



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Magíster Ciencias Veterinarias con Mención en Calidad e Inocuidad de
Alimentos de Origen Animal



**Internalización de bacterias asociadas a enfermedades de
transmisión alimentaria en *Candida albicans* y levaduras
aisladas desde alimentos**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Veterinarias con
Mención en Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal

SUSANA PAOLA CASTRO SERICHE
CHILLÁN-CHILE
2020

Profesora Guía: Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesora Guía

Dra. Apolinaria García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora

Dra. Sandra Quilodrán Vega
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Pedro Aqueveque Muñoz
Facultad de Ingeniería Agrícola
Universidad de Concepción

Directora de Programa

Dra. Juana López Martín
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción



TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO	PÁGINA
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Resumen.....	ix
Summary.....	x
Introducción	1
1. <i>L. monocytogenes</i>	3
2. <i>S. enterica</i>	4
3. <i>S. aureus</i>	5
4. <i>E. coli</i>	6
5. Resistencia de los microorganismos a condiciones adversas.....	7
6. Interacción entre bacterias y células eucariotas.....	8
7. Levaduras en alimentos.....	10
7.1 Levaduras en productos lácteos.....	10
7.2 Levaduras en frutas y verduras.....	11
7.3 Levaduras en carnes.....	11
Hipótesis y objetivos	13

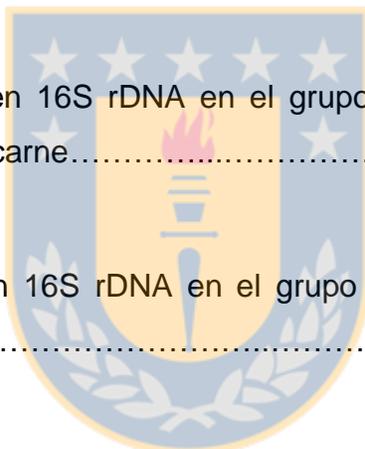
Material y Método	14
1. Co-cultivo bacterias-levaduras.....	14
2. Observación de células bacterianas (CB) dentro de levaduras por microscopía óptica, microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión.....	15
3. Detección del ADN de las células bacterianas contenidas en <i>C. albicans</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
4. Muestras de alimentos.....	17
5. Recuperación de levaduras a partir de muestras de alimentos.....	18
6. Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) de la región del espaciador transcrito interno (ITS) en 5,8S ADNr para tipificar levaduras.....	18
7. Identificación del gen 16S rDNA y genes para <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enterica</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. aureus</i> en levaduras de alimentos.....	19
8. Análisis Estadístico.....	19
Resultados	20
1. Presencia de células bacterianas (CB) dentro de <i>C. albicans</i>	20
2. Detección de genes bacterianos a partir del ADN total de <i>C. albicans</i>	21
3. Viabilidad y movimiento de las CB en las células de <i>C. albicans</i>	22
4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. albicans</i> y del co-cultivo de ambas cepas.....	24
5. Recuperación de levaduras provenientes de muestras de alimentos.....	26

6. Detección de la presencia del gen 16S rDNA a partir del ADN total de las levaduras aisladas de alimentos.....	26
7. Identificación molecular de las levaduras.....	28
Discusión	34
Conclusiones	41
Proyección	41
Bibliografía	42



ÍNDICE DE TABLAS

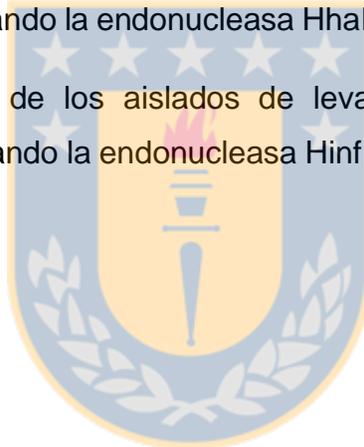
	PÁGINA
Tabla 1. Partidores que se utilizaron en este estudio.....	17
Tabla 2. Clasificación de 36 aislados de levaduras de alimentos de acuerdo con su patrón de PCR-RFLP.....	31
Tabla 3. Frecuencia del gen 16S rDNA en el grupo de 21 aislados de levaduras de frutas, verduras y miel.....	32
Tabla 4. Frecuencia del gen 16S rDNA en el grupo de 6 aislados de levaduras de embutidos de carne.....	33
Tabla 5. Frecuencia de gen 16S rDNA en el grupo de 9 aislados de levadura de lácteos.....	33



ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Observación de CB dentro de la vacuola de <i>C. albicans</i> . Las flechas señalan las CB en los diferentes co-cultivos.....	20
Figura 2. Observación de varias CB en la vacuola de <i>C. albicans</i> post resiembra en agar GYC.....	21
Figura 3. Electroforesis para la resiembra 14° del co-cultivo de <i>C. albicans</i> y <i>L. monocytogenes</i>	22
Figura 4. Electroforesis para la resiembra 14° del co-cultivo de <i>C. albicans</i> y <i>S. enterica</i>	22
Figura 5. Observaciones de microscopía de fluorescencia de CB viables (CB) (fluorescencia verde) dentro de la vacuola (V) de <i>C. albicans</i> para los distintos co-cultivos libre de bacterias extracelulares después de la resiembra 14° en agar GYC.....	23
Figura 6. Observaciones de microscopía de fluorescencia de CB viables (fluorescencia verde) dentro de la vacuola (V) de <i>C. albicans</i> en diferentes intervalos de tiempo.....	24

Figura 7. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de <i>C. albicans</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>C. albicans</i> libre de <i>L. monocytogenes</i> extracelular después de la resiembra 14° en agar GYC.....	25
Figura 8. Electroforesis para el gen 16S rDNA en muestras de alimentos.....	27
Figura 9. Clasificación de aislados de levaduras positivos y negativos al gen 16S rDNA en los tres grupos de alimentos estudiados.....	27
Figura 10. Electroforesis de los aislados de levaduras de alimentos mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa HaEIII.....	28
Figura 11. Electroforesis de de los aislados de levaduras de alimentos mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa HhaI.....	29
Figura 12. Electroforesis de los aislados de levaduras de alimentos mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa HinfI.....	30



RESUMEN

Una nueva forma de transmisión de patógenos relacionados con las enfermedades de transmisión alimentaria podría ser un puntapié inicial para comprender la interacción de bacterias-levadura y ayudar en la prevención de enfermedades. El objetivo general de estudio fue evaluar la internalización de bacterias de transmisión alimentaria en levaduras. Para ello, se trabajó en tres objetivos específicos: 1) Demostrar experimentalmente el ingreso de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Salmonella enterica* en *Candida albicans*, se realizaron co-cultivos y se evaluó *in vitro* la internalización de los patógenos dentro de *C. albicans* mediante microscopía óptica, microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica de transmisión y PCR. 2) Aislar e tipificar levaduras en muestras de alimentos, se aislaron 36 muestras de levaduras presentes en diferentes alimentos en CHROMoagarCandida y luego se tipificaron por PCR-RFLP. 3) Determinar e identificar la presencia de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *S. enterica* en levaduras aisladas a partir de alimentos. Se identificó mediante PCR 16S rDNA la presencia de ADN bacteriano en las levaduras y luego las muestras positivas a este gen se identificaron mediante primers específicos para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *S. enterica*. Los resultados mostraron la presencia y viabilidad de células bacterianas dentro de *C. albicans* por un periodo prolongado de tiempo. Se detectaron mediante PCR de los co-cultivos los genes de *L. monocytogenes* y *S. enterica*. La tipificación mediante PCR-RFLP agrupó en 12 grupos RFLP. Un 33% de los aislados de levaduras fueron positivos al gen 16S rDNA. Éstas se identificaron por PCR 26S rDNA en: *Rhodotorula graminis*, *Clavispora lusitaniae*, *Wickerhamiella sorbophila*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Candida orthopsilosis*. La identificación mediante primers específicos para cada bacteria en las muestras que fueron positivas al gen 16S rDNA no fue posible. Estos resultados entregan nueva información acerca de la interacción de bacterias y levaduras. Se requiere de más investigación para determinar el rol que tienen en la contaminación de alimentos.

SUMMARY

A new way of transmitting pathogens related to food-borne diseases could be an initial step to understand the bacteria-yeast interaction and contribute to diseases prevention. The general objective of the study was to evaluate the internalization of food-borne bacterias in yeast. Consequently, it worked on three specific objectives: 1) Experimentally demonstrate the entry of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Salmonella enterica* within *Candida albicans*, co-cultures were performed and the internalization of pathogens within *C. albicans* was evaluated by light microscopy, fluorescence microscopy, transmission electron microscopy, and PCR. 2) Isolation and molecular identification of yeasts in food samples, 36 samples of yeasts present in different foods were isolated in CHROMoagarCandida and then they were typed by PCR-RFLP. 3) Determine and identify the presence of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157: H7 and *S. enterica* in yeasts isolated from food. The presence of bacterial DNA in yeast was identified by 16S rDNA PCR and then samples positive for this gene were identified using specific primers for *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157: H7 and *S. enterica*. The results showed the presence and viability of bacterial cells within *C. albicans* for an extended period of time. The genes of *L. monocytogenes* and *S. enterica* were detected by co-cultures PCR. PCR-RFLP typing grouped into 12 RFLP groups. 33% of yeast isolates were positive for the 16S rDNA gene. These yeasts were identified as: *Rhodotorula graminis*, *Clavispora lusitaniae*, *Wickerhamiella sorbophila*, *Meyerozyma guilliermondii*, and *Candida orthopsilosis* by 26S rDNA PCR. Identification by specific primers for each bacterium in samples that were positive for the 16S rDNA gene was not possible. These results provide new information about the interaction of bacteria and yeast. More research is required to determine its role in food contamination.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la producción de alimentos ha traído como consecuencia la presentación de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), las cuales corresponden al síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua que contienen agentes bióticos o abióticos en cantidades tales, que afectan la salud del consumidor a nivel individual o de grupos de población (Díaz *et al.*, 2012). Las ETA se pueden manifestar en forma de infecciones alimentarias, intoxicaciones o toxiinfecciones (Ulloa, 2016). Además, éstas pueden ocasionarse por contaminación del alimento en las distintas etapas de la cadena alimentaria (producción, transporte, almacenamiento, elaboración, distribución y consumo) (James *et al.*, 2005).

Se estima que cada año enferman en el mundo 600 millones de personas (1 de cada 10 habitantes) por ingerir alimentos contaminados y que 420.000 mueren por esta misma causa (OMS, 2019). La contaminación de tipo microbiológica es una de las más importantes de evitar durante el proceso de producción del alimento. En Chile, el 97% de los patógenos identificados a partir de muestras clínicas de brotes de ETA corresponden a los agentes bacterianos (Ulloa, 2016).

El año 2017 en Chile se notificaron 1042 brotes de ETA, donde 165 fueron en la región del Biobío (DEIS, 2019). Además, el crecimiento económico y social del país, ha traído un aumento en el comercio internacional de alimentos. Por otra parte, han surgido nuevos hábitos alimenticios en el país debido al aumento de alimentos listos para el consumo y de alimentos crudos, conllevando una mayor preocupación en cuanto al control de agentes bacterianos (ACHIPIA, 2016), si le sumamos la inmigración de personas al país, en conjunto podría contribuir a la aparición de patógenos emergentes y re-emergentes (ACHIPIA, 2016). Según la OMS al año 2015 ya se habían descrito más de 200 ETA y se requiere seguir investigando acerca de la epidemiología de estas enfermedades ya que son una causa importante de morbilidad, mortalidad y retrasan el crecimiento socioeconómico de los países (OMS, 2019). El reglamento sanitario de los alimentos en Chile (RSA)

contiene diferentes categorías de riesgo para clasificar el peligro de un patógeno en distintos alimentos. Un ejemplo de esto son *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* ya que su presencia y/o concentración se considera peligrosa para la salud humana, por lo tanto, no se permite su presencia en los alimentos. Además, otras bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* generalmente son permitidas en baja cantidad, existiendo algunas excepciones como en los alimentos para recién nacidos donde no se aprueba su detección (RSA, 2019). Es por esto, que evaluar los mecanismos que utilizan éstos patógenos para persistir en los alimentos es importante en la salud pública. Adicionalmente, ya está establecido que estas bacterias pueden provocar infecciones de tipo invasivas, es decir, pueden penetrar los tejidos y multiplicarse intracelularmente al infectar a un individuo (Taylor, 2017). *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* spp. pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de células no fagocíticas y fagocíticas, pudiendo infectar diferentes tipos de tejidos (Edwards & Massey, 2011; Graziani *et al.*, 2017; Rees *et al.*, 2017). Por su parte, *E. coli* 0157:H7 es capaz de adherirse a células epiteliales intestinales y secretar toxinas (Shiga toxina) que llegarán al torrente sanguíneo e incluso células endoteliales del riñón (Smith & Fratamico, 2017). También, se ha investigado la invasión de las bacterias mencionadas en amebas de vida libre y existe evidencia de que otras bacterias como *Helicobacter pylori* puede invadir distintas levaduras (Thomas *et al.*, 2010; Salmanian *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay información acerca de que las bacterias como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enterica* o *E. coli* puedan internalizarse en células de levaduras como aquellas que están presentes en los alimentos. En Chile, los mohos y levaduras están permitidos en baja cantidad en distintos alimentos (RSA, 2018), por lo tanto, si las bacterias mencionadas son capaces de ingresar a las levaduras podrían utilizarlas como un vehículo para facilitar la diseminación de bacterias. En el presente trabajo se evaluará la endosimbiosis bacteria-levadura de diferentes bacterias (*L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 6538, *S. enterica* Serovar Typhimurium ATCC 14028 y *E. coli* ATCC 8739) en *Candida albicans* ATCC 90028.

1. *L. monocytogenes*

Bacilo Gram positivo no formador de esporas, aerobio o anaerobio facultativo, todas las especies son móviles con flagelos peritricos cuando se cultivan <30°C (McLauchlin & Rees, 2015) es ubicuitaria, pudiendo encontrarse en diferentes ambientes como el suelo, plantas, ensilaje, agua de mar y animales. Es una bacteria halófila, tiene la capacidad de crecer a 10% de NaCl, además puede desarrollarse entre un pH de 4.1 y 9.6, en baja actividad de agua y puede vivir a un rango de temperatura amplio (psicrótrofa) desde los 0-45°C, sobrevive en ambientes con bajas concentraciones de nutrientes y se ha descrito su resistencia a procesos como la pasteurización de la leche (Batt, 2014; Bunning *et al.*, 1988; James *et al.*, 2005). Además, la bacteria tiene la capacidad de formar biopelículas y en conjunto a las características antes mencionadas la posicionan como un microorganismo de importancia para la industria alimentaria ya que puede colonizar instalaciones y equipos de producción de alimentos pudiendo ser difícil su control y erradicación (Bridier *et al.*, 2015). Esta bacteria puede resistir diversos ambientes debido a que posee genes para el transporte y utilización de distintos carbohidratos que existen en el entorno donde se aloja (Nelson *et al.*, 2004). Por lo tanto, además de encontrarla en superficies y equipos, también se puede encontrar en diversos alimentos, siendo los principales aquellos que corresponden a lácteos, carnes, vegetales, productos marinos y alimentos listos para consumo (ALC) (Soto *et al.*, 2016).

La listeriosis es una enfermedad relativamente rara pero que cuando está presente puede tener altas tasas de mortalidad (20-30%) (FAO, 2004). La enfermedad puede cursar con síntomas gastrointestinales como vómito, diarrea o más graves como septicemia, meningitis, encefalitis e incluso abortos en mujeres embarazadas (Batt, 2014; James *et al.*, 2005). Según la probabilidad de que se produzca la enfermedad aumentaría cuando son mayores las cargas bacterianas en los alimentos y cuando las personas que se han infectado son ancianos, niños, embarazadas, recién nacidos, personas con inmunosupresión (VIH/SIDA, afecciones crónicas como la cirrosis) (FAO, 2004).

2. *S. enterica*

Bacilo Gram negativo, no esporulado y móvil ampliamente distribuido en la naturaleza y en el tracto gastrointestinal de los animales y personas, donde las aves son su principal reservorio, produciendo un cuadro crónico asintomático (Barreto *et al.*, 2016), adicionalmente, se ha aislado a partir de muestras de agua y alimentos como carne de bovino, carne de aves de corral, huevo, leche y piensos para la alimentación de animales (Graziani *et al.*, 2017).

Salmonella es un género que pertenece a la familia Enterobacteriaceae y está considerada como una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas. Si bien todos los serotipos pueden causar la enfermedad en el ser humano que suele causar gastroenteritis, *S. enterica* serotipo Enteritidis y *S. enterica* serotipo Typhimurium transmitida de animales a humanos, pueden provocar una enfermedad sistémica grave y aguda pudiendo provocar la muerte en personas, sobretodo aquellas inmunodeprimidas, ancianos o niños (Gal-Mor *et al.*, 2014; OMS, 2018). Por otra parte, se ha informado que los costos asociados a la incidencia de casos de salmonelosis pueden ser de hasta varios billones de dólares al año (Lee *et al.*, 2015).

Salmonella es importante en salud pública, no solo por las altas incidencias o impactos económicos que produce (Lee *et al.*, 2015), sino que además tiene la capacidad de diseminarse por el ambiente a través de animales de producción asintomáticos o a través de alimentos (Rabsch *et al.*, 2015). Adicionalmente a esto, *Salmonella* presenta en la actualidad resistencia a cinco antimicrobianos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfas y tetraciclinas) lo que agrega importancia a su control en los alimentos (James *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2017).

Los tratamientos con calor como la pasteurización pueden destruir la mayoría de las cepas de *Salmonella*, sin embargo, productos que se consumen crudos como carnes y huevos podrían ser un foco de transmisión de la bacteria rápidamente. Además, la bacteria puede sobrevivir durante varias semanas en un ambiente seco

y varios meses en agua, resiste a altas concentraciones de sal (9%) y es productora de biopelículas (James *et al.*, 2005).

3. *S. aureus*

Coco Gram positivo, anaerobio facultativo, usualmente catalasa-positivo y oxidasa-negativo, inmóvil (Schleifer & Bell, 2015), se puede encontrar en distintos ambientes, coloniza la piel y membranas mucosas de animales y humanos (Stewart, 2017). Es común encontrarla en procesos patológicos de los animales de abasto como en cuadros de mastitis en bovinos, pudiendo la glándula mamaria bovina ser un reservorio de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* (Oliver *et al.*, 2005). También ha sido asociada a alimentos como carnes, huevos, leche y sus derivados como la crema de leche en productos de pastelería (Stewart, 2017). Resiste a altas concentraciones de sal (7-10%) y amplios rangos de temperatura (10-40°C), algunas cepas pueden sobrevivir bajo 6,7°C, puede formar biopelículas y es multiresistente a los antibióticos (James *et al.*, 2005). Se ha encontrado en altos niveles *S. aureus* resistente a la metilicina en granjas de EE. UU. y Europa como también en carnes distribuidas comercialmente, lo que se ha convertido en una preocupación para los consumidores de carne. Los animales productores de carne mayormente implicados son cerdos, aves y ganado (Kadariya *et al.*, 2014). Esto último ha conllevado a ser clasificada por la organización mundial de la salud dentro de la lista de los microorganismos patógenos con prioridad elevada en cuanto a la búsqueda de nuevos antibióticos (OMS, 2017).

Esta ETA es una de las más comunes y es una preocupación importante en los programas de salud pública en todo el mundo, representando la cuarta causa principal de enfermedades transmitidas por los alimentos después de *Norovirus*, *Salmonella* y *Campylobacter* (Stewart, 2017).

La enfermedad típica causada por *S. aureus* presenta un inicio rápido de los síntomas (1 a 6 horas) después de la ingestión de alimentos contaminados con cepas con la enterotoxina (intoxicación alimentaria), pudiendo cursar con síntomas como vómito, diarrea, calambres abdominales, fiebre, sepsis (Stewart, 2017). El

corto período de incubación se debe a la producción de una o más toxinas por las bacterias durante su crecimiento. Sin embargo, el período de incubación de la ETA depende de la cantidad de toxina ingerida, por ejemplo, concentraciones muy pequeñas de enterotoxinas pueden ocasionar un caso e incluso un brote (Kadariya *et al.*, 2014).

En los alimentos, *S. aureus* se puede destruir con procesos de calor, sin embargo, la enterotoxina que produce la intoxicación en humanos es termoestable pudiendo mantenerse viable luego de estos procesos. Además, las enterotoxinas son resistentes a las proteasas y a los ácidos, lo que ayuda a que se mantenga estable después de la ingestión a medida que pasa a través del estómago y hacia el tracto intestinal, donde ejerce sus efectos eméticos (Stewart, 2017).

4. *E. coli*

Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas y usualmente móvil por flagelos peritricos. Es un microorganismo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae y está distribuido en distintos ambientes, encontrándose principalmente en el tracto gastrointestinal de animales y personas (Smith & Fratamico, 2017). Cuando se encuentra *E. coli* en alimentos se asocia a contaminación fecal y malas prácticas de higiene (James *et al.*, 2005). Por otra parte, dentro de los patotipos de *E. coli* que se han asociado a enfermedad, existen seis patotipos, con diferentes factores de virulencia, epidemiología y características clínicas de la enfermedad que producen. Estos son *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* adherente difusamente (DAEC) y *E. coli* productora de Shiga toxina (STEC) o también conocida como *E. coli* productora de citotoxina Vero (Scheutz & Strockbine, 2015). En el caso de STEC, esta se transmite vía fecal-oral, siendo el reservorio más importante el tracto gastrointestinal, por ende, el contacto con el ganado, el medio ambiente del ganado y los productos alimenticios originados a partir del ganado proporcionan un factor de riesgo importante para que se produzca la infección en humanos y la enfermedad

generada por la toxina. STEC O157:H7 se asocia comunmente a los brotes transmitidos por alimentos y la infección puede cursar con diarrea, colitis hemorrágica e incluso provocar el síndrome urémico hemolítico y muerte en personas (Smith & Fratamico, 2017).

Uno de los grandes problemas que se han generado con este patógeno es su resistencia a antibióticos, ya que presenta resistencia a los antibióticos hidrófobos, como los macrólidos, novobiocinas, rifamicinas, actinomicina D y ácido fusídico (Scheutz & Strockbine, 2015).

Los alimentos que se han asociado con infecciones por STEC incluyen carnes, verduras, productos lácteos, frutas, jugos de frutas, verduras y nueces (Smith & Fratamico, 2017). Además, se ha descrito la presencia de biopelículas de STEC en industrias de procesamiento de huevo y lácteos (Bridier *et al.*, 2015).

5. Resistencia de los microorganismos a condiciones adversas

Se ha estudiado que los microorganismos tienen características propias que dificultan su erradicación. Los tratamientos que se utilizan para reducir o eliminar la carga bacteriana de los alimentos y del agua como la cocción, pasteurización, cloración del agua, entre otros han prevenido enfermedades y epidemias al reducir considerablemente la presencia de éstos. Sin embargo, algunos microorganismos cuando se someten a estos tratamientos o a condiciones desfavorables de crecimiento, se mantienen viables, pero en estado de dormancia, cambiando su morfología y en algunos casos no son cultivables en medios de cultivo sintéticos, por lo que no se detecta su presencia (Oliver, 2005). Por otra parte, se ha investigado la formación de biopelículas, éstas corresponden a comunidades de microorganismos que se adhieren a una superficie formando una matriz que puede resistir diferentes métodos de desinfección, por lo que afecta gravemente a la industria alimentaria y la contaminación de los alimentos (Bridier *et al.*, 2015; O'Toole *et al.*, 2000).

Otro de los factores que ha intervenido en el control de los microorganismos una vez que llegan a un hospedero es la rápida generación de resistencia a antibióticos. Se han encontrado cepas de *S. aureus*, *S. enterica* y *E. coli* productora de Shiga toxina multirresistentes a los antibióticos aisladas desde alimentos (Li *et al.*, 2017; Normanno *et al.*, 2007; Pesavento *et al.*, 2007). Además, se han descrito otras formas de sobrevivencia de las bacterias, éstas cuando son sometidas a condiciones de estrés son capaces de internalizarse en células eucariontes, éste fenómeno se llama endosimbiosis y se define como la asociación en que un organismo habita dentro de otro. El término abarca tanto los tipos de interacciones dañinas (parasitarios) o interacciones beneficiosas para (mutualistas) y también se aplica para los microorganismos que viven dentro de cualquier parte del cuerpo humano como por ejemplo bacterias patógenas que pueden infectar células de distintos tejidos (Wernegreen, 2012).

6. Interacción entre bacterias y células eucariotas

Se ha establecido la internalización experimental y sobrevivencia de bacterias como *L. monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *S. Typhimurium*, *E. coli* 0157H7, *S. aureus* (MRSA), *Mycobacterium bovis*, *H. pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* en amebas de vida libre. En el caso de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *Pseudomona aureginosa* también se ha descrito la multiplicación de la bacteria dentro de la ameba de vida libre, incluso se ha comprobado la internalización intraquística de *S. aureus* en amebas. Sin embargo, no está claro el papel de los quistes en la protección de la bacteria (Thomas *et al.*, 2010).

Además, estudios recientes han descrito otra forma poco conocida en que las bacterias pueden sobrevivir en ambientes desfavorables. Se ha observado la transmisión de bacterias dentro de vacuolas de levaduras como es el caso de *H. pylori* que puede ser transmitido desde la madre al recién nacido a través de la vacuola de *C. albicans* (Siavoshi *et al.*, 2013). También se ha estudiado esta bacteria al interior de levaduras provenientes de alimentos, flores, insectos y desde muestras de mucosa oral de personas (Salmanian *et al.*, 2012; Siavoshi *et al.*,

2018). Esta vía de transmisión puede contribuir a la diseminación de la bacteria en ambientes con bajas temperaturas y pocos nutrientes (Siavoshi *et al.*, 2018; Siavoshi & Saniee, 2014; Vale & Vitor, 2010). También, se ha demostrado una supervivencia mayor y/o viabilidad de *H. pylori* en ambientes ácidos al incorporarse a organismos eucariontes como *C. albicans* (Vega, 2018).

La interacción entre bacterias y levaduras aún no está clara. Se conoce mediante experimentación *in vitro* que la internación de *H. pylori* dentro de la levadura está mediada por factores como el pH (Vega, 2018). Además, las bacterias podrían aprovechar de la levadura el ácido lipoico, que es un precursor de hierro para muchas reacciones enzimáticas de algunas bacterias (Laczkovich *et al.*, 2018; Schonauer *et al.*, 2009). Además, se sugiere que el ergosterol de la levadura podría ayudar a que las bacterias se unan a la levadura, ya que se describe algunas bacterias patógenas como *H. pylori* utilizan el colesterol cuando ingresan al cuerpo humano para su desarrollo. (Jimenez-Soto *et al.*, 2012). Otra teoría acerca del ingreso de la bacteria es que ocurre durante la fisión binaria de las levaduras, ya que cuando estas se encuentran en división la pared celular se adelgaza y sería más fácil para la bacteria poder ingresar (Atilgan *et al.*, 2015)

Esta vía de transmisión bacteria-levadura ha sido muy poco estudiada en bacterias causantes de ETA sobre las levaduras propias de los alimentos. Sin embargo, se ha demostrado la liberación de bacterias como *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* y *H. pylori* desde *C. albicans*, donde experimentalmente no todas las levaduras liberaron estas bacterias, por lo que aún se desconoce en qué condiciones se pudiesen liberar. No obstante, se ha descrito que esto se puede desencadenar por la acción de la anfotericina B o enzimas hidrolíticas (Tavakolian *et al.*, 2018). También se ha investigado la interacción de otras bacterias como *Microbacterium* sp. la cual puede crecer dentro como fuera del citoplasma de *Candida tropicalis* (Kang *et al.*, 2009).

Por otra parte, las bacterias y hongos se encuentran juntos en una variedad de entornos pudiendo contribuir a la generación de la matriz en una biopelícula. Es más, se ha informado que el 80% de las enfermedades microbianas (incluidas las ETA) son causadas por microorganismos en las biopelículas; sin embargo, se sabe muy poco sobre el comportamiento mixto de hongos y bacterias (Tarifa *et al.*, 2017). Recientemente se ha investigado la interacción de *Candida krusei* proveniente de jugo de fruta con *S. enterica* y *E. coli* O157:H7, concluyendo que la adhesión levadura-bacteria en superficies abióticas resultó en un aumento de los recuentos de las bacterias y una disminución en el recuento de levaduras (Tarifa *et al.*, 2017). Además, en otro estudio se determinó que los elementos secretores de *E. coli* deterioran significativamente el desarrollo de biopelículas de *Candida* (Bandara *et al.*, 2013).

7. Levaduras en alimentos

Las levaduras tienen un rol fundamental en la producción de alimentos fermentados como el pan, vino, cerveza, queso, yogur, entre otros. Además, conforman parte de los ingredientes de muchos alimentos ya que se utilizan como potenciador de sabor, conservar alimentos y como fuente de proteína y vitaminas. Sin embargo, hongos y levaduras también se consideran parte de los microorganismos que pueden causar ETA ya que se asocian al deterioro y descomposición de los alimentos (Querol & Fleet, 2006). Los géneros más conocidos de levaduras en alimentos corresponden a *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* (James *et al.*, 2005).

7.1 Levaduras en productos lácteos

En los productos lácteos y sus derivados podemos encontrar levaduras en forma natural fermentadoras de lactosa, con actividad proteolítica, actividad lipolítica, capaces de crecer a bajas temperaturas, a bajo pH y tolerar la sal. Entre las más conocidas se encuentran *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia*

lipolytica y *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras pueden ayudar a combatir los microorganismos patógenos que se encuentran en estos alimentos y a la vez tienen efectos sinérgicos con bacterias ácido-lácticas. Por otro lado, la resistencia a condiciones de estrés, las convierten en microorganismos responsables de deterioro de estos alimentos. (Boekhout & Robert, 2003; Querol & Fleet, 2006).

7.2 Levaduras en frutas y verduras

La cantidad de levaduras presentes en frutas y verduras dependerán de distintos factores como por ejemplo la maduración de la fruta, el uso de fungicidas, la caída al suelo, entre otros, ya que las levaduras que se encuentran en el ambiente pueden contaminar estos alimentos. Los géneros más comunes encontrados en frutas frescas son *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Debaryomyces*, pero pueden variar ampliamente de acuerdo a las propiedades de la fruta o verdura. En frutas procesadas, existe una pérdida de la integridad natural y de la estructura biológica del alimento (o también llamado cáscara), lo que provoca una fácil disponibilidad de carbohidratos para el crecimiento de las levaduras. La mayoría de las frutas sin esta barrera biológica al tener un alto contenido de azúcar y bajo pH crean un ambiente más favorable para las levaduras terminando en una fermentación deseada o indeseada. En frutas procesadas los géneros que predominan *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora/ Kloeckera*, *Candida* y *Pichia*. *Zygosaccharomyces bailii* puede tolerar los conservantes como benzoatos y sorbatos presentes en concentrados de fruta (Boekhout & Robert, 2003; Querol & Fleet, 2006).

7.3 Levaduras en carnes

Las carnes en general son propensas a la contaminación microbiana por bacterias y en menor proporción a la contaminación por levaduras, sin embargo, las contaminaciones mixtas pueden existir cuando hay cambios en el procesamiento, factores extrínsecos e intrínsecos de las carnes. Entre las especies de levaduras más prevalentes en carnes procesadas frescas se encuentran *D. hansenii*, *Debaryomyces kloeckeri*, *Debaryomyces nicotianae* y *Debaryomyces subglobosus*.

También se han encontrado levaduras en canales de cordero a bajas temperaturas tales como *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida mesenterica*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus albidus* y especies *Rhodotorula minuta* y *Rhodotorula mucilaginosa* principalmente cuando hay un aumento de la temperatura en las plantas procesadoras (Boekhout & Robert, 2003; James *et al.*, 2005; Querol & Fleet, 2006).

En carnes marinadas y cocidas la actividad de agua (aW) se reduce por el aumento de concentración de sal. En conjunto a la formación de nitritos y otros ingredientes utilizados en carnes proporcionan condiciones para el reemplazo gradual de las bacterias gram negativas a bacterias gram positivas productoras de ácido láctico. Además, las bacterias son inhibidas por el sulfito que contienen estos alimentos y si el almacenamiento de éstos ocurre en condiciones aeróbicas hay más posibilidad de proliferación de levaduras. Los géneros más comunes que se han encontrado en salchichas sulfatadas y embutidos son *Debaryomices* y *Candida*, mientras que en carnes de ave marinadas las especies más prevalentes encontradas son *Y. lipolytica* y *Candida zeylanoides* (Boekhout & Robert, 2003).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

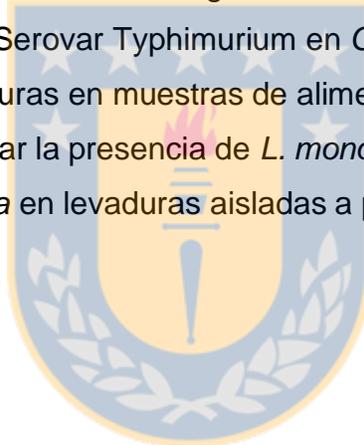
Existe internalización de bacterias de transmisión alimentaria en levaduras tanto en forma experimental, como en forma natural en algunos alimentos.

Objetivo general

Determinar la endosimbiosis de bacterias de transmisión alimentaria en levaduras *in vitro* mediante co-cultivo y mediante análisis de muestras de alimentos.

Objetivos específicos

1. Demostrar experimentalmente el ingreso de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* o *S. enterica* Serovar Typhimurium en *C. albicans*.
2. Aislar y tipificar levaduras en muestras de alimentos
3. Determinar e identificar la presencia de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* 0157:H7 y *Salmonella* en levaduras aisladas a partir de alimentos.



MATERIAL Y MÉTODO

Objetivo específico 1: Demostrar experimentalmente el ingreso de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* o *S. enterica* Serovar Typhimurium en *C. albicans*.

1. Co-cultivo bacterias-levaduras

Para demostrar la internalización bacteria-levadura se utilizaron las siguientes cepas: *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 6538, *S. enterica* Serovar Typhimurium ATCC 14028, *E. coli* ATCC 8739 y *C. albicans* ATCC 90028. *C. albicans* se cultivó en agar GYC (cloranfenicol, extracto de levadura, glucosa; BD) y las bacterias anteriormente mencionadas en agar tripticasa de soya (BD), todos los microorganismos se cultivaron overnight (12 h) a 37°C en aerobiosis antes de la realización de los co-cultivos en una estufa Series 8000 (Thermo Scientific). Luego, se midió una concentración equivalente a 0.5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de cada cultivo en un tubo de ensayo con 5 mL de suero fisiológico estéril y se traspasaron 4 mL de cultivo bacteriano y 2 mL (en una proporción 2:1 bacteria-levadura) en un tubo de ensayo con 40 mL de caldo BHI y se dejó incubando en agitación a 37°C por 48 h. Se analizó la internalización de las bacterias mediante microscopía óptica (DME-Leica), utilizando montajes en fresco de los co-cultivos, donde se agregó 16 μ L a un portaobjeto, se depositó el cubreobjeto y se observó con un objetivo del lente a 100X con aceite de inmersión al tiempo 0, luego al cabo de 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h. A las 48 h, las muestras se sembraron en placas con agar GYC a 37°C en aerobiosis. El agar GYC contiene extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol, siendo el papel del antibiótico inhibir el crecimiento bacteriano para una mejor recuperación de las células fúngicas. Después de la resiembra 14° en agar GYC, las levaduras se consideraron libres de bacterias extracelulares y se usaron para los siguientes experimentos. Se realizó tinción Gram para observar el crecimiento de levaduras, y para corroborar el crecimiento de células bacterianas intra-levadura, se traspasó una asada de la resiembra 14° en agar GYC a placas con agar específicos para *L. monocytogenes*: Agar PALCAM

(BD); *E. coli*: Agar EMB (OXOID); *Salmonella*: Agar XLD (Millipore) y *S. aureus*: Agar sal manitol (BD), estos se cultivaron por 48 h a 37°C en aerobiosis.

2. Observación de células bacterianas (CB) dentro de levaduras por microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión

A partir de las colonias de levaduras en agar GYC (resiembra 14), se ajustó el cultivo a una concentración equivalente a 0.5 McFarland y 1 mL fue mezclado con 1 µL de LIVE/ DEAD BacLight Bacterial Viability Kit L-7012 (ThermoFisher). Las muestras se incubaron en oscuridad por 12 minutos, fueron filtradas y depositadas en un filtro de policarbonato negro (25 mm, 0,2 µm Millipore) que se depositó cada una en un portaobjeto con aceite de montaje provisto en el kit y se cubrió con el cubreobjeto, luego fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Eclipse 80i (Nikon) a 100X (objetivo del lente) con aceite de inmersión. El kit permite diferenciar entre microorganismos viables y no-viables mostrándolos en colores verde o rojo, respectivamente. La combinación de los filtros (Merged) se realizó usando el software ImageJ (NIH Image/ImageJ). Además, se obtuvieron imágenes en time-lapse cada 1 segundo durante 21 s para evidenciar el movimiento de la bacteria dentro de la vacuola de la levadura (Siavoshi *et al.*, 2018).

Complementado a esto, se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) con el microscopio JEM 1200 EX-II (JEOL) a las muestras de cultivo puro de *L. monocytogenes* y *C. albicans* y para la resiembra 14° de ambos microorganismos. Las muestras fueron fijadas en solución Karnovsky y enviadas por duplicado al Laboratorio de microscopía electrónica (Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción).

3. Detección del ADN de las células bacterianas contenidas en *C. albicans* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el fin de detectar si las levaduras libres de bacterias extracelulares contenían ADN bacteriano, se extrajo el ADN total de las colonias de levadura que crecieron en la resiembra 14° en agar GYC. Fue necesaria una pre-lisis mecánica de las membranas de las levaduras, para esto, se añadieron 0,5 mL de microperlas de

vidrio de 1 mm (Sigma-Aldrich) en conjunto con el sedimento de levaduras resuspendidas en buffer PBS en un vial de 2 mL. Los viales se agitaron en vórtex de forma vertical (Nyxtechnik, Voltronyx) siete veces durante 5 minutos cada ciclo mientras los tubos se enfriaban con hielo. Luego, se extrajo el ADN total de la levadura utilizando el kit de aislamiento de ADN microbiano UltraClean (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, el ADN se cuantificó usando un lector de microplacas Infinite 200 PRO (TECAN) según lo especificado por el fabricante.

El ADN extraído desde las muestras de levaduras se usó para buscar la presencia de genes específicos para las bacterias estudiadas siguiendo el procedimiento de Kim *et al.* (2007) y Yan *et al.* (2017) con modificaciones (Tabla 1). El mix para la PCR fue de 12.5 μ L de polimerasa (SapphireAmp®Fast PCR Master Mix), 1 μ L de cada primer (Forward y Reverse), 5.5 μ L de agua libre de nucleasas y 5 μ L de ADN de la muestra. El PCR (Bioer® XP Cyclor), consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, luego 35 ciclos de desnaturalización a 98°C por 5 seg, alineamiento a 60°C por 5 seg y extensión a 72°C por 5 seg. Por último, se realizó una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplicones fueron visualizados mediante gel de agarosa 1,5% (CleaverGEL®, CSL-100), teñidos con Gelred (Biotium®, Hayward, CA) y visualizados con un transiluminador de luz UV. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis (ENDURO™ 7.10 Horizontal Gel Box) y se determinó su tamaño, usando un marcador de peso molecular. Los amplicones de ADN teóricos se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Partidores que se utilizaron en este estudio

Microorganismo	Partidor	Secuencia partidor (5'->3')	Gen	Amplicón (pb)	Referencia
<i>S. enterica</i>	Forward	GAATCCTCAGTTTTTCAACGTTTC	<i>invA</i>	678	Kim <i>et al.</i> (2007)
	Reverse	TAGCCGTAACAACCAATACAAATG			
<i>S. aureus</i>	Forward	AATTTAACAGCTAAAGAGTTTGGT	<i>femA</i>	264	
	Reverse	TTCATTAAGAAAAAGTGTACGAG			
<i>L. monocytogenes</i>	Forward	CTGGCACAAAATTACTTACAACGA	<i>p60</i> protein	454	
	Reverse	AACTACTGGAGCTGCTTGTTTTTC			
<i>E. coli</i> O157:H7	Forward	GATAGACTTTTCGACCCAACAAAG	Shiga-like toxin	208	
	Reverse	TTGCTCAATAATCAGACGAAGATG			
<i>E. coli</i>	Forward	AGTACGCCCGTTTCTTCTCT	<i>mdh</i>	140	Yan <i>et al.</i> (2017)
	Reverse	CAGGGCGATATCTTTCTTGA			
Eubacteria	Forward	AGAGTTTGATCCTGCCTCAG	16S rDNA	1500	Dominguez-Gortaire (2014)
	Reverse	GGTTACCTTGTTACGACTT			
Fungi	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	26S rDNA	600	Siavoshi <i>et al.</i> (2018)
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
Fungi	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	5,8S rADN	Variable	(De Filippis <i>et al.</i> , 2017)
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC			

Objetivo específico 2: Aislar y tipificar levaduras en muestras de alimentos.**4. Muestras de alimentos**

El grupo de alimentos a evaluar fueron productos lácteos (leche, queso, yogur y helado); verduras y frutas (lechuga, espárragos, berenjena, espinaca, ensaladas mixtas listas para el consumo, manzana, naranja, durazno en conserva, mandarina, tomate, zapallo italiano, diente de dragón, limón, dulce de membrillo); miel; embutidos de carne (salchicha, jamón y salame). Los alimentos se escogieron de acuerdo con estudios previos que asocian mayor recuento de levaduras y/o bacterias en esos tipos de alimentos (Abadias *et al.*, 2008; Boekhout & Robert, 2003).

5. Recuperación de levaduras a partir de muestras de alimentos

Se tomó una muestra por alimento de 10 g. Se agregó a una bolsa de stomacher 20x30 cm con 90 mL de Buffer PBS y se homogeneizó por 1 minuto. Luego se inoculó 1 mL (100 µl) de la muestra de alimento diluida en 5 mL caldo BHI, donde se dejó incubando a 30°C por 7-10 días. Posteriormente, se inoculó superficialmente 50 µl en CHROMOagar Candida (BD) y se diseminó con un hisopo por toda la placa, se incubó a 35°C por 48 h. Luego se realizó tinción Gram a las distintas colonias que crecieron para corroborar morfología típica de levaduras y cada colonia distinta se sembró en agar GYC a 30°C por 24-48 horas (en algunos casos hasta 72 horas). Para disminuir el riesgo de contaminación y eliminar las bacterias extracelulares, a cada cultivo primario positivo para levaduras en agar GYC se resembró ocho veces en las mismas condiciones que el cultivo primario. Luego, se observó un montaje en fresco de las colonias de levaduras para detectar la presencia de células bacterianas dentro de éstas (Siavoshi *et al.*, 2018). Posteriormente se realizó la identificación molecular de las levaduras aisladas mediante PCR-RFLP (Siavoshi *et al.*, 2018).

6. Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) de la región del espaciador transcrito interno (ITS) en 5,8S ADNr para tipificar levaduras

Se utilizaron cultivos frescos de levaduras para la extracción de ADN. Los primers utilizados para amplificar la región ITS fueron ITS1 e ITS4 (Tabla 1). La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial a 98°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 1 min, alineamiento a 55°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 2 minutos, y la extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis, utilizando gel de agarosa al 1% en Tris/Borato/EDTA (TBE, 0.5 X), y fueron digeridos sin purificación adicional, utilizando endonucleasas de restricción Hha I, Hae III y Hinf I (Promega, EE. UU. Y Bioron, Alemania). Los fragmentos de se sometieron a electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2%. (Siavoshi *et al.*, 2018). Adicionalmente se envió a secuenciar el 26S rARN de las levaduras (Macrogen Corp.).

Objetivo específico 3: Determinar e identificar la presencia de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y *S. enterica* en levaduras aisladas a partir de alimentos.

7. Identificación del gen 16S rDNA y genes para *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* en levaduras de alimentos

Para determinar e identificar la presencia de bacterias en las muestras de levaduras, se realizó PCR del gen 16S rDNA. De la misma forma mencionada anteriormente, se realizó una pre-lisis de las levaduras y se extrajo el ADN total de ellas con Kit de extracción de ADN. Para el PCR se utilizaron los primers 8F y 1492R (Tabla 1). Las condiciones de PCR fueron similares a las anteriores, excepto por la temperatura de alineamiento la cual fue de 56°C. El amplicón fue visualizado mediante gel de agarosa 1.2%, teñidos con Gelred y visualizados con un transiluminador de luz UV. Luego de esto, se trabajó con las muestras positivas al gen 16S rDNA y se realizó PCR con primers específicos para *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* (Tabla 1). Adicionalmente se envió a secuenciar el 16S rARN de los aislados de levaduras que fueron positivos a la presencia de bacterias (Macrogen Corp.).

8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las muestras positivas a levaduras y además, de las muestras que contenían bacterias intra-levadura. El tamaño muestral fue de 23 muestras de alimentos que correspondieron a 15 muestras de frutas, verduras y miel (berenjena, espárragos, espinaca, lechuga, naranja, manzana, mandarina, duraznos en conserva, miel, tomate, zapallo italiano, diente de dragón, limón, dulce de membrillo, ensalada toscana), 5 muestras de lácteos (queso gouda, quesillo, helado de vainilla, leche, yogur), y 3 muestras de embutidos de carne (salchicha de pavo, salame, jamón de cerdo)

RESULTADOS

1. Presencia de células bacterianas (CB) dentro de *C. albicans*

El principal objetivo de este trabajo fue demostrar la endosimbiosis de *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *S. aureus* y *E. coli* en las células de *C. albicans*. Para esto se realizaron co-cultivos con las bacterias y *C. albicans* separadamente. Las observaciones del montaje en fresco demostraron la presencia de CB en movimiento dentro de la vacuola de *C. albicans* en todos los co-cultivos desde las 24 h de incubación a 37°C (Figura 1). En algunos casos, se encontraron más de tres CB contenidos en la levadura (Figura 2). No se observaron CB dentro de la levadura antes de las 24 h de co-incubación.

Figura 1. Observación de CB dentro de la vacuola de *C. albicans*. Las flechas señalan las CB en los diferentes co-cultivos. A corresponde al co-cultivo *C. albicans* y *L. monocytogenes*; B corresponde al co-cultivo *C. albicans* y *S. enterica*; C corresponde al co-cultivo *C. albicans* y *E. coli*; D; corresponde al co-cultivo *C. albicans* y *S. aureus*. Fuente: Elaboración propia.

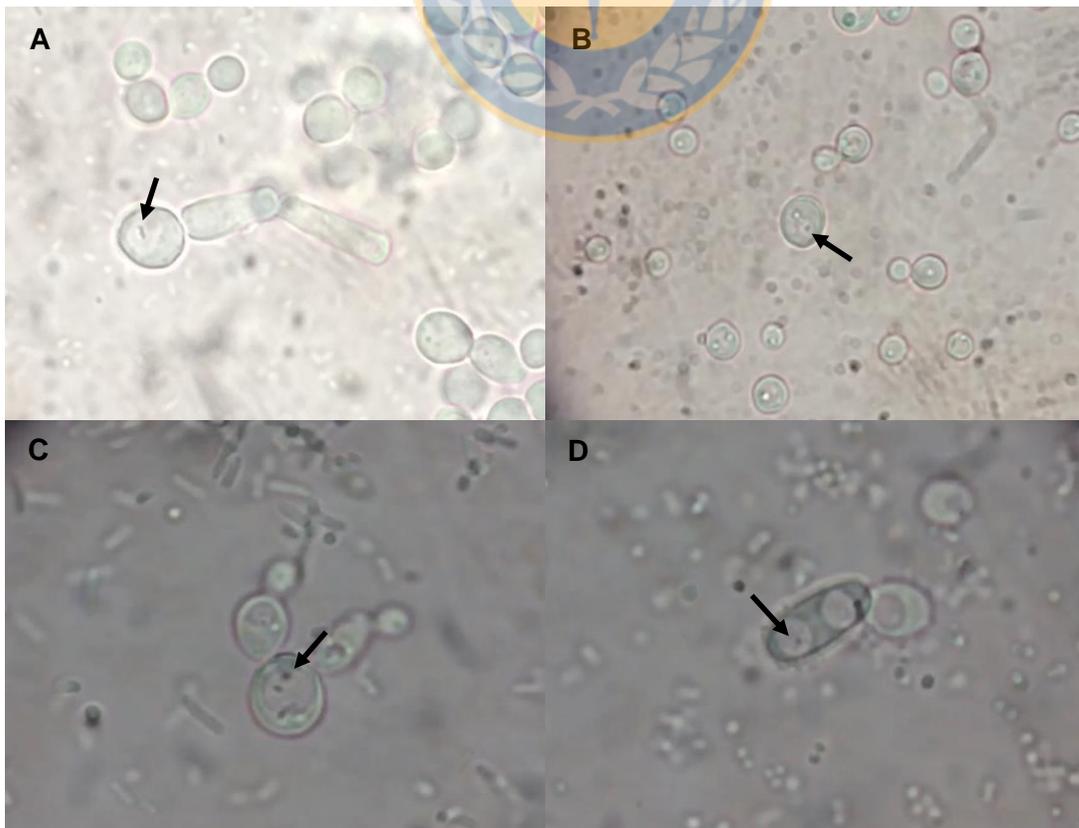


Figura 2. Observación de varias CB en la vacuola de *C. albicans* post resiembra en agar GYC. La flecha señala una levadura con más de tres CB. La muestra corresponde al co-cultivo de *C. albicans* y *L. monocytogenes*. Fuente: Elaboración propia.



2. Detección de genes bacterianos a partir del ADN total de *C. albicans*

Luego de confirmar la ausencia de bacterias extracelulares en los co-cultivos y realizar la extracción de ADN total de las levaduras, se detectó la presencia del gen *p60* de *L. monocytogenes*, el cual amplificó por PCR, observándose por electroforesis un producto de 450 pb, consistente con el esperado, en el carril correspondiente al ADN de *L. monocytogenes* y en el que corresponde al ADN de levadura total obtenido de levaduras privadas de *L. monocytogenes* extracelular. Esta banda estaba ausente en el carril correspondiente al ADN puro de *C. albicans* (Figura 3). Adicionalmente el gen *invA* de *S. enterica* fue amplificado por PCR, observándose mediante electroforesis, un producto de 700 pb, en el carril correspondiente al ADN de *S. enterica* y en el que corresponde al ADN de levadura total obtenido de levaduras privadas de *S. enterica* extracelular (Figura 4). No fueron amplificados los genes para las muestras de levaduras que contenían *S. aureus* y *E. coli*.

Figura 3. Electroforesis para la resiembra 14° del co-cultivo de *C. albicans* y *L. monocytogenes*. M: marcador de peso molecular, C+: *L. monocytogenes*, cLm: resiembra 14° de *C. albicans* libre de *L. monocytogenes* extracelular en agar GYC, C-: *C. albicans*; B: Blanco. Fuente: Elaboración propia.

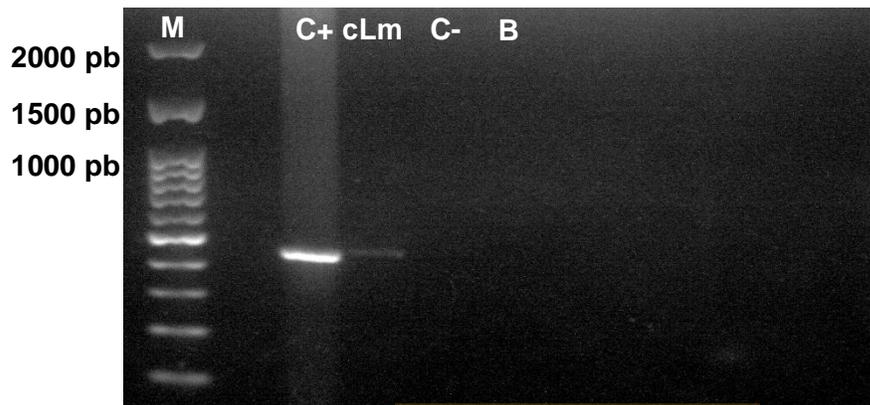


Figura 4. Electroforesis para la resiembra 14° del co-cultivo de *C. albicans* y *S. enterica*. M: marcador de peso molecular, C+: *S. enterica*, cSe: resiembra 14° de *C. albicans* libre de *S. enterica* extracelular en agar GYC, C-: *C. albicans*; B: Blanco. Fuente: Elaboración propia.



3. Viabilidad y movimiento de las CB en las células de *C. albicans*

Una muestra de la resiembra 14° de los co-cultivos se tiñó con SYTO 9 y yoduro de propidio, para detectar CB viables y no viables, respectivamente, y se capturaron imágenes de time-lapse cada segundo durante 21 s para evaluar la movilidad. Las observaciones mostraron que tanto las levaduras como las CB intra-levaduras emitían fluorescencia verde en todos los co-cultivos, lo que demuestra su viabilidad (Figura 5). Además, en las micrografías en time-lapse, las CB estaban en diferentes

posiciones dentro de la vacuola en los distintos intervalos de tiempo, evidenciando su movimiento (Figura 6).

Figura 5. Observaciones de microscopía de fluorescencia de CB viables (fluorescencia verde) dentro de la vacuola (V) de *C. albicans* para los distintos cocultivos libre de bacterias extracelulares después de la resiembra 14° en agar GYC. (A): *C. albicans* y *L. monocytogenes*, (B): *C. albicans* y *E.coli*, (C): *C. albicans* y *S. aureus*, (D): *C. albicans* y *S. enterica*. Fuente: Elaboración propia.

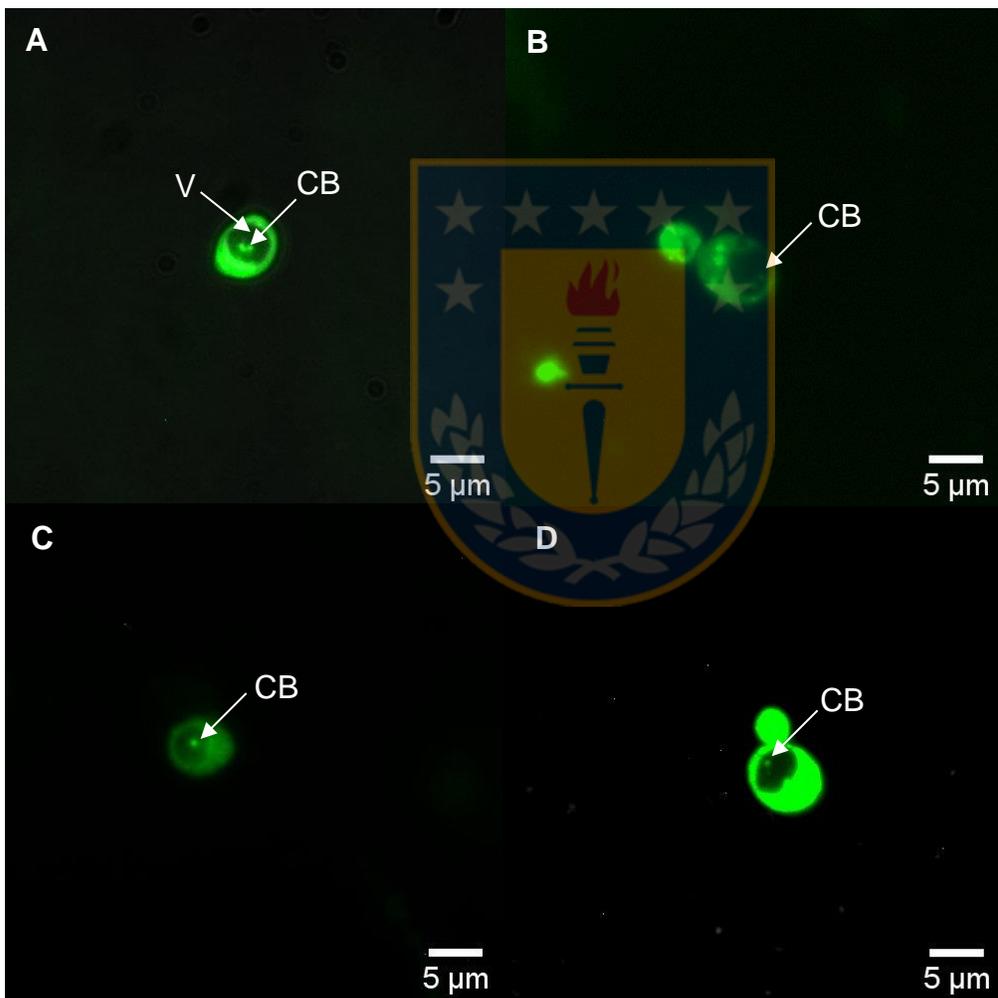


Figura 6. Observaciones de microscopía de fluorescencia de CB viables (fluorescencia verde) dentro de la vacuola (V) de *C. albicans* en diferentes intervalos de tiempo. La muestra corresponde a *C. albicans* libre de *L. monocytogenes* extracelular después de la resiembra 14° en agar GYC. Se tomaron micrografías de time-lapse a intervalos de 1 s durante 21 s. La presencia de los CB en diferentes posiciones dentro de la misma vacuola a diferentes intervalos de tiempo evidencia su movilidad. Fuente: Elaboración propia.

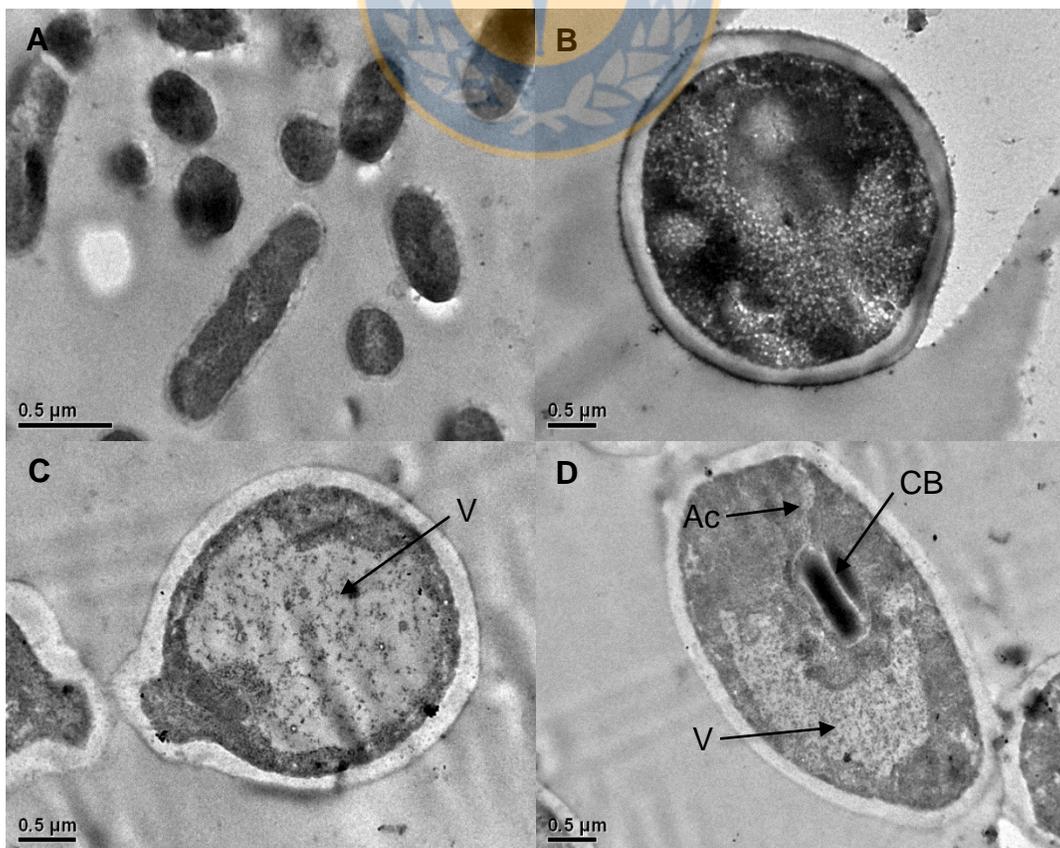


4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de *L. monocytogenes*, *C. albicans* y del co-cultivo de ambas cepas

Las micrografías TEM mostraron que los tamaños de los controles puros de *L. monocytogenes* y *C. albicans* fueron consistentes con lo reportado en la literatura, los bacilos (Fig 7A, flecha) de aproximadamente $0.35 \mu\text{m} \times 1.26 \mu\text{m}$ para *L. monocytogenes* coincidieron con el tamaño de la CB presentes en las levaduras

libres de bacterias extracelulares después de la resiembra 14° en agar GYC (Fig. 7D). Además, la resiembra 14° de levaduras en agar GYC mostró que la mayoría de las células de levadura contenían estructuras electrodensas compatibles con la presencia de la CB intra-levadura (Fig. 7D). También, se observaron levaduras sin CB pero con una vacuola considerablemente aumentada de tamaño (Fig. 7C). La figura 7D muestra una estructura que se extiende desde la bacteria hasta la membrana celular de la levadura, lo que sugiere que podría ser la polimerización de la actina de la bacteria (Ac).

Figura 7. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de *C. albicans*, *L. monocytogenes* y *C. albicans* libre de *L. monocytogenes* extracelular después de la resiembra 14° en agar GYC (A) Control negativo: cultivo puro de *L. monocytogenes*; (B) Control negativo: cultivo puro *C. albicans*; (C) y (D) corresponden a la resiembra 14° de ambos microorganismos en agar GYC, en (C) se puede observar un tamaño mayor de la vacuola (V) dentro de la levadura, en (D) se observa la presencia de CB dentro de la levadura y de una estructura entre la bacteria a la membrana celular de la levadura (Ac). Fuente: Elaboración propia.



5. Recuperación de levaduras provenientes de muestras de alimentos

A partir de 23 alimentos se aislaron levaduras se aisló al menos 1 tipo de colonia utilizando CHROMoagarCandida en muestras de berenjena, espárragos, lechuga, naranja, manzana, mandarina, duraznos, helado de vainilla, vienesa, diente de dragón, dulce de membrillo; 2 tipos de colonias en muestras de espinaca, zapallo italiano, miel y salame; 3 tipos de colonias en muestras de tomate, jamón y limón; 4 tipos de colonias en muestras de queso y quesillo; no se aislaron levaduras de muestras de leche UHT, yogur ni ensaladas envasadas. Por lo tanto, en total se aislaron 36 muestras de levaduras a partir de esos alimentos (21 de frutas y verduras, 6 de embutidos de carne, 9 de lácteos).

6. Detección de la presencia del gen 16S rDNA a partir del ADN total de las levaduras aisladas de alimentos

A partir de los 36 aislados de levaduras, se realizó PCR al gen 16S rDNA con los primers 8F y 1492R, resultando 12 (33%) muestras positivas al gen 16S rDNA en total. Se visualizó un producto PCR de 1500 pb (Figura 8). Las muestras positivas se dividieron en 9/21 muestras de levaduras de frutas y verduras; 2/9 muestras de levaduras de lácteos y 1/6 muestras de levaduras de muestras de embutidos de carne (Figura 9). La frecuencia con que se encontraron muestras positivas a endobacterias fue de un 43% en el grupo de frutas, verduras y miel; un 17% en el grupo de embutidos y un 22% en el grupo de lácteos (figura 9). La secuenciación del gen 16S rRNA de estas muestras no se pudo realizar debido al bajo rendimiento de ADN obtenido desde las muestras. Por otra parte, la electroforesis de los productos amplificados de la región D1/D2 del gen 26S rDNA de las 12 levaduras positivas al gen 16S rDNA mostró bandas con un tamaño de 600 pb. Las levaduras que fueron positivas al gen 16S rDNA fueron identificadas como *R. graminis*, *C. lusitaniae*, *W. sorbophila*, *M. guilliermondii* y *C. orthopsilosis*, encontrándose estas últimas dos una mayor frecuencia para el gen 16S rDNA (Tablas 3, 4 y 5).

Figura 8. Electroforesis para el gen 16S rDNA en aislados de levaduras de alimentos. M: marcador peso molecular, C+: *S. enterica*, 1: berenjena, 2: espárragos, 3: espinacas, 4: naranja, 5: conserva de duraznos, 6: tomate, 7: zapallo italiano, 8: limón, 9: mandarina, 10: salchicha de pavo, 11: queso gouda, 12: quesillo, C-: *C. albicans*, B: blanco. Fuente: Elaboración propia.

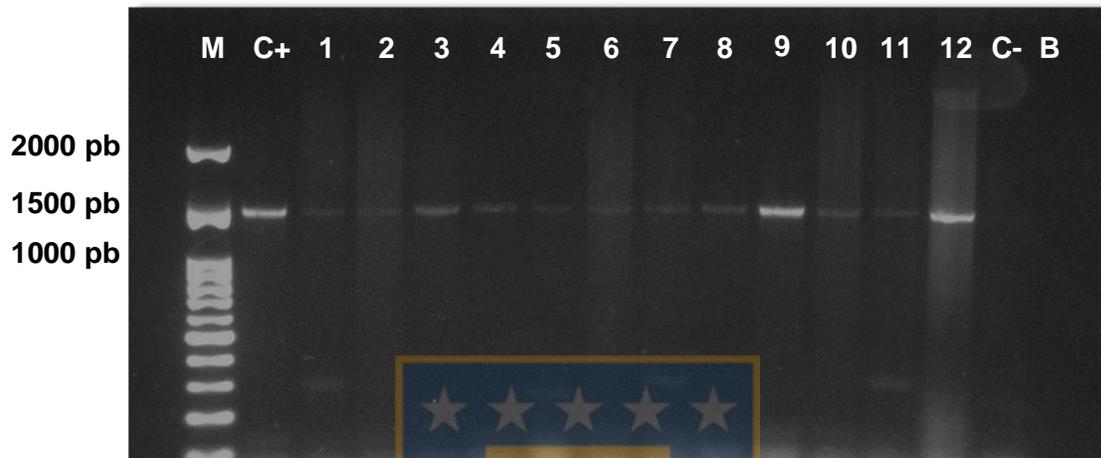
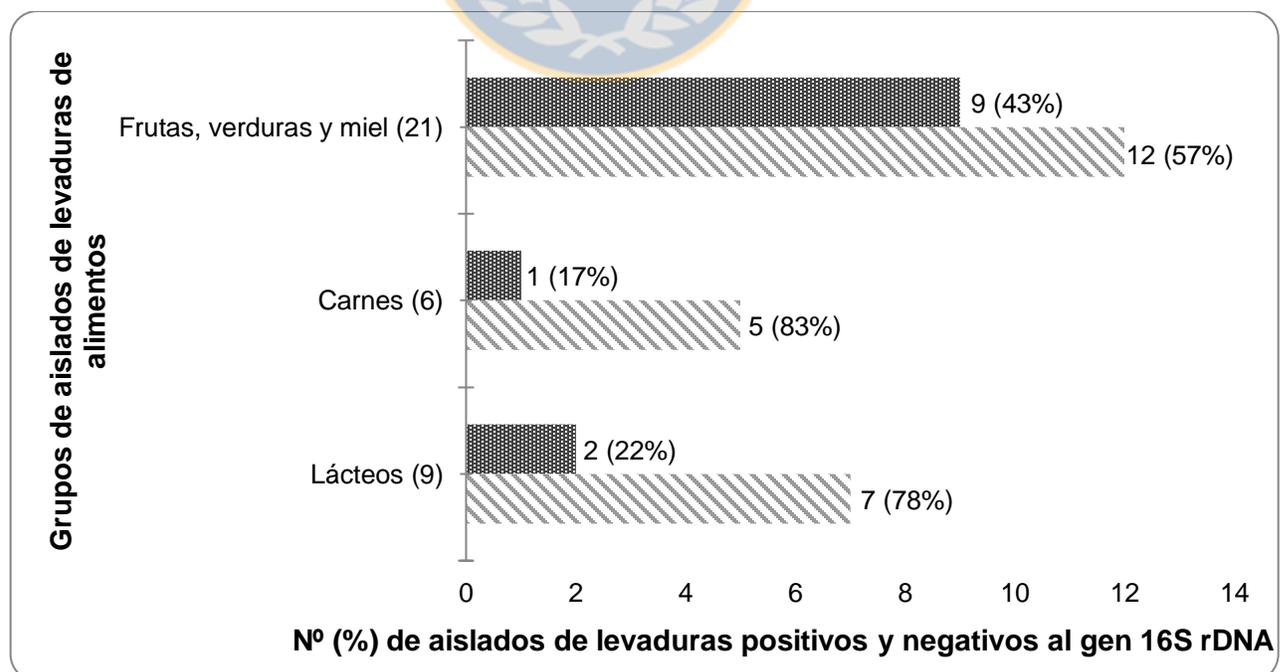


Figura 9. Clasificación de aislados de levaduras positivos y negativos al gen 16S rDNA en los tres grupos de alimentos estudiados: frutas, verduras y miel; embutidos de carne; lácteos. ■: muestras positivas al gen 16S rDNA. ▨: muestras negativas al gen 16S rDNA. Fuente: Elaboración propia.



7. Identificación molecular de las levaduras

La tipificación de los aislados de levaduras se realizó mediante PCR-RFLP con los primers ITS1 y ITS4 y luego se utilizaron las endonucleasas HaEIII, HhaI y HinfI. A partir de los 36 aislados de levaduras, se obtuvo 12 grupos RFLP (Tabla 2). Con el uso de las endonucleasas HaEIII y HhaI se obtuvieron patrones de 1 a 3 bandas, mientras que con la endonucleasa HinfI se obtuvo de 1 a 2 bandas. Los amplicones variaron desde 100 pb a 450 pb. Las levaduras *M. guilliermondii* y *C. orthopsilosis* se agruparon en más de un grupo RFLP: *M. guilliermondii* (RFLP 5,7 y 8) y *C. orthopsilosis* (RFLP 6,9 y 12).

Figura 10. Electroforesis de los aislados de levaduras de alimentos mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa HaEIII. 1: queso, 2: helado, 3: quesillo, 4: quesillo, 5: quesillo, 6: quesillo, 7: tomate, 8: tomate, 9: tomate, M: marcador de peso molecular, 10: zapallo italiano, 11: zapallo italiano, 12: diente de dragón, 13: espinaca, 14: salchicha de pavo, 15: lechuga, 16: naranja, 17: manzana, 18: conserva de duraznos, 19: queso, 20: queso, 21: queso, 22: salame, 23: mandarina, 24: miel, 25: miel, 26: jamón, 27: jamón, 28: jamón, M: marcador de peso molecular, C+: *C. albicans*, C-: *E. coli*, B: blanco, 29: espárragos, 30: berenjena, 31: espinaca, 32: limón, 33: limón, 34: dulce de membrillo, 35: limón, 36: salame. Fuente: Elaboración propia.

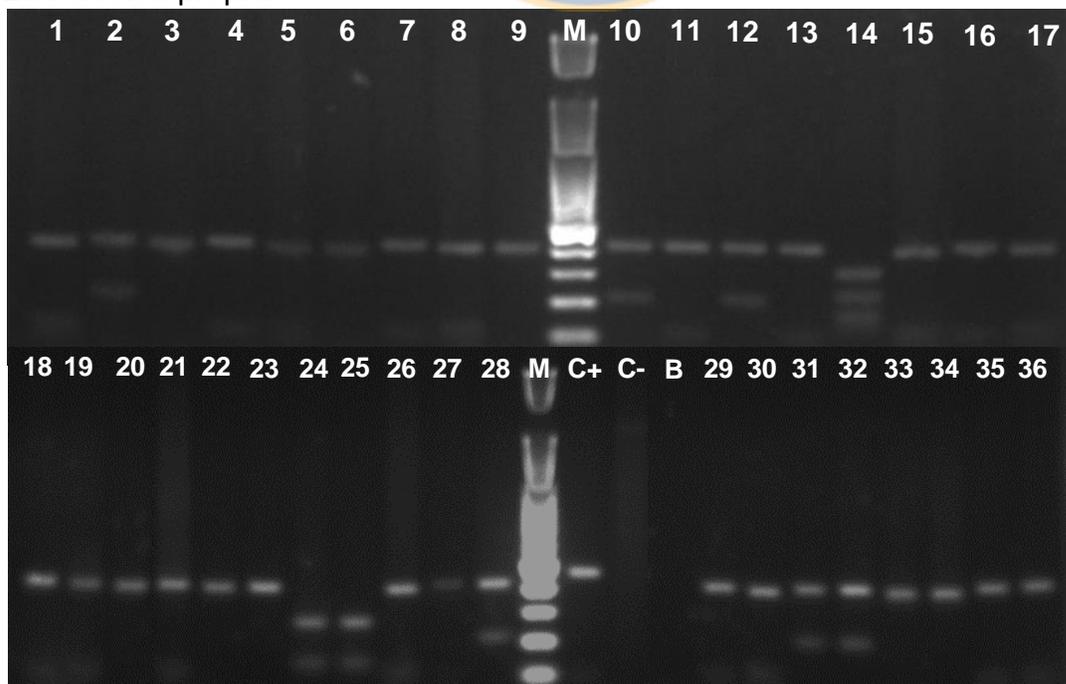


Figura 11. Electroforesis de los aislados de levaduras de alimentos mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa HhaI. 1: queso, 2: helado, 3: quesillo, 4: quesillo, 5: quesillo, 6: quesillo, 7: tomate, 8: tomate, 9: tomate, M: marcador de peso molecular, 10: zapallo italiano, 11: zapallo italiano, 12: diente de dragón, 13: espinaca, 14: salchicha de pavo, 15: lechuga, 16: naranja, 17: manzana, 18: conserva de duraznos, 19: queso, 20: queso, 21: queso, 22: salame, 23: mandarina, 24: miel, 25: miel, 26: jamón, 27: jamón, 28: jamón, M: marcador de peso molecular, C+: *C. albicans*, C-: *E. coli*, B: blanco, 29: espárragos, 30: berenjena, 31: espinaca, 32: limón, 33: limón, 34: dulce de membrillo, 35: limón, 36: salame. Fuente: Elaboración propia.



Figura 12. Electroforesis de los aislados de levaduras de alimentos mediante PCR-RFLP utilizando la endonucleasa HinfI. 1: queso, 2: helado, 3: quesillo, 4: quesillo, 5: quesillo, 6: quesillo, 7: tomate, 8: tomate, 9: tomate, M: marcador de peso molecular, 10: zapallo italiano, 11: zapallo italiano, 12: diente de dragón, 13: espinaca, 14: salchicha de pavo, 15: lechuga, 16: naranja, 17: manzana, 18: conserva de duraznos, 19: queso, 20: queso, 21: queso, 22: salame, 23: mandarina, 24: miel, 25: miel, 26: jamón, 27: jamón, 28: jamón, M: marcador de peso molecular, C+: *C. albicans*, C-: *E. coli*, B: blanco, 29: espárragos, 30: berenjena, 31: espinaca, 32: limón, 33: limón, 34: dulce de membrillo, 35: limón, 36: salame. Fuente: Elaboración propia.

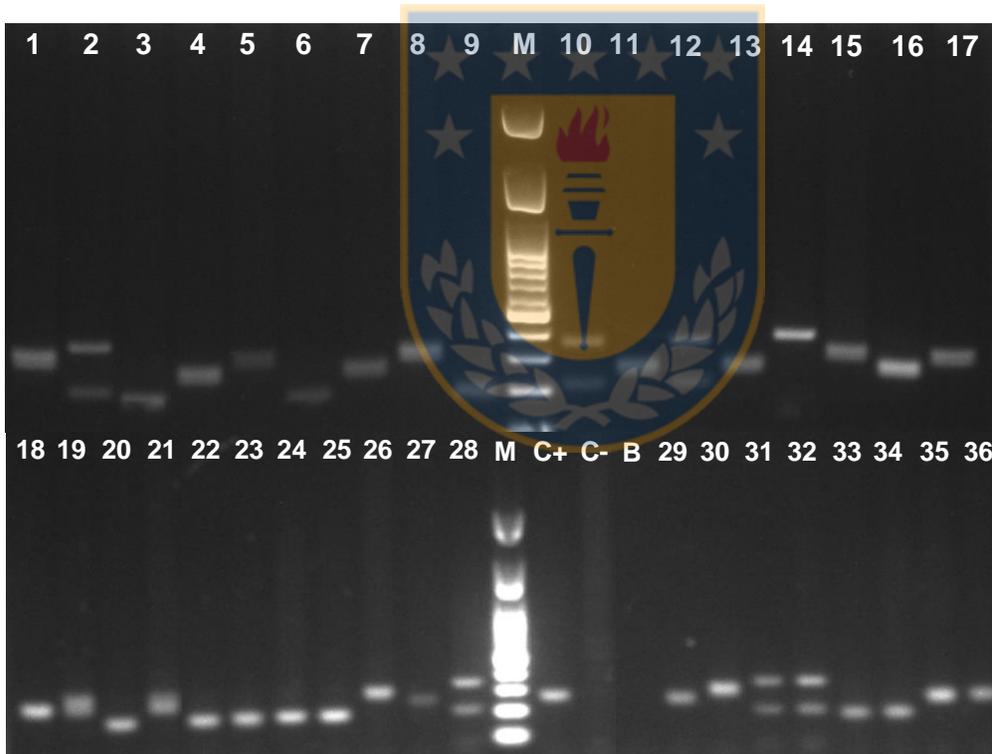


Tabla 2. Clasificación de los 36 aislados de levaduras de alimentos de acuerdo con su patrón de PCR-RFLP. Fuente: Elaboración propia.

Fragmento de restricción (PB)					
Grupo RFLP	Levaduras aisladas	Fuentes (N° de muestra)	Hhal	Haelll	Hinfl
1	<i>Rhodotorula graminis</i>	Salchicha de pavo (14)	390, 160	300, 210, 150	380, 130
2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Lechuga (15), queso (1), jamón (26), berenjena (30), manzana (17), espinaca (13), quesillo (5), tomate (8)	300, 270	450, 150	300
3	<i>Wickerhamiella sorbophila</i>	Duraznos en conserva (18), queso (19), naranja (16)	300, 200	430, 120	250
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Miel (24;25)	170	260, 135	200
5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Zapallo italiano (11), jamón (27), quesillo (4), tomate (7)	310, 230	425, 130	250
6	<i>Candida orthopsilosis</i>	Espinaca (31), limón (32), diente de dragón (12), jamón (28), zapallo italiano (10)	300, 250	400, 200	350, 220
7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Limón (33), dulce de membrillo (34), salame (22)	200, 100	350	200
8	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Espárragos (29), limón (35), queso (21), salame (36)	300, 200	400	280
9	<i>Candida orthopsilosis</i>	Mandarina (23)	200	400	200
10	n/s	Queso (20), tomate (9)	310	440, 140	200
11	n/s	Helado de vainilla (2)	300, 250	440, 240	370, 200
12	<i>Candida orthopsilosis</i>	Quesillo (3), quesillo (6)	320	430	200

*n/s: no secuenciado

Tabla 3. Frecuencia de gen 16S rDNA en el grupo de 21 aislados de levaduras de frutas, verduras y miel. Fuente: Elaboración propia.

Muestras (n=21)	Grupo RFLP	Secuencia resultado de 26S rDNA D1/D2	16S rDNA
Berenjena	2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	+
Esparragos	8	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-
Espinaca	2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	-
Espinaca	6	<i>Candida orthopsilosis</i>	+
Lechuga	2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	-
Naranja	3	<i>Wickerhamiella sorbophila</i>	+
Manzana	2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	-
Conserva de duraznos	3	<i>Wickerhamiella sorbophila</i>	+
Tomate	5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+
Tomate	2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	-
Tomate	10	n/s	-
Zapallo italiano	6	<i>Candida orthopsilosis</i>	-
Zapallo italiano	5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+
Diente de dragón	6	<i>Candida orthopsilosis</i>	-
Mandarina	9	<i>Candida orthopsilosis</i>	+
Limón	6	<i>Candida orthopsilosis</i>	-
Limón	7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+
Limón	8	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-
Dulce de membrillo	7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-
Miel	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
Miel	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-

*n/s: no secuenciado

Tabla 4. Frecuencia de gen 16S rDNA en el grupo de 6 aislados de levaduras de embutidos de carne. Fuente: Elaboración propia.

Muestras (n=6)	Grupo RFLP	Secuencia resultado de 26S rDNA D1/D2	16S rDNA
Salchicha de pavo	1	<i>Rhodotorula graminis</i>	+
Jamón de cerdo	2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	-
Jamón de cerdo	5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-
Jamón de cerdo	6	<i>Candida orthopsilosis</i>	-
Salame de cerdo	7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-
Salame de cerdo	8	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-

Tabla 5. Frecuencia de gen 16S rDNA en el grupo de 9 aislados de levaduras de lácteos. Fuente: Elaboración propia.

Muestras (n=9)	Grupo RFLP	Secuencia resultado de 26S rDNA D1/D2	16S rDNA
Queso	2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	+
Queso	3	<i>Wickerhamiella sorbophila</i>	-
Queso	8	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-
Queso	10	n/s	-
Helado de vainilla	11	n/s	-
Quesillo	12	<i>Candida orthopsilosis</i>	+
Quesillo	5	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	-
Quesillo	2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	-
Quesillo	12	<i>Candida orthopsilosis</i>	-

DISCUSIÓN

Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos siguen siendo considerados un desafío para la salud pública (Baraketi *et al.*, 2018), siendo necesario evaluar las medidas de prevención de estas. Dentro de las nuevas directrices para la prevención está la importancia de la ecología microbiana, principalmente en los hábitats donde se pueden mantener los patógenos dentro de la cadena de producción de alimentos (Schlundt, 2002). En consecuencia, se han publicado diferentes estudios para entender los mecanismos de sobrevivencia de las bacterias estudiadas, entre estos destaca la interacción con diversos tipos de células eucariotas (Henke *et al.*, 2015; Lamond & Freitag, 2018). En este contexto, ha surgido la investigación sobre la interacción de *H. pylori* con *C. albicans* y levaduras de alimentos, determinando que *H. pylori* puede ingresar a las levaduras estudiadas (Salmanian *et al.*, 2012; Siavoshi *et al.*, 2013). Es por esto, que nuestro enfoque fue evaluar si existe internalización de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enterica* y *S. aureus* en *C. albicans* y en otras levaduras de alimentos.

Los resultados indicaron que es posible la internalización entre las bacterias estudiadas y *C. albicans* ya que se logró evidenciar en todos los co-cultivos la presencia de CB viables dentro de la levadura. En nuestras observaciones de microscopía óptica pudimos hallar diferentes levaduras con la presencia de más de tres CB dentro de cada una de ellas, esto nos sugiere una posible multiplicación de las bacterias dentro de la levadura, esto ocurrió en todos los co-cultivos experimentales. Anteriormente, se ha descrito que *L. monocytogenes* es capaz de ingresar a otras células eucariontes como las amebas, pudiendo sobrevivir y multiplicarse dentro de ellas (Huws *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010). Zhou *et al.* (2007), demostraron mediante TEM que *L. monocytogenes* puede sobrevivir a la predación de *Acanthamoeba castellanii*. Pushkareva *et al.* (2019), mencionan que los protozoos infectados con *L. monocytogenes* actúan como caballo de troya debido a que no solo puede infectar, sino que también replicarse luego de 24 horas de co-cultivo en conjunto con *Tetrahymena pyriformis* y *Amoeba proteus*. Además,

estudios previos han señalado que *S. enterica* es capaz de sobrevivir hasta 3 semanas en el citosol de *A. castellanii* y se sugiere que hasta 3 meses cuando la ameba está en forma de quiste (Lambrecht *et al.*, 2015). Esta misma investigación también evaluó *E. coli* en la forma quística de *A. castellanii*, llegando a la conclusión que esta sobrevive solo 3 días, no pudiendo ser recuperada *in vitro* debido probablemente al agotamiento de nutrientes que se produce cuando la ameba se enquista. En el caso de *S. aureus*, este es capaz de persistir y crecer intracelularmente dentro de *Acanthamoeba polyphaga* con un alto recuento celular sin causar la lisis de ésta (Anacarso *et al.*, 2012). De otra forma, se ha investigado que cuando *S. aureus* está en una biopelícula con *C. albicans*, éste se asocia a las hifas de la levadura y además hay un aumento de L-lactato deshidrogenasa 1 responsable de la resistencia a estresores oxidativos derivados del huésped y una disminución de CodY que está asociado con factores de virulencia de la bacteria (Peters *et al.*, 2010).

En el presente estudio no se logró realizar el crecimiento en agares específicos de las CB que se encontraban dentro de la levadura de los distintos co-cultivos. Se ha descrito que las CB endosimbiontes de amebas no son cultivables en medios bacteriológicos estándar en una variedad de agares nutritivos, solo pueden ser cultivadas en amebas (Marciano-Cabral, 2004). En este contexto, Silva (2018) realizó la ruptura de las levaduras para realizar el cultivo de *H. pylori* intravacuolar obteniendo resultados desfavorables. En otro estudio realizado con amebas, no se pudieron recuperar células viables de *L. monocytogenes* de los quistes de *A. castellanii* después de 34 días, por lo que se sugirió que las bacterias internalizadas, si están presentes, podrían haber muerto dentro de ese período de tiempo (Lambrecht *et al.*, 2015). Por el contrario, Heydari *et al.* (2020) evaluaron la probabilidad de la liberación de endobacterias en el género *Candida* y *Saccharomyces*, para esto realizaron ensayos de estrés por envejecimiento del cultivo de las levaduras durante 4 semanas en agar BHI y ensayos de estrés por inanición en agua destilada por el mismo tiempo. Finalmente, se observó después

de 7 días, bacterias en la parte superior del crecimiento de las levaduras. Éstas correspondieron al género *Staphylococcus*, *Cellulomonas* y *Arthrobacter*.

Por otra parte, los resultados de PCR de los co-cultivos, mostraron la presencia de genes para *L. monocytogenes* y *S. enterica*. Sin embargo, no se logró detectar los genes para *E. coli* y *S. aureus*. No obstante, como anteriormente se mencionó, ambas bacterias pueden internalizarse en amebas, por lo tanto, podría estar sucediendo que un gran número de endobacterias de estos co-cultivos no logren sobrevivir a las 14 resiembras realizadas en agar GYC o bien, que el rendimiento de ADN bacteriano extraído de estas muestras no fue el óptimo, por lo que se sugiere la revisión de la metodología para la lisis de levaduras ya que el método de extracción de ADN para bacterias que se encuentran dentro de una levadura es complejo debido a la estructura propia de las levaduras (Rodriguez & Vaneechoutte, 2019). Por ende, lo más correcto sería realizar un testeó de varias metodologías que combinen tanto el rompimiento de la pared celular de la levadura más el rompimiento de la pared celular bacteriana. En nuestro caso, utilizamos microperlas de vidrio y luego el Kit de extracción de ADN bacteriano ya que fue la forma en que se obtuvieron mejores resultados. A pesar de ello, es un método tedioso ya que se debe analizar en cada ciclo si hay lisis de levaduras mediante microscopía óptica antes del uso del kit de extracción de ADN bacteriano. Salmanian *et al.* (2012) usaron para el rompimiento de las levaduras, perlas de vidrio lavadas con ácido y tampón TE (Tris-HCl - EDTA) junto con un protocolo diferente para la extracción de ADN. Agregado a esto, se han comparado diferentes métodos para lisar las células de *C. albicans* eficientemente y obtener un mejor rendimiento de ADN extraído, siendo uno de los más efectivos bead beating horizontal en buffer de lisis RiboPure™ seguido por la extracción de ARN con el Kit de levadura RiboPure™ (Rodriguez & Vaneechoutte, 2019).

De otra forma, es importante recalcar que en este estudio se utilizaron primers específicos a una temperatura de alineamiento promedio de 60°C para todas las bacterias testeadas (Kim *et al.*, 2007), sin embargo, se podría realizar una estandarización en la temperatura de alineamiento de estos primers para aumentar la sensibilidad de la técnica.

Adicionalmente, las imágenes de TEM de este estudio lograron evidenciar que las levaduras de la resiembra 14° del co-cultivo *Listeria-Candida* contenían CB baciliformes los cuales correspondieron a *L. monocytogenes*, por lo tanto, *C. albicans* podría estar contribuyendo a la diseminación de la bacteria al igual que las amebas. Además, *L. monocytogenes* se puede observar en el citosol de la levadura como también se ha observado en amebas mediante la misma técnica (Lambrecht *et al.*, 2015). Se sugiere que la ubicación de la bacteria en el citosol podría indicar que está actuando la enzima Listeriolisina O (LLO) de *L. monocytogenes* dentro de la levadura. Esta enzima se encuentra más activa en condiciones ácidas (pH 5.5), por lo tanto, cuando el fagosoma disminuye el pH, LLO es capaz de causar la lisis de la membrana (Ray *et al.*, 2009). Para el caso de protozoos, se ha demostrado que LLO es un factor vital para la sobrevivencia de *L. monocytogenes* ya que es producida al interior de *A. proteus* y *T. pyriformis* generando efectos negativos en el crecimiento de los protozoos (Pushkareva *et al.*, 2019). También, en las micrografías se apreciaron levaduras del co-cultivo *L. monocytogenes* y *C. albicans* con un aumento del tamaño vacuolar, esto podría ser consecuencia de que las levaduras no se encuentran en óptimas condiciones, ya que se ha relacionado un tamaño anormal de la vacuola a pérdida de la integridad y función vacuolar (Tournu *et al.*, 2017).

Hasta la fecha, es el primer estudio que demuestra la internalización de bacterias asociadas a enfermedades de transmisión alimentaria dentro de una levadura, no obstante, estudios previos han descrito la presencia de *H. pylori* en *C. albicans* y levaduras de alimentos (Salmanian *et al.*, 2012). De hecho, se ha sugerido que las levaduras podrían proveer nutrientes de la vacuola para la sobrevivencia de las endobacterias y un ambiente adecuado cuando éstas se encuentren en condiciones de estrés ambiental (Siavoshi *et al.*, 2019). Este fenómeno en *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *S. aureus* y *E.coli* podría sugerir una capacidad para que las bacterias resistan a la fagocitosis y se internalicen en otros tipos de levaduras. En contraste, la coexistencia de múltiples microorganismos en plantas procesadoras de alimentos puede traer como consecuencia la interacción entre bacterias de transmisión

alimentaria y levaduras como *C. albicans* (Agustín & Brugnoli, 2018). Como ya es conocido *A. polyphaga* puede ser un vector para la transmisión de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* y otras bacterias de transmisión alimentaria ya que son capaces de sobrevivir a la fagocitosis y multiplicarse dentro de la ameba (Anacarso *et al.*, 2012). Asimismo, se han encontrado relaciones sinérgicas entre bacterias y levaduras: por ejemplo entre *L. monocytogenes* y biofilms de *C. tropicalis* y *C. krusei*, donde hay un aumento del recuento de la bacteria en presencia de estas especies provenientes del equipo de procesamiento de jugo de manzana (Agustín & Brugnoli, 2018). En el presente estudio, un 33% de los aislados de levaduras fueron positivos al gen PCR 16S rDNA, por lo tanto, esto podría indicar la presencia de bacterias intra-levaduras. Los aislados de levaduras positivos al gen 16S rDNA que se encontraron con mayor frecuencia fueron *M. guilliermondii* y *C. orthopsilosis*, estas fueron relacionadas en diferentes grupos RFLP, *M. guilliermondii*: RFLP 5,7 y 8 y *C. orthopsilosis*: RFLP 6,9 y 12, las que provienen a diferentes fuentes de alimentos analizadas. Se ha descrito que en algunas especies de levaduras existen más de un patrón RFLP reportado, esto se puede deber a factores como la forma de medir los tamaños de los fragmentos de restricción (manual o software) y a la variación en la corrida del gel de electroforesis (Segura *et al.*, 2010). De forma similar Siavoshi *et al.* (2018) encontraron grupos RFLP distintos para la misma fuente, en este caso fueron diferentes sitios de muestreo de la fuente, específicamente la flor y del fruto de *Prunus subg. Prunus* obteniéndose diferentes patrones RFLP. Por otro lado, en el mismo estudio se determinó la presencia de *C. glabrata* positiva al gen *H. pylori*-16S rDNA en miel, mientras que este estudio detectó *S. cerevisiae* negativa al gen 16S rDNA en miel. En el resultado de PCR-RFLP, se obtuvieron 2 colonias con características distintas de *S. cerevisiae* en el mismo grupo. En este caso, la técnica no fue capaz de discriminar cepas estrechamente relacionadas. Se ha descrito que aquellas especies en donde el patrón generado con estas enzimas es el mismo, es necesario utilizar otras endonucleasas que generen patrones de polimorfismo diferentes para cada especie, por ejemplo, se propone el uso de HpaII y SbfI para la diferenciación de *S. cerevisiae* de *S. paradoxus* (Segura *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta que las levaduras predominan entre las comunidades microbianas y principalmente en alimentos fermentados y en aquellos con pH bajo, alta concentración de azúcar y baja actividad de agua (Agustin *et al.*, 2019; Siavoshi & Saniee, 2014), podemos sugerir sobre un posible rol de *Candida* u otras levaduras en la contaminación de algunos tipos de alimentos de estas características por patógenos transmitidos por alimentos. El rol de esta interacción aún no es claro. En el caso de *H. pylori*, se han estudiado diferentes factores de estrés ambiental que podrían gatillar en la endosimbiosis de la bacteria en la levadura, entre ellos el uso de antibióticos en el medio, cambios de pH y de temperatura (Belmar, 2019; Siavoshi & Saniee, 2014; Tavakolian *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha descrito que *L. monocytogenes*, puede cambiar de un estilo de vida saprofito a uno patógeno en diferentes condiciones, como lo es la temperatura y pH entre otros (Freitag *et al.*, 2009), sin embargo, aún no está claro como ocurre la internalización de *L. monocytogenes* en protozoos o levaduras. A pesar de esto, se ha postulado que, a temperaturas sobre 30°C, el factor regulador positivo A (PrfA) es capaz de estimular la entrada de la bacteria a una célula eucariota (Gaballa *et al.*, 2019).

De otra forma, se ha investigado el efecto de antifúngicos en la liberación de *Staphylococcus* desde *C. albicans* por adición de anfotericina B en el medio (Tavakolian *et al.*, 2018). La anfotericina B se une al ergosterol en la membrana celular de la levadura y aumenta la permeabilidad de esta desencadenando en la fuga de componentes intracelulares (Gintjee *et al.*, 2020).

En suma, se conoce que la interacción entre bacterias y amebas ha proporcionado que los microorganismos bacterianos intracelulares se hayan adaptado para sobrevivir a estos depredadores ambientales y a la competencia de nutrientes en el ambiente (Hilbi *et al.*, 2007). Además, se ha estudiado que esta interacción mejora el potencial de virulencia y la resistencia a biocidas y antibióticos de las bacterias e incluso en el mantenimiento de microorganismos patógenos en el medio ambiente lo que podría contribuir a la transmisión en humanos (Anacarso *et al.*, 2012; Lambrecht *et al.*, 2015).

Finalmente, como se mencionó anteriormente las bacterias estudiadas pueden infectar células de distinto linaje, esto también podría ser posible en levaduras de

alimentos. Por lo tanto, las levaduras podrían servir como reservorio de células bacterianas, las cuales incluso se podrían traspasar a la siguiente generación de levaduras y permanecer por mucho tiempo en este ciclo (Bianciotto *et al.*, 2004). Por ende, se propone que esta endosimbiosis podría ocurrir en levaduras de alimentos, donde es probable que estas endobacterias no sean detectadas por los protocolos de cultivo estándar utilizado en alimentos. Por ello, se requiere más información para la comprensión de los factores que pueden desencadenar la internalización de estas bacterias y así poder prevenirlos.

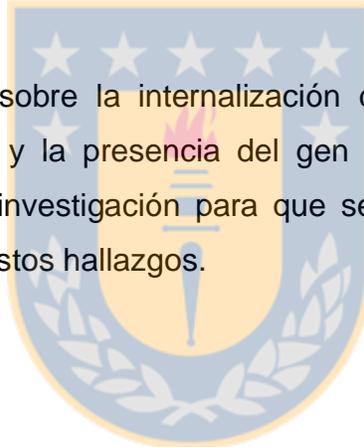


CONCLUSIONES

- *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* o *S. enterica* Serovar Typhimurium son capaces de internalizarse en *C. albicans in vitro*, donde las CB conservan su viabilidad dentro de la levadura durante un período prolongado de tiempo.
- Fue posible aislar y tipificar los aislados de levaduras de muestras de alimentos en diferentes grupos.
- Se detectó la presencia de bacterias en aislados de levaduras de alimentos.
- No se detectaron bacterias de transmisión alimentaria dentro de los aislados de levaduras.

PROYECCIÓN

La información entregada sobre la internalización de bacterias de transmisión alimentaria en *C. albicans* y la presencia del gen 16S rDNA en levaduras de alimentos, requiere mayor investigación para que se puedan establecer nuevas metodologías que apoyen estos hallazgos.



BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Vinas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 121-129. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>
- ACHIPIA. (2016). Situación de las enfermedades de transmisión alimentaria en Chile. Retrieved from <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2016/03/Silvia-Baeza-Minsal-Situacion-de-las-Enfermedades-de-Transmision-Alimentaria-en-Chile-1.pdf>
- Agustín, M. d. R., & Brugnoli, L. (2018). Multispecies biofilms between *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* with resident microbiota isolated from apple juice processing equipment. 38(5), e12499. doi:<https://doi.org/10.1111/jfs.12499>
- Agustin, M. D. R., Viceconte, F. R., Vela Gurovic, M. S., Costantino, A., & Brugnoli, L. I. (2019). Effect of quorum sensing molecules and natamycin on biofilms of *Candida tropicalis* and other yeasts isolated from industrial juice filtration membranes. *Journal of Applied Microbiology*, 126(6), 1808-1820. doi:<https://doi.org/10.1111/jam.14248>
- Anacarso, I., de Niederhausern, S., Messi, P., Guerrieri, E., Iseppi, R., Sabia, C., & Bondi, M. (2012). *Acanthamoeba polyphaga*, a potential environmental vector for the transmission of food-borne and opportunistic pathogens. *Journal of Basic Microbiology*, 52(3), 261-268. doi:<https://doi.org/10.1002/jobm.201100097>
- Atilgan, E., Magidson, V., Khodjakov, A., & Chang, F. (2015). Morphogenesis of the Fission Yeast Cell through Cell Wall Expansion. *Current biology : CB*, 25(16), 2150-2157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.059>
- Bandara, H. M., Cheung, B. P., Watt, R. M., Jin, L. J., & Samaranayake, L. P. (2013). Secretory products of *Escherichia coli* biofilm modulate *Candida* biofilm formation and hyphal development. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 4(3), 186-199. doi:<https://doi.org/10.1111/jicd.12048>
- Baraketi, A., Salmieri, s., & Lacroix, m. (2018). Foodborne Pathogens Detection: Persevering Worldwide Challenge. In *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis*: IntechOpen.
- Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile %J Revista chilena de infectología. 33, 547-557.
- Batt, C. A. (2014). *Listeria monocytogenes*. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*: Elsevier Inc.
- Belmar, L. (2019). *Utilización de antibióticos como factor de estrés para el ingreso de H. pylori J99 en C. albicans ATCC10231*. (Magíster en Ciencias con Mención Microbiología), Universidad de Concepción, Chile.
- Boekhout, T., & Robert, V. (2003). *Yeasts in Food*: Woodhead Publishing.

- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naitali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(Pt B), 167-178. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Bunning, V. K., Donnelly, C. W., Peeler, J. T., Briggs, E. H., Bradshaw, J. G., Crawford, R. G., Beliveau, C. M., & Tierney, J. T. (1988). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 364-370.
- De Filippis, F., Laiola, M., Blaiotta, G., & Ercolini, D. (2017). Different Amplicon Targets for Sequencing-Based Studies of Fungal Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17). doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.00905-17>
- DEIS. (2019). Brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Chile, periodo años 2011-2018. Retrieved from https://public.tableau.com/profile/deis4231#!/vizhome/BrotesdeEnfermedadesTransmitidasporAlimentoETA_Aos2011-2017/BrotesETACHile2011-2017
- Díaz, T., Valdés, M., Caballero, A., & Monterrey, P. (2012). Enfermedades transmitidas por alimentos. Causas más frecuentes en los niños. *Hosp. Pediátrico "Juan Man. Marquez"*, 2-44.
- Dominguez-Gortaire, J. A. (2014). *Identificación molecular de cuatro bacterias proteolíticas extraídas del tracto digestivo de Eisenia foetida*. (INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA), Universidad de las fuerzas armadas, Ecuador.
- Edwards, A. M., & Massey, R. C. (2011). How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream? *Trends in Microbiology*, 19(4), 184-190. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.12.005>
- FAO. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods : technical report. In *Microbiological risk assessment series* (Vol. 5).
- Freitag, N. E., Port, G. C., & Miner, M. D. (2009). *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews: Microbiology*, 7(9), 623-628. doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro2171>
- Gaballa, A., Guariglia-Oropeza, V., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2019). Cross Talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* Facilitates Transitions between Extra- and Intracellular Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(4). doi:<https://doi.org/10.1128/mnbr.00034-19>
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 5, 391. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>
- Gintjee, T. J., Donnelley, M. A., & Thompson, G. R., 3rd. (2020). Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. *J Fungi (Basel)*, 6(1). doi:<https://doi.org/10.3390/jof6010028>
- Graziani, C., Losasso, C., Luzzi, I., Ricci, A., Scavia, G., & Pasquali, P. (2017). Chapter 5 - *Salmonella*. In C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases (Third Edition)* (pp. 133-169): Academic Press.

- Henke, D., Rupp, S., Gaschen, V., Stoffel, M. H., Frey, J., Vandeveld, M., & Oevermann, A. (2015). *Listeria monocytogenes* spreads within the brain by actin-based intra-axonal migration. *Infection and Immunity*, 83(6), 2409-2419. doi:<https://doi.org/10.1128/iai.00316-15>
- Heydari, S., Siavoshi, F., Ebrahimi, H., Sarrafnejad, A., & Sharifi, A. H. (2020). Excision of endosymbiotic bacteria from yeast under aging and starvation stresses. *Infection, Genetics and Evolution*, 78, 104141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104141>
- Hilbi, H., Weber, S. S., Ragaz, C., Nyfeler, Y., & Urwyler, S. (2007). Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environmental Microbiology*, 9(3), 563-575. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01238.x>
- Huws, S. A., Morley, R. J., Jones, M. V., Brown, M. R., & Smith, A. W. (2008). Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. *FEMS Microbiology Letters*, 282(2), 258-265. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01123.x>
- James, J., Martin, L., & David, G. (2005). *Modern Food Microbiology* (7 ed.): Springer US.
- Jimenez-Soto, L. F., Rohrer, S., Jain, U., Ertl, C., Sewald, X., & Haas, R. (2012). Effects of cholesterol on *Helicobacter pylori* growth and virulence properties in vitro. *Helicobacter*, 17(2), 133-139. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00926.x>
- Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int*, 2014, 827965. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/827965>
- Kang, S. W., Jeon, B. Y., Hwang, T. S., & Park, D. H. (2009). Symbiotic relationship between *Microbacterium* sp. SK0812 and *Candida tropicalis* SK090404. *Journal of Microbiology*, 47(6), 721-727. doi:<https://doi.org/10.1007/s12275-009-0146-2>
- Kim, J. S., Lee, G. G., Park, J. S., Jung, Y. H., Kwak, H. S., Kim, S. B., Nam, Y. S., & Kwon, S. T. (2007). A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1656-1662. doi:<https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.7.1656>
- Laczko, I., Teoh, W. P., Flury, S., Grayczyk, J. P., Zorzoli, A., & Alonzo, F., 3rd. (2018). Increased flexibility in the use of exogenous lipoic acid by *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.1111/mmi.13970>
- Lambrecht, E., Bare, J., Chavatte, N., Bert, W., Sabbe, K., & Houf, K. (2015). Protozoan Cysts Act as a Survival Niche and Protective Shelter for Foodborne Pathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5604-5612. doi:<https://doi.org/10.1128/aem.01031-15>
- Lamond, N. M., & Freitag, N. E. (2018). Vertical Transmission of *Listeria monocytogenes*: Probing the Balance between Protection from Pathogens and Fetal Tolerance. *Pathogens*, 7(2). doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens7020052>

- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>
- Li, K., Ye, S., Alali, W. Q., Wang, Y., Wang, X., Xia, X., & Yang, B. (2017). Antimicrobial susceptibility, virulence gene and pulsed-field gel electrophoresis profiles of Salmonella enterica serovar Typhimurium recovered from retail raw chickens, China. *Food Control*, 72, 36-42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.032>
- Marciano-Cabral, F. (2004). Introductory remarks: bacterial endosymbionts or pathogens of free-living amebae1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(5), 497-501. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00276.x>
- McLauchlin, J., & Rees, C. E. D. (2015). *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-29).
- Nelson, K. E., Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Ravel, J., DeBoy, R. T., Kolonay, J. F., Rasko, D. A., Angiuoli, S. V., Gill, S. R., Paulsen, I. T., Peterson, J., White, O., Nelson, W. C., Nierman, W., Beanan, M. J., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Madupu, R., Haft, D. H., Selengut, J., Van Aken, S., Khouri, H., Fedorova, N., Forberger, H., Tran, B., Kathariou, S., Wonderling, L. D., Uhlich, G. A., Bayles, D. O., Luchansky, J. B., & Fraser, C. M. (2004). Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Research*, 32(8), 2386-2395. doi:10.1093/nar/gkh562
- Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A. L., Virgilio, S., & Celano, G. V. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 219-222. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.006>
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43 Spec No, 93-100.
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(2), 115-129. doi:<https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115>
- OMS. (2017). Lista de bacterias para las cuales se necesita urgentemente nuevos antibióticos. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OMS. (2018). Salmonella (no tifoidal) Retrieved from [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- OMS. (2019). Inocuidad de los alimentos. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

- Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N., & Nostro, A. L. (2007). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control*, 18(3), 196-200. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.09.013>
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 493-503. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00710.x>
- Pushkareva, V. I., Podlipaeva, J. I., Goodkov, A. V., & Ermolaeva, S. A. (2019). Experimental *Listeria-Tetrahymena-Amoeba* food chain functioning depends on bacterial virulence traits. *BMC Ecology*, 19(1), 47. doi:<https://doi.org/10.1186/s12898-019-0265-5>
- Querol, A., & Fleet, G. (2006). *Yeasts in Food and Beverages* (A. Querol & G. Fleet Eds.): Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rabsch, W., Fruth, A., Simon, S., Szabo, I., & Malorny, B. (2015). The zoonotic agent *Salmonella*. In A. Sing (Ed.), *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health Aspects* (pp. 179-211). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J., & Tang, C. M. (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nature Reviews: Microbiology*, 7(5), 333-340. doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro2112>
- Rees, C. E. D., Doyle, L., & Taylor, C. M. (2017). Chapter 12 - *Listeria monocytogenes*. In C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases (Third Edition)* (pp. 253-276): Academic Press.
- Rodriguez, A., & Vaneechoutte, M. (2019). Comparison of the efficiency of different cell lysis methods and different commercial methods for RNA extraction from *Candida albicans* stored in RNAlater. *BMC Microbiology*, 19(1), 94. doi:<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1473-z>
- RSA. (2019). *Reglamento sanitario de los alimentos (dto. 977/96)*: Minsal.
- Salmanian, a.-h., Siavoshi, f., Beyrami, z., Latifi-navid, s., Tavakolian, a., & Sadjadi, a. (2012). Foodborne yeasts serve as reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Journal of Food Safety*, 32(2), 152-160. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00362.x>
- Scheutz, F., & Strockbine, N. A. (2015). *Escherichia*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-49).
- Schleifer, K. H., & Bell, J. A. (2015). *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-43).
- Schlundt, J. (2002). New directions in foodborne disease prevention. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 3-17. doi:[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00234-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00234-9)
- Schonauer, M. S., Kastaniotis, A. J., Kursu, V. A., Hiltunen, J. K., & Dieckmann, C. L. (2009). Lipoic acid synthesis and attachment in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23234-23242. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.015594>

- Segura, G., Luis, E., Manuel, R., Flores, B., Ericka, P., Gschaedler, M., & Anne, C. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. *e-Gnosis*, 8, 1-12.
- Siavoshi, F., Heydari, S., Shafiee, M., Ahmadi, S., Saniee, P., Sarrafnejad, A., & Kolahdoozan, S. (2019). Sequestration inside the yeast vacuole may enhance *Helicobacter pylori* survival against stressful condition. *Infection, Genetics and Evolution*, 69, 127-133.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.029>
- Siavoshi, F., Sahraee, M., Ebrahimi, H., Sarrafnejad, A., & Saniee, P. (2018). Natural fruits, flowers, honey, and honeybees harbor *Helicobacter pylori*-positive yeasts. *Helicobacter*, 23(2), e12471.
doi:<https://doi.org/10.1111/hel.12471>
- Siavoshi, F., & Saniee, P. (2014). Vacuoles of *Candida* yeast as a specialized niche for *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), 5263-5273. doi:<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5263>
- Siavoshi, F., Taghikhani, A., Malekzadeh, R., Sarrafnejad, A., Kashanian, M., Jamal, A. S., Saniee, P., Sadeghi, S., & Sharifi, A. H. (2013). The role of mother's oral and vaginal yeasts in transmission of *Helicobacter pylori* to neonates. *Archives of Iranian Medicine*, 16(5), 288-294.
doi:<https://doi.org/013165/aim.009>
- Silva, F. (2018). *Determinación de la capacidad invasora de Helicobacter pylori intracelular en Candida albicans, en células de adenocarcinoma gástrico (AGS)*. Universidad de Concepción,
- Smith, J. L., & Fratamico, P. M. (2017). Chapter 7 - *Escherichia coli* as a Pathogen*. In C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases (Third Edition)* (pp. 189-208): Academic Press.
- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia %J Revista Salud Uninorte. 32, 105-122.
- Stewart, G. C. (2017). Chapter 18 - Staphylococcal Food Poisoning. In C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases (Third Edition)* (pp. 367-380): Academic Press.
- Tarifa, M. C., Lozano, J. E., & Brugnoli, L. I. (2017). *Candida krusei* isolated from fruit juices ultrafiltration membranes promotes colonization of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on stainless steel surfaces. *Journal of Microbiology*, 55(2), 96-103. doi:<https://doi.org/10.1007/s12275-017-6300-3>
- Tavakolian, A., Siavoshi, F., & Eftekhari, F. (2018). *Candida albicans* Release Intracellular Bacteria When Treated With Amphotericin B. *Archives of Iranian Medicine*, 21(5), 191-198.
- Taylor, S. L. (2017). *Disease Processes in Foodborne Illness*. Elsevier Inc.: Foodborne Diseases: Third Edition.
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S. P., & Maillard, J. Y. (2010). Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3), 231-259.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x>

- Tournu, H., Carroll, J., Latimer, B., Dragoi, A.-M., Dykes, S., Cardelli, J., Peters, T. L., Eberle, K. E., & Palmer, G. E. (2017). Identification of small molecules that disrupt vacuolar function in the pathogen *Candida albicans*. *PloS One*, 12(2), e0171145-e0171145.
doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171145>
- Ulloa, M. (2016). Enfermedades transmitidas por los alimentos en Chile : agentes causantes y factores contribuyentes asociados a brotes ocurridos durante el año 2013. *Universidad de Chile*, 2016, 2-55.
doi:<http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/138263>
- Vale, F. F., & Vitor, J. M. (2010). Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*, 138(1-2), 1-12.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.016>
- Vega, S. (2018). *Determinación in vitro de la endosimbiosis entre Helicobacter pylori J99 y Candida albicans ATCC 90028 como respuesta frente al estrés ácido*. Universidad de Concepción,
- Wernegreen, J. J. (2012). Endosymbiosis. *Current Biology*, 22(14), R555-561.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.010>
- Yan, R., Liu, Y., Gurtler, J. B., Killinger, K., & Fan, X. (2017). Sensitivity of pathogenic and attenuated *E. coli* O157:H7 strains to ultraviolet-C light as assessed by conventional plating methods and ethidium monoazide-PCR. 37(4), e12346. doi:<https://doi.org/10.1111/jfs.12346>
- Zhou, X., Elmore, J., & Call, D. R. (2007). Interactions between the environmental pathogen *Listeria monocytogenes* and a free-living protozoan (*Acanthamoeba castellanii*). *Environmental Microbiology*, 9(4), 913-922.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01213.x>