen y que suelen contener leucocitos PMN en el examen en fresco de las heces ⁽¹⁸⁾. Suele aparecer fiebre en más de la mitad de los casos, pudiendo alcanzarse incluso temperaturas de 38-39 °C. Esta enfermedad normalmente suele desaparecer sin intervención en 2 o 3 días. Las gastroenteritis por salmonelosis no tifoideas no suelen tratarse con antibióticos, excepto en casos de pacientes inmunodeprimidos o en los casos de infecciones extra-intestinales (septicemia, meningitis, etc) ⁽¹⁸⁾.

3.2.1 Factores de virulencia

En el genoma de *S. Typhimurium* existe un elevado número de genes que codifican para factores de virulencia necesarios durante el proceso infeccioso ⁽²²⁾.

Se pueden distinguir dos grupos de factores de virulencia en *S. Typhimurium*. Por un lado, genes que codifican estructuras superficiales de la bacteria, donde se incluyen:

- El LPS, con actividad tóxica, debido fundamentalmente al lípido A

- Los flagelos, que dirigen a la bacteria hacia el epitelio intestinal, mediante quimiotaxis, permiten atravesar la espesa capa de mucina, y contribuyen al proceso de inflamación.
- La cápsula, relacionada con la capacidad invasiva del serotipo Typhi.
- Las fimbrias.
- Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS; *extracellular polymeric substance*), como la celulosa.

Por otro lado, existen genes específicos de virulencia, localizados en el cromosoma o en plásmidos, que codifican factores solubles que modifican la fisiología celular del hospedador o que protegen a la bacteria de sistemas antimicrobianos del mismo. Estos genes pueden estar aislados, formando pequeñas agrupaciones (islotos) y/o en agrupaciones mayores, llamadas islas de patogenicidad (PI) ⁽¹⁰⁾.

3.2.1.1 Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs) son definidas como largas agrupaciones de genes dentro del cromosoma bacteriano, que codifican para determinantes responsables de establecer las interacciones específicas con el hospedador y que son necesarios para la expresión de la virulencia bacteriana en un modelo animal ⁽²³⁾.

Han sido identificadas un total de cinco islas de patogenicidad. En concreto, SPI-1 es activa cuando la bacteria es extracelular, ya que contiene genes para la invasión de células no fagocíticas del hospedador y es necesaria para que se produzca la infección intestinal. SPI-2 se relaciona con la capacidad de las bacterias de sobrevivir en el interior de los macrófagos, y de este modo colonizar los tejidos internos, siendo necesaria para crear un nicho intracelular estable y permisivo, denominado *Salmonella-containing vacuoles* (SCV) y, por lo tanto, se requiere para la patogénesis intracelular ^{(24) (25)}.

Tanto SPI-1 como SPI-2 codifican sistemas de secreción de proteínas tipo III, sin embargo, no son iguales los sistemas ni tampoco lo son los productos que traslocan de un lado a otro de la membrana ^{(24) (25)}.

Es posible que muchos de los genes codificados por las islas SPI-3, SPI-4 y SPI-5 estén relacionados con las anteriores, ya que, si son desactivados, *S. Typhimurium* podría perder varias de sus características virulentas y esto podría relacionarse con la pérdida de selectividad en sus hospedadores dentro de estos serotipos ⁽²²⁾.

3.2.1.2 Plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos extra-cromosómicos que tienen la capacidad de replicarse de forma autónoma. Codifican funciones de resistencia a antimicrobianos, y virulencia, entre otros. A pesar de no ser esenciales para la célula, aportan una ventaja selectiva en determinados ambientes ⁽²⁶⁾.

pSLT es un plásmido presente exclusivamente en *S. Typhimurium* con un tamaño de 94 kb. Presenta una región de 8 kb altamente conservada, denominada *spv* (*Salmonella plasmid virulence*), formada por cinco genes, designados *spvRABCD*, que juega un papel clave en la patogenicidad, ya que se ha observado que la incorporación de *spvRABCD* en cepas que han perdido el plásmido pSLT restaura su capacidad virulenta ⁽²³⁾.

3.3 Biofilm

3.3.1 Generalidades

Las bacterias pueden encontrarse en dos posibles estados: planctónico (en suspensión) o adheridas a la superficie formando biofilms. El 99 % de todas las células bacterianas existen en forma de biofilms, de hecho constituyen el estado habitual de las bacterias en la mayoría de los ecosistemas naturales ⁽²⁷⁾, mientras que sólo 1 % vive en estado planctónico ⁽²⁸⁾. El 80 % de todas las infecciones bacterianas están relacionadas con biofilms ⁽²⁹⁾.

Los biofilms o biopelículas se definen como comunidades de células bacterianas estructuradas, encapsuladas en una matriz polimérica auto-producida que se pueden adherir de manera irreversible a superficies inertes o vivas, o entre ellas mismas, y que pueden estar constituidas por una única especie o un gran abanico de especies microbianas diferentes ⁽²²⁾.

La formación de dichos biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en su interior ofrece ventajas importantes: protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilita el aprovechamiento del agua reduciendo por tanto la posibilidad de deshidratación y posibilita la transferencia de material genético ⁽³⁰⁾. Todo ello conlleva a un aumento de la capacidad de supervivencia de las bacterias, ya que los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos a menudo son ineficaces contra las bacterias del biofilm ⁽³⁰⁾.

3.3.2 Composición del biofilm

El componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97 % del contenido total. Además del agua y de las células bacterianas, la matriz extracelular del biofilm donde se encuentran dichas células, es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos conocidos como *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) ⁽³¹⁾, siendo el más común la celulosa, y en menor medida por otras macromoléculas como proteínas, ADN y diversos productos procedentes de la lisis bacteriana ⁽³²⁾.

Proceso de formación

Las células inicialmente se unen a superficies bióticas o abióticas de forma reversible mediante interacciones como pueden ser fuerzas electrostáticas débiles, interacciones hidrofóbicas o fuerzas de Van der Waal's. Posteriormente sucede la modificación de la expresión génica y comienza el crecimiento del biofilm, con una unión irreversible de las células mediante estructuras de unión hidrofóbica como fimbrias, flagelos, proteínas de adhesión y/o lipopolisacáridos ⁽³³⁾.

El proceso de formación de biofilms depende de las interacciones entre las células bacterianas (forma microbiana, composición molecular, presencia de flagelos, fimbrias, cápsula o EPS), la superficie de unión (química, topográfica y fisicoquímica) y las condiciones ambientales (pH, disponibilidad de nutrientes, temperatura, tensión de oxígeno, osmolaridad y niveles de hierro) ⁽³⁴⁾. La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en la capacidad de formar biofilms.

Este proceso está altamente controlado y regulado a nivel genético y por señales ambientales, que veremos a continuación. Pero debemos destacar que en los biofilms las bacterias viven, cooperan y se comunican a través de señales *quorum sensing* (QS) que regulan la expresión de genes de manera diferente en las distintas partes de la comunidad ⁽²⁷⁾.

El QS por lo tanto es un mecanismo de comunicación entre células mediante el cual las bacterias son capaces de saber cuántas son a través de la producción y detección de la acumulación de una molécula de señalización, denominada autoinductor, que secretan a su entorno y así pueden conocer el momento en el que deben actuar para desarrollar sus funciones de la forma más eficaz. En bacterias Gram negativas el principal autoinductor es la acil-homoserina lactona. Cuando en el medio extracelular se acumula una cantidad suficiente

del autoinductor, se induce la expresión de una serie de genes que genera un cambio coordinado en el comportamiento del grupo bacteriano ⁽²⁷⁾.

3.3.3 Biofilms en *Salmonella*

Las características generales de la formación de biofilm se aplican a todos los microorganismos, incluido el género *Salmonella*. Esta bacteria tiene un ciclo de vida en el cual la colonización se alterna con periodos de supervivencia fuera del huésped ⁽³⁵⁾. Por lo tanto, para sobrevivir en este entorno han desarrollado varios mecanismos, incluyendo la adherencia a superficies y la formación de biofilms ⁽²²⁾.

Varios informes han demostrado la habilidad de las cepas de *Salmonella* para formar biofilms tanto en superficies abióticas (plástico, cemento, vidrio, caucho y acero inoxidable, las cuales se encuentran comúnmente en granjas, mataderos, cocinas, industrias procesadoras de alimentos y aseos), como en superficies bióticas (superficies de plantas, células epiteliales y cálculos biliares) ⁽²²⁾. Esta capacidad de formar biofilms supone un importante riesgo para la salud pública.

La formación de biofilms en *Salmonella* está asociada con una variedad de genes y operones como: *bcsABZC-bcsEFG*, *csgBAC-csgDEFG*, *bapBCD*, *yihU-yshA* e *yihVW* ⁽²²⁾ que estudiaremos posteriormente.

3.3.3.1 Principales constituyentes de la matriz extracelular de biofilm en *Salmonella*

Los principales constituyentes de la matriz extracelular del biofilm de *Salmonella* son la celulosa, fimbrias agregantes delgadas (también denominadas curli o Tafi), proteínas asociadas al biofilm (Bap), LPS y ADN extracelular ⁽³⁶⁾.

- La celulosa (polímero β -1-4-D-glucosa), es una importante EPS que se entreteje con otros componentes extracelulares formando estructuras tridimensionales, para conferir adhesión a las superficies y promover las interacciones célula-célula y proteger las células del entorno desfavorable. Su síntesis requiere genes codificados en los operones *bcsABZC-bcsEFG* ⁽¹²⁾.
- Las fimbrias curli o tafi, son estructuras proteicas de tipo amiloide, están codificadas por los operones *csgBAC-csgDEFG* y están involucradas en la adhesión superficial,

agregación celular, persistencia en el medio ambiente, producción de biofilms, y en la adhesión e invasión de la célula huésped ⁽³⁷⁾.

- La proteína BapA es esencial para la agregación bacteriana y la posterior formación del biofilm en la interfaz aire/líquido en medio LB (*Luria-Bertani*) ⁽³⁸⁾. Está codificada por *bapA* y es secretada a la superficie celular por un sistema de secreción de tipo I genéticamente ligado al operón *bapABCD* ⁽³⁶⁾.

Las estructuras más estudiadas son las fimbrias curli y la celulosa. Estas estructuras son además los componentes más importantes en el morfotipo RDAR (*red, dry and rough*) formado durante el crecimiento en placas de agar que contienen el colorante rojo congo (CR, *congo red*). Este morfotipo está relacionado con el comportamiento multicelular y por lo tanto con la capacidad de formación de biofilm ⁽³⁹⁾, suele expresarse únicamente en condiciones ambientales específicas, temperatura inferior a 30 °C y en placas de agar que contienen el colorante CR en un medio rico pero sin sal o a una temperatura de 37 °C en el caso de medios empobrecidos en hierro ⁽²²⁾.

3.3.3.2 Regulación de la formación de biofilms en *Salmonella*

Como hemos mencionado anteriormente, el proceso de formación de biofilm está regulado por diversos factores ambientales como temperatura, pH, nutrientes e inanición, tensión de oxígeno, osmolaridad y niveles de hierro ⁽³⁴⁾.

Numerosos estudios han revelado que múltiples reguladores transcripcionales a través de diferentes mecanismos moleculares transducen señales desde el medio ambiente extracelular a un regulador transcripcional de la superfamilia LuxR, CsgD (anteriormente conocido como AgfD (*thin aggregative fimbriae gene D*)) ⁽⁴⁰⁾ ⁽²²⁾ codificado en el gen *csgD* (*curli subunit gene D*) ⁽⁴¹⁾, que constituye el principal regulador de este proceso ya que activa la síntesis de biofilm mediante la producción de curli y celulosa ⁽⁴¹⁾ (Fig. 3).

Por lo tanto, CsgD regula la producción de curli mediante su unión en estado no fosforilado al promotor del operon *csgBAC* ⁽⁴²⁾, que codifica la subunidad mayor CsgA así como la proteína CsgB. También regula la síntesis de celulosa, mediante el control de la expresión de la diguanilato ciclasa AdrA que cataliza la síntesis de diguanosil monofosfato cíclico (c-di-GMP). A nivel post-transcripcional, c-di-GMP controla la actividad de varias sintetasas de celulosa incluyendo BcsA ⁽⁴³⁾.

La síntesis de c-di-GMP se produce a través de las enzimas diguanilato ciclasa (DGC), que contienen el dominio GGDEF, mientras que la degradación se produce a través de las enzimas fosfodiesterasas (PDE) con dominios EAL o HD-GYP ⁽⁴⁴⁾. La delección de las DGC, elimina completamente la formación de biofilm, sugiriendo que el c-di-GMP es esencial para este proceso bacteriano ⁽⁴⁵⁾.

La expresión del gen *bapA*, parte del operon *bapABCD* responsable de la síntesis y exportación de BapA, también está regulada por CsgD ⁽²²⁾.

Interacción de CsgD y otros reguladores de la formación de biofilm en *Salmonella*

La región intergénica entre los operones *csgBAC* y *csgDEFG*, actúa como un centro para integrar distintas señales ambientales proporcionando sitios de unión con múltiples factores de transcripción como OmpR, IHF, H-NS, RpoS y MlrA ⁽²²⁾ ⁽⁴¹⁾.

- OmpR, es una proteína reguladora del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR, es fosforilada en respuesta a estímulos ambientales como la osmolaridad y el pH y se une al promotor de *csgD* para estimular su expresión ⁽⁴⁶⁾.
- IHF es una proteína que se une a secuencias del promotor *csgD* promoviendo su activación y/o represión ⁽⁴⁷⁾.
- H-NS, es una proteína estructural del ADN que responde a una amplia gama de estímulos ambientales y se une preferentemente a sitios ricos en A-T en la región intergénica *csgBAC*- *csgDEFG* y tiene efectos sobre la expresión de *csgD* ⁽⁴¹⁾.
- MlrA, actúa específicamente sobre la transcripción del operón *csgDEFG* en respuesta a iones metálicos. Su expresión está regulada por RpoS, y se une aguas arriba del promotor *csgD* e induce la transcripción del gen *csgD* ⁽⁴⁸⁾.
- Al entrar en fase estacionaria de crecimiento, RpoS se une a la ARN polimerasa iniciando la transcripción del gen *csgD* ⁽⁴⁹⁾. La actividad del complejo RpoS-ARN polimerasa se ve favorecida por una proteína de unión al ADN conocida como Crl, la cual también se acumula en fase estacionaria. Crl es más estable a bajas temperaturas (28 °C) que a altas temperaturas (37 °C), por ello *Salmonella* forma biofilms a 28 °C, indicando que Crl sirve como un sensor de temperatura en dicha formación ⁽²²⁾.

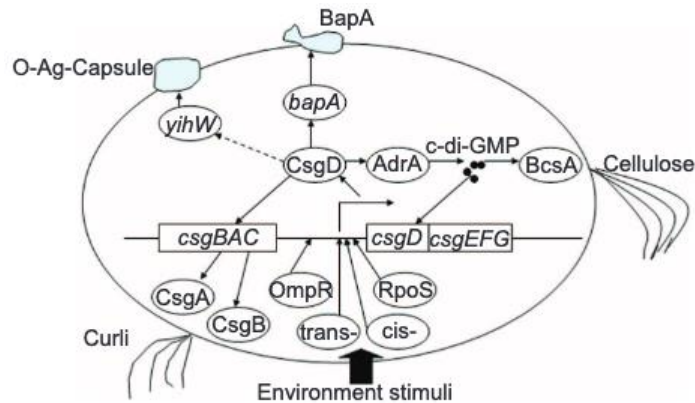


Figura 3: Regulación de la formación de biofilm de *Salmonella* por CsgD. Estímulos ambientales como temperatura, nutrientes, oxígeno, osmolaridad, y pH también intervienen en la formación de biofilm y su composición (Liu y col., 2014).

3.3.4 Evaluación de la capacidad de formación de biofilms por *Salmonella*

La formación de biofilms es importante tanto para la supervivencia como para la dispersión de *Salmonella* ya que es resistente a desinfectantes, estrés medioambiental y al sistema inmune del hospedador. Además, la dispersión de las bacterias en el medio ambiente por la rotura de estas estructuras marca la etapa final del ciclo de vida del biofilm contribuyendo a la dispersión biológica, supervivencia bacteriana y dispersión de la enfermedad ⁽¹²⁾. Por lo tanto, esto supone un gran problema de salud pública, por lo que será necesario evaluar la capacidad que posee *Salmonella* para formar estos biofilms, para posteriormente poder desarrollar estrategias eficaces para evitar su formación ⁽⁵¹⁾.

Numerosos estudios han demostrado que *Salmonella* puede adherirse sobre alimentos y superficies presentes en la industria alimentaria. Una vez adherida, *Salmonella* puede producir fimbrias curli y celulosa, siendo éstas indicadores significativos de la formación de biofilms ⁽²²⁾.

Para evaluar la formación de biofilms de las cepas de *Salmonella* existen diferentes metodologías y el uso de cada una de ellas nos permite poner de manifiesto qué estructuras están implicadas en dicho proceso. En este trabajo han sido seleccionadas las técnicas más referenciadas en la bibliografía las cuales serán descritas a continuación.

3.3.4.1 Clasificación de morfotipos

Para estudiar la producción de curli y celulosa de las cepas de *Salmonella* se sigue la metodología descrita por Romling y col., 2003 ⁽⁴⁰⁾. Las bacterias se siembran sobre placas de agar LB (Luria-Bertani) sin NaCl suplementado con el colorante Rojo Congo por su gran afinidad por la celulosa y las fimbrias curli, las cuales se asocian a la producción de biofilm ⁽²²⁾. Posteriormente la producción de fimbrias curli y celulosa se evalúa mediante fluorescencia bajo luz UV (366 nm) y se realiza un registro fotográfico de la morfología de las colonias de *Salmonella* en presencia del colorante. La clasificación se realiza según Romling y col., 2000 ⁽⁵²⁾:

- RDAR: fenotipo rojo, seco y rugoso. Expresa curli y celulosa.
- PDAR: fenotipo rosa y liso. Expresa celulosa pero no curli.
- BDAR: fenotipo marrón, seco y rugoso. Expresa curli pero no celulosa.
- SAW: fenotipo blanco y suave. No expresa curli ni celulosa.

Se ha demostrado que el fenotipo RDAR aumenta la resistencia de *Salmonella* a la desecación, ya que logran sobrevivir durante varios meses en ausencia de nutrientes en comparación con los mutantes deficientes en fimbrias curli y/o celulosa ⁽⁵³⁾. Además, la celulosa confiere mayor resistencia al tratamiento con hipoclorito de sodio.

En este sentido, la determinación del morfotipo RDAR debe complementarse con el estudio de unión de la celulosa a calcofluor que permite determinar más específicamente la producción de celulosa. En algunos casos la biosíntesis de celulosa es independiente (parcialmente) de la expresión del gen *csgD* que regula la expresión de curli y celulosa pudiendo encontrarse colonias SAW fluorescentes con calcofluor ⁽⁵⁴⁾.

3.3.4.2 Determinación de la producción de celulosa en calcofluor

Para determinar cualitativamente la producción de celulosa presente en la matriz del biofilm de *Salmonella* se puede utilizar la técnica descrita por Zogaj y col., 2001 ⁽⁵⁵⁾. Las cepas de *Salmonella* se incuban sobre placas Petri que contienen agar LB sin NaCl suplementado con calcofluor.

El calcofluor es un fluoruro que se une a las fibras de celulosa y por lo tanto puede usarse para determinar la presencia de este polisacárido en la matriz de los biofilms de *Salmonella*.

La producción de celulosa se evalúa mediante la comparación de fluorescencia de las cepas de *Salmonella* bajo luz UV (366 nm) y se realiza un registro fotográfico, clasificándose de la misma manera que en el apartado anterior.

3.3.4.3 Capacidad de formación de biofilm en microplacas de poliestireno en distintas condiciones de crecimiento

El objetivo de esta técnica consiste en determinar la capacidad de formación de biofilms de los distintos serotipos de *Salmonella* en distintas condiciones de crecimiento sobre microplacas de poliestireno. Para cuantificar dicha formación se usa la técnica de tinción con cristal violeta y posteriormente se realiza un análisis mediante espectrofotometría. Es una metodología ampliamente utilizada, ya que permite realizar un análisis simple y rápido de la capacidad de formación de biofilm en una amplia variedad de condiciones de cultivo ⁽⁵³⁾, permitiendo variar la temperatura, el tiempo de incubación y la concentración del medio de cultivo.

La temperatura tiene una gran influencia sobre la formación de biofilms por ello se suelen seleccionar tres o cuatro temperaturas para evaluar el efecto de dicha temperatura sobre la formación de biofilms de *Salmonella*: 37 °C es la temperatura óptima de crecimiento de *Salmonella* ⁽²²⁾, 28 °C es la temperatura óptima para la expresión de los componentes de la matriz extracelular ⁽²²⁾ y 20 °C es una temperatura que podría representar el ambiente en granjas avícolas.

Se ha demostrado que la expresión de fimbrias curli y celulosa en *S. Typhimurium* es dependiente de la temperatura, produciéndose a temperaturas inferiores a 30 °C (especialmente entre 25 °C y 28 °C), pero no a 37 °C ⁽⁵⁷⁾. Esta característica podría explicar el hecho de que algunas cepas no produzcan biofilm a 37 °C pero adquieran esa capacidad a 28 °C.

La variación en el tiempo de incubación también influye en la formación de biofilms, ya que en la fase estacionaria de crecimiento, la disminución del nitrógeno y del fósforo inducen la expresión de *csgD* y por lo tanto la formación de biofilm ⁽⁵⁷⁾. Esto podría explicar que la formación de biofilm sea mayor a las 48 horas que a las 24 horas y en condiciones de menor disponibilidad de nutrientes.

La composición del medio de cultivo en el cual crecen las bacterias también posee una gran influencia sobre la formación de biofilms de *Salmonella* ⁽⁵⁸⁾. La formación y adherencia del biofilm no ocurre por el mismo mecanismo en los diferentes medios, ya que las cepas usan distintas estrategias y expresan diferentes genes promotores de biofilm en función de los recursos ambientales disponibles ⁽⁵⁸⁾. Esto implica que las condiciones ambientales, definen el tipo de biofilm que forma *Salmonella*. El biofilm formado se cuantifica mediante diferentes técnicas, a continuación, estudiaremos las más frecuentes:

Cuantificación por tinción con cristal violeta

La formación de biofilms se cuantifica mediante tinción con cristal violeta, un colorante básico que se une a moléculas cargadas negativamente, tiñendo tanto a las bacterias adheridas a la placa como a la matriz extracelular. Como control negativo se usa un medio sin inocular con *Salmonella* en las mismas condiciones ensayadas. Para poder clasificar las cepas de *Salmonella* se usa el criterio descrito por Stepanovic y col., 2004 ⁽⁵⁹⁾ basado en la medida de la densidad óptica (DO) mediante espectrofotometría a 595 nm (aunque varía según los autores) donde el valor de la densidad óptica de corte (DOcorte) a 595 nm se definió como 3 desviaciones estándar por encima del promedio de DO control negativo (medio sin inocular). Según este criterio, las cepas se clasifican como:

Tabla 2. Clasificación de las cepas de *Salmonella*, según su capacidad de formación de biofilms, tras su tinción con cristal violeta mediante la medida de su densidad óptica por espectrofotometría.

Valor de DO	Formación de biofilm
$DO \leq DO_{\text{corte}}$	NO FORMA
$DO_{\text{corte}} < DO \leq 2 \times DO_{\text{corte}}$	DÉBIL
$2 \times DO_{\text{corte}} < DO \leq 4 \times DO_{\text{corte}}$	MODERADA
$4 \times DO_{\text{corte}} < DO$	FUERTE

Entre las ventajas que presenta este método podemos destacar su versatilidad, al poder ser utilizado con gran número de microorganismos y el alto rendimiento, que permite la combinación de muchas condiciones diferentes simultáneamente.

Entre sus limitaciones hay que recalcar que, debido a la naturaleza inespecífica del cristal violeta, esta prueba es incapaz de diferenciar entre microorganismos cuando las comunidades son polimicrobianas. Otro inconveniente es la falta de reproducibilidad, y a pesar de tener un uso generalizado, hay una amplia variedad de protocolos de tinción que dificulta la comparación de resultados entre los distintos estudios ⁽⁶⁰⁾.

Cuantificación por recuento en placa

El biofilm de *Salmonella* desarrollado en placas de poliestireno también puede ser cuantificado mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Esta técnica es la más usada para determinar la viabilidad celular ⁽⁶⁰⁾.

3.3.4.4 Capacidad de formación de biofilms sobre distintas superficies

En la industria alimentaria, *Salmonella* puede formar biofilms y persistir frente a los distintos métodos de limpieza y desinfección de las distintas superficies, generando contaminación. El vidrio y el acero inoxidable son considerados materiales hidrófilos mientras que el plástico (poliestireno) es hidrófobo ⁽⁶¹⁾.

Para evaluar la interacción de las cepas de *Salmonella* sobre distintas superficies se evalúa la formación de biofilm sobre placas de vidrio y acero inoxidable ya que por ejemplo el acero inoxidable es la superficie más usada para el procesamiento de animales ⁽⁶²⁾ y se compara con los resultados obtenidos en el apartado anterior, ya que los materiales plásticos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria.

El biofilm formado sobre un medio de crecimiento LB se cuantifica por tinción con cristal violeta y posterior medida de la densidad óptica (DO) mediante espectrofotometría a 595 nm al igual que en el apartado anterior. Se aplican distintas condiciones de temperatura de incubación, pH y concentración de NaCl. Como control se usa medio LB sin inocular.

Dantas y col., 2018 ⁽⁶³⁾ y Steenackers y col., 2012 ⁽²²⁾ han demostrado que la formación de biofilms de *Salmonella* es mayor en superficies hidrófobas (placas de poliestireno) que en superficies hidrófilas.

3.3.4.5 Formación de biofilms en la superficie aire-liquido en tubo

La formación de biofilm se puede detectar por la capacidad de formar un película flotante en la interfaz aire-liquido, ya que *Salmonella* según las condiciones medioambientales puede formar un biofilm en el fondo del pocillo o en la parte superior del mismo, en la interfaz aire-líquido. Este proceso requiere la expresión de fimbrias curli ⁽²²⁾, celulosa ⁽²²⁾ y la secreción de proteína BapA ⁽³⁶⁾.

Para estudiar la capacidad de formación de biofilms puede realizarse en un medio ATM (medio deficiente en nutrientes) y 37 °C o en un medio LB (rico en nutrientes) y a temperatura ambiente. Posteriormente se recoge una parte de la colonia y se tiñe con cristal violeta para posteriormente visualizarla al microscopio óptico (100X) observándose así los distintos morfotipos previamente descritos en el apartado 3.3.4.1.

4 CONCLUSIONES

- Los serotipos más frecuentes de *Salmonella* que generan salmonelosis en humanos son *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y en algunos estudios la variante monofásica *S. 4,[5],12:i:-*. El conocimiento detallado sobre cómo se forman y se dispersan los biofilms de esta variante monofásica podría permitir el diseño de estrategias de prevención para evitar la contaminación microbiana por esta variante y controlar el consiguiente problema de salud pública.
- El estudio de la capacidad de formación de biofilms de *Salmonella* en microplacas de poliestireno en distintas condiciones de crecimiento es la técnica más descrita en la literatura, ya que permite cuantificar rápidamente la capacidad que posee un microorganismo de formar biofilm en una amplia variedad de condiciones cultivo, habida cuenta que la formación y adherencia del biofilm no ocurre por el mismo mecanismo en los diferentes medios. Las cepas utilizan diferentes estrategias y expresan diferentes genes promotores de biofilm en función de los recursos ambientales disponibles.
- La formación de biofilms de *Salmonella* en superficies de contacto con alimentos es una de las mayores preocupaciones en seguridad alimentaria debido a la contaminación cruzada que generan de la formación de biofilms. Los distintos materiales pueden tener diferente impacto sobre la adhesión y posterior formación de biofilm de *Salmonella*. De este modo, la relación entre las propiedades de superficie de las bacterias y la producción de biofilm debe ser analizada caso por caso.

5 BIBLIOGRAFÍA

1. Guibourdenche PR, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont P, Weill F-X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-LeMinor scheme. 2010; 161 (1): 26-29.
2. Grimont PAD, Weill FXL. 2007. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, France.
3. Laorden L. Caracterización molecular y epidemiológica de cepas monofásicas de *Salmonella enterica* [tesis]. Vitoria-Gasteiz: Universidad del País Vasco; 2014.
4. Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. Immunol Cell Biol. 2007; 85 (2): 112–118.
5. EFSA; ECDC The European Union one health 2018 zoonoses report [Internet]. *EFSA J*; [consulta 15/10/2020 Disponible en <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5926>
6. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesús J, Platt DJ, Olsen JE. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiol Infect. 2000; 125 (2): 229-255.
7. Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA. Fast-Track communications emergence and of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. J Clin Microbiol. 1999; 37 (10): 3425.
8. Echeita MA, Herrera S, Usera MA. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. J Clin Microbiol. 2001; 39 (8): 2981–2983.
9. Gordon MA. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. J Infect. 2008; 56 (6): 413–422.
10. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 2006; 17 (1): 14–56.
11. Crawford RW, Reeve KE, Gunn JS. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. J Bacteriol. 2010; 192 (12): 2981-2990.
12. Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. Mol Microbiol. 2002; 43 (3): 793–808.
13. Mejía WJ. Epidemiología de la salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección [tesis]. Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona; 2003.

14. Herrera-León S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. J Clin Microbiol. 2004; 42 (6): 2581-2586.
15. Yamamoto S, Kutsukake K. *FliA*-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. J Clin Microbiol. 2006; 188 (3): 958-967.
16. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tükel C, Akçelik M, Bäumler AJ. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. Infect Immun. 2006; 74 (1): 19-27.
17. Parra M, Durango J, Máttar S. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ Córdoba. 2002; 7 (2): 187-200.
18. Martínez Álvarez N. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica* [tesis]. Oviedo. Universidad de Oviedo; 2007.
19. Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. Mol Microbiol. 2000; 36 (5): 997-1005.
20. Hueck CJ Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62 (2): 379-433.
21. Tükel C, Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Akçelik M, Bäumler AJ. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat?. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 46 (3): 320-329.
22. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Res Int. 2012; 45 (2): 502-531.
23. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect. 2000; 2 (2): 145–156.
24. Marlovits TC, Stebbins CE, Type III secretion systems shape up as they ship out. Curr Opin Microbiol. 2010; 13 (1): 47–52.
25. Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. Mol Microbiol. 1998; 30 (1): 175–188.
26. Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet Res. 2001; 32 (3): 243-259.
27. Trujillo M. Biofilms microbianos [trabajo de fin de grado]. San Cristóbal de La Laguna: Universidad de La Laguna, Facultad de ciencias; 2017 [acceso, 30/10/2020]. Disponible en: <https://docplayer.es/60833527-Microbial-biofilms-biofilms-microbianos-trabajo-de-fin-de-grado-melania-trujillo-garcia-trabajo-tutorizado-por-angel-m.html>

28. Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 2005; 115 (4): 578-582.
29. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*. 2009; 11 (7): 1034–1043.
30. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8 (9): 881-890.
31. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reding)*. 2001; 147 (1): 3-9.
32. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005; 13 (1): 20-26.
33. Phillips CA. Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *Int J Food Sci Technol*. 2016; 51 (8): 1731-1743.
34. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol*. 2010; 109 (4): 1117-1131.
35. Winfield MD, Groisman EA. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(7): 3687–3694.
36. Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penadés JR, Lasa I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol*. 2005; 58 (5): 1322–1339.
37. Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*. 2006; 60: 131–147.
38. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001; 183 (9): 2888–2896.
39. Römling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol*. 1998; 180 (3): 722–731.
40. Römling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz, M, Tschäpe H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int J Food Sci Technol*. 2003; 293 (4): 273–285.
41. Gerstel U, Park C, Römling U. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol Microbiol*. 2003; 49 (3): 639–654.
42. Hamilton S, Bongaerts RJM, Mulholland F, Cochrane B, Porter J, Lucchini S, Hinton JC. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics*. 2009; 10 (11): 599.

43. Zorraquino V, García B, Latasa C, Echeverz M, Toledo-Arana A, Valle J, Solano C. Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through *YcgR* and cellulose. *J Bacteriol.* 2013; 195 (3): 417–428.
44. Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol.* 2013; 187 (14): 4774–4781.
45. Solano C, García B, Latasa C, Toledo-Arana A, Zorraquino V, Valle J, Lasa I. Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (19): 7997–8002.
46. Gerstel U, Kolb A, Römling U. Regulatory components at the *csgD* promoter - additional roles for OmpR and integration host factor and role of the 5' untranslated region. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 261 (1): 109–117.
47. Dillon SC, Dorman CJ. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(3): 185–195.
48. Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev.* 2003; 27 (2): 145–163.
49. Hengge-Aronis R. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective?. *Cur Opin in Microbiol.* 2002; 5 (6): 591–595.
50. Liu Z, Niu H, Wu S, Huang R. CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerg Microbes Infect.* 2014; 3 (1): 1-4.
51. Borges KA, Furian TQ, de Souza SN, Menezes R, de Lima DA, Fortes FBB, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity. *Microb Pathog.* 2018; 118: 238-241.
52. Römling U, Rohde M, Olsén A, Normark S, Reinköster J. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* typhimurium regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol.* 2000; 36 (1):10–23.
53. White AP, Gibson DL, Kim W, Kay WW, Surette MG. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J Bacteriol.* 2006; 188 (9): 3219-3227.
54. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: Critical role of cellulose. *Mol Microbiol.* 2006; 43 (3): 793–808.
55. Zogaj X, Nitz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia Coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol.* 2001; 39 (6): 1452-1463.

56. Agarwal RK, Singh S, Bhilegaonkar KN, Singh VP. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *Int J Food Sci Technol*. 2001; 18 (4): 1493-1498.
57. Gerstel U, Römling, U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Res Microbiol*. 2003; 154 (10): 659-667.
58. Speranza B, Corbo MR, Sinigaglia M. Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* spp. biofilm formation. *J Food Sci*. 2011; 76 (1): 12-16.
59. Stepanovic S, Cirkovi I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*. 2004; 38 (5): 428-432.
60. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Di Bonaventura G, Hébraud M, Jaglic Z *et al.*, Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*. 2017; 43 (3): 313-351.
61. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15 (2): 167-193.
62. Pompermayer DM, Gaylarde CC. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol*. 2000; 17 (4): 361-365.
63. Dantas ST, Rossi BF, Bonsaglia EC, Castilho IG, Hernandez RT, Fernandes A, Rall VL. Cross-Contamination and biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on various cutting boards. *Foodborne Pathog Dis*. 2018; 15 (2): 81-85.