

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Tipificación molecular y resistencia a
antimicrobianos en *Salmonella enterica*
serotipo Derby procedente de canales de
cerdo y alimentos cárnicos”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR
CRISTINA CUERVO TUERO**

JUNIO, 2013





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo.
España Tel.985106226. Fax985103434.<http://www.unioviedo.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dra. M^a DEL ROSARIO RODICIO RODICIO, Profesora titular de Microbiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que Dña. **CRISTINA CUERVO TUERO** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7^a promoción curso 2012-2013.

Oviedo, 18 de Junio de 2013

D. (Tutor)

V^oB^o

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecerle a Dra M^a del Rosario Rodicio Rodicio la oportunidad de realizar este proyecto, la confianza depositada en mí y el apoyo recibido.

A Raquel García Fierro, por enseñármelo todo, por la paciencia demostrada, por las risas y los grandes momentos que hemos vivido.

A Lidia por ayudarme y animarme en todo momento.

A Vane, Nacho, Marina, Rakia, Javi y al Dr. Mateo por haberme acogido tan bien y por haberme ayudado cada vez que lo necesité.

A mi familia por creer siempre en mí.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
<i>S. enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serotipo Derby	5
Objetivos	6
CONSIDERACIONES TEÓRICAS	7
Características generales de <i>Salmonella</i>	8
Distribución de <i>Salmonella</i> en la naturaleza y rutas de transmisión.....	10
Cuadros clínicos causado por <i>Salmonella</i>	12
Resistencia frente a agentes antimicrobianos.....	13
Métodos de tipificación.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Datos de procedencia de los aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby	24
Medios de cultivo.....	24
Siembra de las bacterias y conservación.....	25
Macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	26
Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos.....	30
Reacción en cadena de la polimerasa.....	31
Secuenciación.....	36
Análisis plasmídico	37

Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos de otros aislamientos de <i>S. enterica</i> procedentes de alimentos	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby	42
Tipificación mediante macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante	42
Análisis fenotípico de la resistencia a antimicrobianos	47
Detección de genes de resistencia a antimicrobianos	50
Detección de Elementos Genéticos Móviles (EGM)	51
Detección de plásmidos.....	54
Análisis de la sensibilidad a antimicrobianos de otros serotipos de <i>S. enterica</i> procedentes de alimentos e identificación de los genes responsables	55
Comparación de <i>S. enterica</i> serotipo Derby con otros serotipos encontrados en alimentos en el Principado de Asturias	61
CONCLUSIONES.....	62
ABREVIATURAS	64
BIBLIOGRAFÍA	68

RESUMEN

RESUMEN

Salmonella enterica subsp. *enterica* serotipo Derby (*S. Derby*) es uno de los serotipos predominantes en ganado porcino, que puede transmitirse a los seres humanos a través de la cadena alimentaria, por el consumo de carne de porcino o derivados cárnicos (chorizos, salchichas, hamburguesas, etc). La mayor parte de las veces *S. Derby* provoca infecciones autolimitadas que no requieren de tratamiento con agentes antimicrobianos, aunque este resulta imprescindible para combatir o prevenir infecciones invasivas en personas inmunocomprometidas, niños y personas de edades avanzadas.

El objetivo de este proyecto fue la tipificación molecular y el estudio de las bases moleculares de las resistencias a antimicrobianos de aislamientos de *S. Derby* procedentes de canales porcinos y alimentos cárnicos recogidos por el Laboratorio de Salud Pública (LSP) del Principado de Asturias entre los años 2008 y 2012.

Se analizaron 14 aislamientos por macrorrestricción-electroforesis de campo pulsante, detectándose 9 perfiles XbaI y 7 BlnI. Las resistencias a ácido nalidíxico y a tetraciclinas, observadas en más de la mitad de los aislamientos estudiados, fueron las más comunes. La resistencia frente a 4 o más grupos de agentes antimicrobianos (multirresistencia) se encontró solamente en 2 aislamientos. En cuanto a la implicación de elementos genéticos móviles en resistencia, los genes *aadA2* y *sull* se localizaron en integrones de clase 1 presentes en tres aislamientos, el gen *tet(A)* en el transposón Tn1721 detectado en 4 aislamientos, el gen *tet(B)* en el transposón Tn10 y el gen *bla_{TEM-1}* en el en el transposón Tn3, encontrados en 1 aislamiento cada uno. El análisis plasmídico mostró 10 perfiles diferentes, 7 de ellos incluyeron un plásmido de gran tamaño, 130 Kb o 90 Kb, acompañado en algunas ocasiones de plásmidos más pequeños.

Los genes de resistencia detectados en *S. Derby* fueron también comunes en otros serotipos de *S. enterica* de la misma procedencia, que fueron incluidos en el trabajo con fines comparativos.

ABSTRACT

Salmonella enterica subsp. *enterica* serotype Derby (*S.* Derby) is one of the predominant serotypes associated with pigs, which can be transmitted to humans through the food chain by eating pork meat or pork products like sausages and hamburgers. Most of the times *S.* Derby causes self-limited infections which do not require antimicrobial treatment. However this become necessary to prevent or combat invasive infections in immunocompromised persons, children and the elderly.

The objective of this project was the molecular typing and the study of the molecular basis of antimicrobial resistance in *S.* Derby recovered from pork carcasses and pork products by the Public Health Laboratory (LSP) of the Principality of Asturias between 2008 and 2012.

14 isolates were analyzed by macrorestriction-pulsed-field electrophoresis, which showed 9 XbaI profiles and 7 BlnI profiles. Resistance to nalidixic acid and tetracycline were the most common, occurring in more than half of the isolates. Resistance to 4 or more groups of antimicrobial agents (multidrug resistance) was found in 2 isolates. Regarding the detection of mobile genetic elements, the *sul1* and *aadA2* genes were located in class 1 integrons, which were carried by 3 isolates, the *tet(A)* gene was located in transposon Tn1721 present in 4 isolates, the *tet(B)* gene in transposon Tn10 and the *bla*_{TEM-1} gene in transposon Tn3, each found in 1 isolate. Plasmid analysis showed 10 different profiles, with 7 including large plasmids of 130 Kb and 90 Kb, sometimes accompanied by smaller plasmids.

The resistance genes found in *S.* Derby were also common in isolates belonging to other serotypes and collected from pork carcasses and pork products in the Principality of Asturias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolución de los casos confirmados de salmonelosis humana en la UE, 2008-2011.

Figura 2: Distribución de los diez serotipos de *Salmonella* más comunes encontrados en humanos en la UE en 2011.

Figura 3: Gráfico de la evolución de la salmonelosis en España desde 1993 hasta 2011.

Figura 4. Célula de *Salmonella* al microscopio electrónico.

Figura 5. Crecimiento de *Salmonella* spp. en medios selectivos y diferenciales: a) medio Hektoen b) medio XLD.

Figura 6: Pared celular de una bacteria Gram negativa y detalle de la estructura del lipopolisacárido.

Figura 7: Rutas de transmisión de los serotipos no tifoideos de *Salmonella*.

Figura 8: Estructura de un integrón genérico.

Figura 9: Estructura de un integrón de clase 1.

Figura 10: Transposón compuesto Tn10.

Figura 11: Transposón complejo Tn3.

Figura 12: Transposón complejo Tn1721.

Figura 13: Plásmido conjugativo con un transposón compuesto Tn10 (resistencia a tetraciclina) y una isla de resistencia plasmídica formada por dos transposones, Tn9 (resistencia a cloranfenicol) y Tn21 (resistencia a mercurio).

Figura 14: Proceso de conjugación con transferencia de un plásmido de una bacteria donadora a una receptora a través del pilus sexual.

Figura 15: Esquema del método de siembra por agotamiento.

Figura 16: Gel de agarosa en cubeta de electroforesis de PFGE.

Figura 17: Forma de disposición de los 9 discos de antimicrobianos en placas de MH.

Figura 18: Fases de la reacción de amplificación mediante PCR.

Figura 19: Esquema de las fases de purificación del DNA para la secuenciación.

Figura 20: Cromatograma.

Figura 21: Crecimiento de *Salmonella enterica* en medio EMB.

Figura 22: Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby.

Figura 23: Dendograma de similitud basado en los perfiles XbaI-PFGE de *S. enterica* serotipo Derby.

Figura 24: Perfiles BlnI-PFGE de aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby.

Figura 25: Dendograma de similitud basado en los perfiles BlnI de *S. enterica* serotipo Derby.

Figura 26: Resultados de las amplificaciones mediante PCR realizadas a partir de los aislamientos que contenían el gen *sull* asociado a integrones de clase 1.

Figura 27: Resultados de las amplificaciones mediante PCR de genes o regiones específicas del transposón Tn10 en el único aislamiento de *S. enterica* serotipo Derby portador del gen *tet(B)*.

Figura 28: Resultados de la amplificación mediante PCR del gen *tnpA* que codifica la transposasa de Tn1721, en los aislamientos que contenían el gen *tet(A)*.

Figura 29: Resultados de la amplificación mediante PCR de genes del trasposón Tn3 en aislamientos que contenían el gen *bla*_{TEM-1}.

Figura 30: Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby utilizados en este estudio.

Tabla 2: Antimicrobianos utilizados, cantidad y criterios de interpretación.

Tabla 3: Componentes de la mezcla de reacción de PCR.

Tabla 4: Oligonucleótidos empleados para la detección de genes de resistencia en los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby.

Tabla 5: Oligonucleótidos empleados para la detección de integrones de clase 1 y de los transposones Tn10, Tn3 y Tn1721 en los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby.

Tabla 6: Aislamientos de *Salmonella enterica* no pertenecientes al serotipo Derby.

Tabla 7: Antimicrobianos utilizados, grupo y mecanismo de actuación.

Tabla 8: Perfiles de resistencia de aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby procedentes de canales porcinos y alimentos cárnicos.

Tabla 9: Características de los aislamientos de *S. entérica* pertenecientes a serotipos distintos del serotipo Derby.

INTRODUCCIÓN

Los serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* se encuentran entre los agentes patógenos más ubicuos en la naturaleza, aunque su principal reservorio es el tracto intestinal de los animales homeotermos desde donde pueden pasar a los seres humanos, considerándose entonces como una zoonosis. Estos serotipos pueden encontrarse en carnes procedentes de aves, ganado vacuno y porcino, derivados cárnicos (chorizos, salchichas hamburguesas, etc.) y otros alimentos de origen animal (huevos, leche y derivados). Su transmisión a menudo se produce por introducción de las bacterias en las zonas de preparación de alimentos y multiplicación en los mismos, debido a las inadecuadas temperaturas de almacenamiento, cocción inadecuada o la contaminación cruzada de productos listos para consumir. Por ello se asocian principalmente a procesos industriales de preparación de alimentos que resultan no ser adecuados. Sin embargo, también pueden transmitirse por contacto directo con animales o humanos infectados o con materiales contaminados con heces.

Los serotipos no tifoideos de *S. enterica* subsp. *enterica* provocan típicamente un cuadro clínico denominado salmonelosis. Estos serotipos constituyen el segundo patógeno zoonótico más importante a nivel mundial, por detrás de *Campylobacter*, provocando millones de casos de gastroenteritis cada año, tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo. En la Unión Europea (UE) en el año 2011 según los datos aportados por EFSA (European Food Safety Authority) y CDC (Centre for Disease Prevention and Control, EEUU), se detectaron un total de 97.897 casos de salmonelosis humana, lo que implica 20,7 casos por cada 100.000 habitantes. Estos datos suponen una disminución del 5,4% respecto al año 2010, en el que se confirmaron 99.020 casos, manteniéndose una tendencia decreciente iniciada en el año 2007 (Figura 1).

Es importante destacar que los casos de salmonelosis se encuentran en continuo descenso debido fundamentalmente a las estrictas políticas de control llevadas a cabo en la UE durante los últimos años, como por ejemplo el Reglamento (CE) N° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre control de la *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por alimentos.

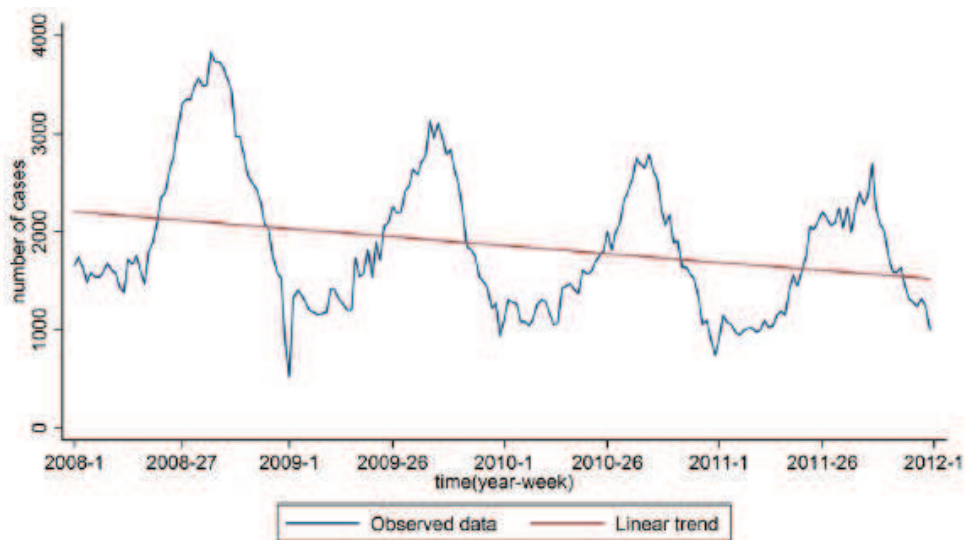


Figura 1: Evolución de los casos confirmados de salmonelosis humana en la UE, 2008-2011.

Al igual que en años anteriores, los dos serotipos más frecuentes en 2011 fueron Enteritidis y Typhimurium, que representaron el 44,4% y 24,9%, respectivamente, de todos los serotipos encontrados en humanos (Figura 2). También fueron relevantes, aunque con menor representación, la variante monofásica 4,[5],12:i:- de Typhimurium (4,7%) y los serotipos Infantis (2,2%), Newport (1,0%), Derby (0,9%), Kentucky (0,7%), Poona (0,7%), Virchow (0,6%) y Agona (0,6%) (EFSA, 2013).

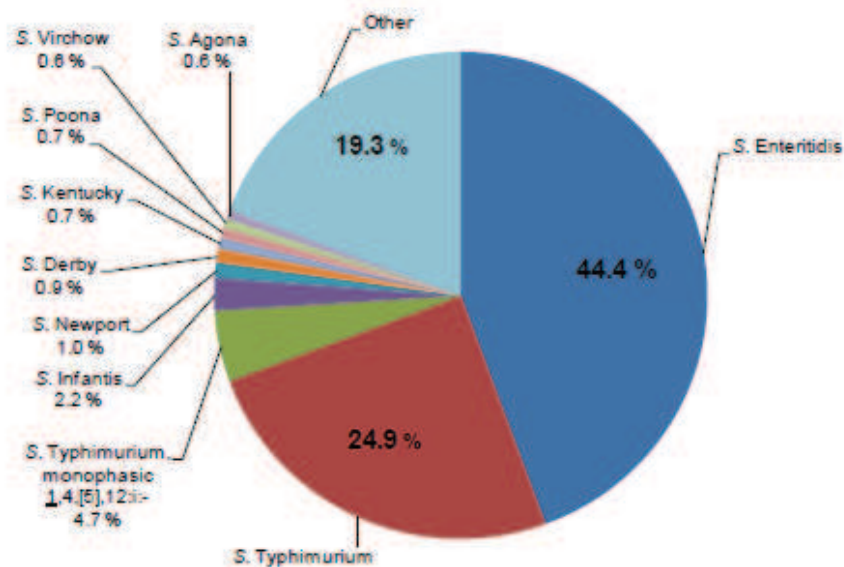


Figura 2: Distribución de los diez serotipos de *Salmonella* más comunes encontrados en humanos en la UE en 2011.

De forma idéntica que los casos esporádicos, el número de brotes por *Salmonella* ha ido también disminuyendo. A pesar de ello, esta bacteria ha sido en 2011 la causa más frecuente de notificación de brotes de origen alimentario (AESAN, 2013). Se estima que un 60% de las infecciones por salmonelosis son adquiridas en el ámbito doméstico. Así mismo, aproximadamente el 65% de estos casos tienen relación con el consumo de ovoproductos, aunque otra importante fuente de salmonelosis son los derivados de cerdo (28% de los casos), pavo (4,5%) y pollo (2,4%).

La tasa de mortalidad de la salmonelosis humana en la UE en 2011 fue del 0,12% con un total de 56 casos mortales, un 0,01% menos respecto al año anterior en el que el número de fallecidos fue de 62 con una tasa del 0,13%.

En España, al igual que en la Unión Europea, *Salmonella* es después de *Campylobacter*, el segundo agente más frecuentemente implicado en brotes de origen alimentario, causantes de infecciones gastrointestinales. En el año 2011 se notificaron un total de 3.833 casos (CNE, 2012). Atendiendo a los datos nacionales, proporcionados por el Instituto de Salud Carlos III, los casos de salmonelosis han disminuido a partir de 2003, donde se observó un pico de más de 8.500 casos detectados, hasta llegar a los valores de hoy en día, como se observa en la figura 3.

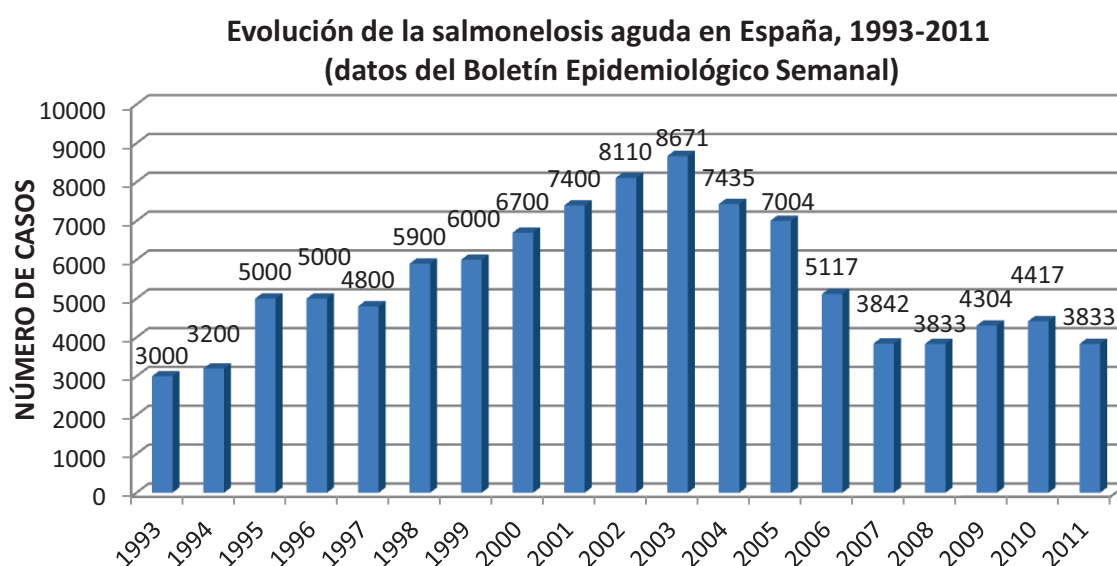


Figura 3: Gráfico de la evolución de la salmonelosis en España desde 1993 hasta 2011.

Aunque los resultados de los estudios tanto europeos como nacionales indican la efectividad de las medidas de control de *Salmonella*, este patógeno continúa siendo una de las causas principales de enfermedades gastrointestinales de transmisión alimentaria, por lo que es necesaria una continua vigilancia y estudio de los diferentes serotipos implicados, así como la búsqueda de nuevas estrategias que permitan un mejor control de estas infecciones.

***S. enterica* subespecie *enterica* serotipo Derby**

S. enterica subsp. *enterica* serotipo Derby (*S. Derby*) es uno de los serotipos predominantes asociados a ganado porcino. La infección por *S. Derby* en estos animales es a menudo subclínica, aunque en algunos casos puede mostrar una amplia gama de signos clínicos que van desde diarrea leve hasta septicemia aguda y muerte. La bacteria se encuentra localizada normalmente en la faringe, los ganglios linfáticos, el estómago y las heces de estos animales y se transmite a las canales por contaminación durante el sacrificio o por un mal procesamiento de estas. Por lo tanto, además de repercusión en la ganadería porcina, la importancia de la infección por *S. Derby* en los cerdos radica en su potencial de transmisión a seres humanos a través de la cadena alimentaria.

Con el fin de reducir la incidencia de la salmonelosis humana la legislación comunitaria estableció una serie de objetivos de reducción de *Salmonella* en poblaciones de cerdos de abasto usados como alimento. Para sustentar tal objetivo se llevó a cabo un estudio de la prevalencia de cerdos infectados por *Salmonella* en el momento del sacrificio. El estudio fue realizado entre octubre de 2006 y noviembre de 2007, periodo en el que se analizaron el 80% de los cerdos sacrificados en cada uno de los estados miembros, tomándose muestras de nódulos linfáticos y de canales. Se recogieron un total de 18.663 muestras de ganglios linfáticos, en los que se observó presencia de *Salmonella* en el 10,3% de ellas. Esto significa que en el momento del sacrificio uno de cada diez cerdos estaba infectado con *Salmonella*. En total se encontraron 87 serotipos, siendo *S. Typhimurium* (40% de los casos positivos) y *S. Derby* los más comunes. *S. Derby* fue detectado en un 14,6% de los casos positivos, y estuvo presente en veinte de los veinticinco estados miembros participantes (estando ausente en Chipre, Estonia, Finlandia, Lituania y Suecia). España, fue el estado

miembro con un mayor número de muestras de nódulos linfáticos positivas para *Salmonella* 804 de 2619 analizadas, lo que supone un porcentaje del 30,69%, del cual un 3,1% pertenecía al serotipo Derby, con un total de 82 muestras positivas.

En lo que respecta al estudio de canales, las muestras procedieron de 13 estados miembros, entre los que no estaba incluida España. En este caso la presencia de *Salmonella* fue del 8,3%, lo que significa que uno de cada doce canales contenía esta bacteria. Se encontraron un total de 30 serotipos diferentes, siendo los más frecuentes *S. Typhimurium* con un 49,4% y *S. Derby* con un 24,3%, al igual que en nódulos linfáticos.

Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, el presente proyecto se centró en la caracterización de aislamientos de *S. Derby* procedentes de canales de cerdo y diferentes alimentos cárnicos, recogidos por el Laboratorio de Salud Pública (LSP) del Principado de Asturias entre los años 2008 y 2012. Para ello, los objetivos abordados fueron los siguientes:

1. Tipificar los aislamientos de *S. Derby* mediante macrorrestricción genómica seguida de electroforesis de campo pulsante (PFGE).
2. Estudiar la resistencia a antimicrobianos e identificar los genes responsables.
3. Rastrear y caracterizar elementos genéticos móviles (integrones, transposones y plásmidos) que pudieran contribuir a la resistencia.
4. Comparar la resistencia de *S. Derby* con la de otros serotipos de *Salmonella* encontrados también en alimentos en el Principado de Asturias.

CONSIDERACIONES
TEÓRICAS

Características generales de *Salmonella*

Salmonella es un género perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden Enterobacteriales y Clase γ -Proteobacteria (Garrity *et al.*, 2004). Los miembros de esta familia se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos de 0,3-1,0 μm x 1,0-6,0 μm de tamaño (Figura 4), no esporulados, anaerobios facultativos con un contenido en guanina-citosina (GC) de 50-53%. No producen endosporas y la mayor parte son móviles por flagelos peritricos, a excepción de algunos serotipos. Producen ácido y gas a partir de glucosa, son catalasa positivos, oxidasa negativos y reducen los nitratos a nitritos (Corral y Perea, 1992).



Figura 4. Célula de *Salmonella* al microscopio electrónico.

Pueden multiplicarse en un amplio rango de temperaturas, desde 5 a 45°C, siendo la óptima de crecimiento entre 35 y 37°C. Soportan un pH entre 4,5 y 9, creciendo mejor a pHs próximos a la neutralidad (6,5-7,5). Tienen un buen desarrollo a una actividad de agua de 0,945 a 0,999 y en alimentos pueden multiplicarse con valores de hasta 0,93 (Mossel *et al.*, 2002).

Son capaces de crecer en presencia de altos niveles de sales biliares y toleran colorantes como el cristal violeta, la eosina, la fucsina ácida, el azul de metileno o el verde brillante, lo que ha sido utilizado para el diseño de medios selectivos de cultivo como agar Hektoen, agar verde brillante, agar eosina-azul de metileno o el agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) (Figura 5). Las altas concentraciones de sales biliares así

como los distintos colorantes adicionados a estos medios van a inhibir la flora acompañante permitiendo el crecimiento selectivo de *Salmonella* y otras enterobacterias.

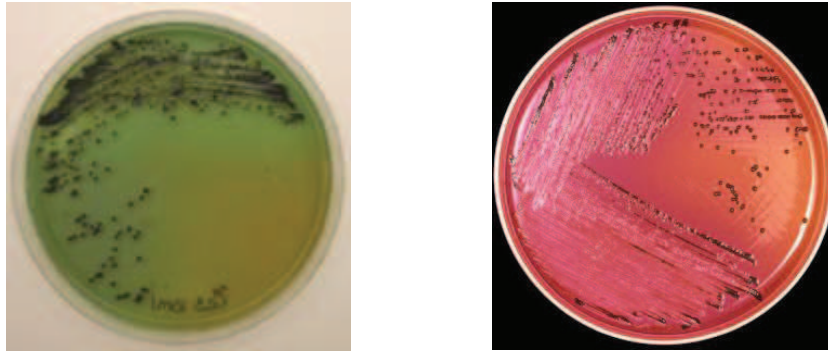


Figura 5. Crecimiento de *Salmonella* spp. en medios selectivos y diferenciales: a) medio Hektoen b) medio XLD. El color negro de las colonias se debe a la producción de H₂S a partir de tiosulfato (Todar, 2008).

El género se divide en 2 especies, *S. enterica* y *S. bongori* de las cuales, la primera incluye las subespecies *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Tindall *et al.*, 2005). La diferenciación de distintos aislamientos dentro de una especie o subespecie puede conseguirse mediante la determinación de serogrupos y serotipos, basados en la variabilidad antigénica. Según esquema de Kauffmann-White, habitualmente empleado para esta tipificación, dentro del género *Salmonella* se incluyen 67 serogrupos o grupos O, definidos por los antígenos somáticos mayores, que a su vez se clasifican en más de 2.500 serotipos diferentes en función de la combinación de antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) de cada aislamiento particular (Collanzos *et al.*, 2013):

- 1) Antígenos somáticos o antígenos O: están localizados en las cadenas polisacáridicas laterales de los lipopolisacáridos que forman parte de la membrana externa de la pared de las bacterias Gram negativas (Figura 6). Existen más de 50 (Prescott *et al.*, 2004).

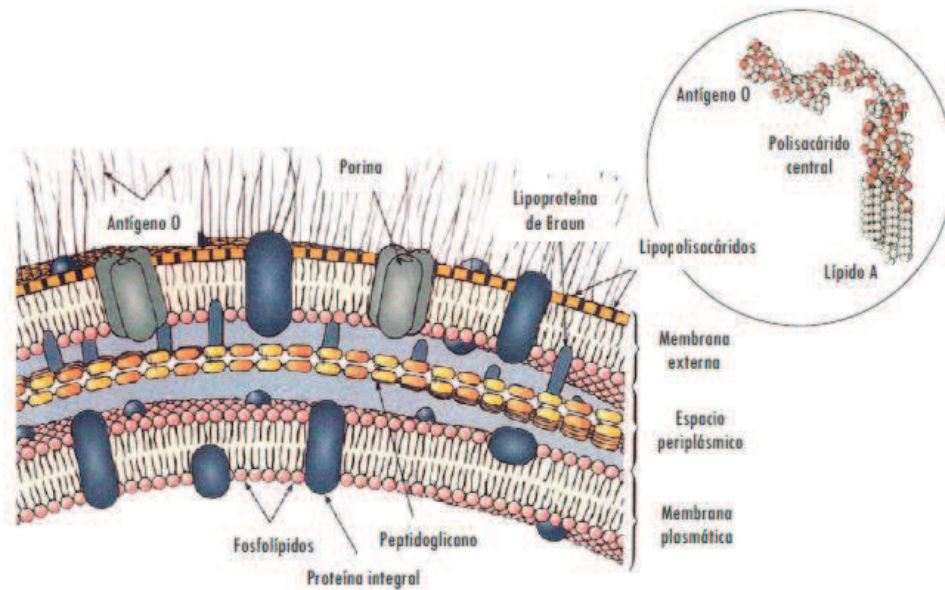


Figura 6: Pared celular de una bacteria Gram negativa y detalle de la estructura del lipopolisacárido.

- 2) Antígenos flagelares o antígeno H, se corresponden con la flagelina, proteína estructural de los flagelos. La mayor parte de los serotipos de *Salmonella* alternan dos formas distintas de flagelina denominadas fases, por lo que se consideran bifásicos (Silverman *et al.*, 1979). Sin embargo existen también serotipos monofásicos e incluso inmóviles.

- 3) Antígeno capsular o antígeno K, es de naturaleza polisacáridica y se presenta en aquellos serotipos cuya membrana externa se encuentra rodeada de la cápsula. En el género *Salmonella* el único antígeno K descrito es el antígeno Vi (de virulencia) que se considera factor determinante en la invasión, al evitar la destrucción de las bacterias en el interior de los fagocitos, e interferir con la respuesta inmune del hospedador (Raffatellu *et al.*, 2006).

Distribución de *Salmonella* en la naturaleza y rutas de transmisión

Salmonella es una bacteria cuyo hábitat natural primario es el intestino de diversos animales, tanto de sangre caliente como fría. La mayor parte de los serotipos presentan amplio rango de hospedador, siendo capaces de colonizar el intestino de distintas especies animales, incluyendo el hombre, y pueden transmitirse de unos a otros, muchas veces por medio de los alimentos. A este grupo pertenecen los denominados serotipos no tifoideos

cuya dosis infectiva se calcula en 10^5 - 10^6 bacterias. Por contra, hay unos pocos serotipos de distribución restringida, que infectan exclusivamente a la especie humana. Constituyen los denominados serotipos tifoideos, por ejemplo, Typhi y Paratyphi.

En cuanto a los serotipos no tifoideos, su cadena de transmisión es relativamente compleja (Figura 7). La bacteria llega a los animales domésticos procedente de distintas fuentes: contaminación de pastos y aguas, por contacto con animales silvestres portadores o sus heces, piensos en cuya composición intervienen restos de animales enfermos o portadores de *Salmonella*, etc. Los actuales sistemas de cría intensiva de ganado y aves facilitan la propagación de unos animales a otros, o de un ave a sus huevos.

Desde los animales domésticos, la bacteria llegará al hombre por diversas vías:

- 1) consumo de leche o derivados lácteos contaminados con material fecal de las vacas.
- 2) consumo de huevos de gallina o productos derivados de los mismos, son los vehículos de transmisión más importantes. La transmisión por huevos se relaciona con la contaminación externa de los mismos por las heces de las ponedoras. Esta puede producirse en el momento de la puesta ya que en las aves el oviducto y el intestino desembocan en el mismo conducto, denominado cloaca. Sin embargo, la contaminación se ha asociado también a infecciones internas de los huevos, producidas por el serotipo Enteritidis en los ovarios de las gallinas, portando la *Salmonella* en el interior de los huevos desde antes incluso que se llegue a desarrollar la cáscara.
- 3) carne de mamíferos o de aves (y productos derivados) que se contamina al entrar en contacto con el contenido intestinal durante los procesos de evisceración (extracción del intestino y otras vísceras) en los mataderos, y que puede contener bacterias vivas si no se calienta lo suficiente durante su preparación culinaria.
- 4) contaminación exógena o cruzada de cualquier tipo de alimento, en el que la bacteria no está presente en el alimento en sí, sino que puede desarrollarse en él debido al contacto del alimento con utensilios y superficies mal higienizados, a través de agua utilizada para el lavado de alimentos que no haya sido tratada

correctamente y también a través de manipuladores de alimentos.



Figura 7: Rutas de transmisión de los serotipos no tifoideos de *Salmonella*

Cuadros clínicos causado por *Salmonella*

Salmonella es un patógeno intracelular facultativo que dependiendo del serotipo y del hospedador puede presentar tres manifestaciones clínicas:

- 1) Enterocolitis aguda o salmonelosis propiamente dicha: es la manifestación más común de la infección, debida a la ingestión de alimentos contaminados con los denominados serotipos no tifoideos. En España se comunican cada año varios miles de casos de enterocolitis por *Salmonella*, causada principalmente por los

serotipos Enteritidis, Typhimurium y Virchow, pero el número real de afectados podría ser 1 o 2 órdenes de magnitud mayor. La salmonelosis se manifiesta entre 8 y 48 horas tras la ingesta de un alimento contaminado y consiste en la aparición brusca de dolor abdominal intenso, seguido de náuseas y deposiciones diarreicas. Las heces son profusas y, al menos al principio, de tipo acuoso, pero con bastante frecuencia son de tipo mucoso e incluso puede aparecer sangre en las mismas (características de una infección invasiva con destrucción del epitelio intestinal). Generalmente este cuadro cursa con fiebre de hasta 40 °C durante al menos 48 horas y es común también la cefalea. Puede acompañarse de vómitos, pero éstos también pueden estar ausentes.

En general, la salmonelosis aguda es una enfermedad autolimitada que desaparece por sí misma en unos pocos días y no es excesivamente grave, aunque en ocasiones necesita de tratamiento antimicrobiano.

- 2) Septicemia: asociada a pacientes inmunocomprometidos o de edades extremas (niños pequeños y ancianos), en los que *Salmonella* se disemina por el organismo inicialmente por vía linfática y después por vía sanguínea, pudiendo alcanzar diversos órganos o tejidos (tracto urinario, vesícula biliar, hígado, huesos, etc).
- 3) Fiebres entéricas: están producidas por los serotipos Typhi, responsable de la fiebre tifoidea y cuyo reservorio es el hombre, así como Paratyphi A, B y C, causantes de las fiebres paratifoideas. Ambos serotipos se transmiten principalmente por aguas y en menor medida por alimentos contaminados con material fecal. Se trata de infecciones invasivas graves, siendo la severidad mayor en el caso de fiebre tifoidea (Crump y Mintz, 2010).

Resistencia frente a agentes antimicrobianos

Los antibióticos son sustancias naturales producidas por microorganismos como un mecanismo de defensa frente a otros, en su afán de competir por la supervivencia. Además se piensa que podrían actuar como señales en la comunicación intracelular entre las bacterias (Martínez *et al.*, 2009; Yim *et al.*, 2007). Otros agentes

antimicrobianos se obtienen por síntesis química o por modificación química de compuestos naturales.

La mayor parte de las infecciones por los serotipos no tifoideos de *S. enterica* no requieren tratamiento con agentes antimicrobianos. Prácticamente, éste se basa en evitar la deshidratación producida por la diarrea y los vómitos. Sin embargo, el tratamiento es necesario en el caso de las fiebres entéricas por serotipos tifoideos, así como las infecciones por serotipos no tifoideos, cuando afectan a personas con factores de riesgo (niños, ancianos y personas inmunocomprometidas) o cuando van asociadas a septicemia. La elevada dispersión de resistencia frente a los agentes utilizados tradicionalmente en el tratamiento de infecciones por *S. enterica* (ampicilina, cloranfenicol y cotrimoxazol), hace necesario recurrir a nuevos compuestos, como fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, también están apareciendo resistencias frente a estos últimos (Parry y Threlfall, 2008).

De hecho, la existencia de aislamientos de *Salmonella* resistentes y con resistencia múltiple ha aumentado significativamente en las últimas décadas. En gran medida, esto es debido al uso, muchas veces abusivo, de agentes antimicrobianos tanto en medicina como en veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos, y también como promotores del crecimiento en animales. La presencia de microorganismos resistentes en animales destinados al consumo hace posible que alcancen al ser humano a través de la cadena alimentaria. Actualmente la legislación europea ha prohibido la utilización de antimicrobianos como promotores de crecimiento animal; sin embargo en países como Estados Unidos, este uso sigue vigente (Buckley, 2009; Errecalde, 2004; Torres *et al.*, 2010).

El fenómeno de la resistencia bacteriana frente a agentes antimicrobianos es un ejemplo de evolución constante, en el cual las bacterias han desarrollado sus propios mecanismos para evadir la actividad de estos compuestos (Baquero *et al.*, 2009; Nugent *et al.*, 2010), o bien han adquirido los genes de resistencia a antibióticos por procesos de transferencia horizontal (Buckley, 2009; Martínez *et al.* 2009; Partridge, 2011). Estos mecanismos de resistencia se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- 1) Intrínsecos o de resistencia innata, en el que las características específicas de ciertos grupos bacterianos les permiten ser resistentes por naturaleza. Un ejemplo de este tipo serían las micoplasmas, que carecen de pared celular, por lo que son resistentes a antimicrobianos que actúan a este nivel.
- 2) Resistencia adquirida, que juega un papel más relevante, y se consigue mediante dos vías: la mutación y la transferencia génica horizontal (Cantón *et al.*, 2003; Alekshun y Levy, 2007)

La mutación puede modificar genes o sus reguladores dando lugar a genes de resistencia y como consecuencia originar bacterias resistentes (Cantón *et al.*, 2003; Livermore, 2003). En la mayoría de los casos las mutaciones afectan sólo a una familia de antimicrobianos, pero pueden darse casos que conlleven la resistencia a múltiples tipos o familias. Por otro lado, por acumulación de diferentes mutaciones se puede conseguir un fenotipo multirresistente. Este fenómeno se ve acentuado en cepas en las que los sistemas de reparación del DNA funcionan incorrectamente, favoreciendo la acumulación de errores en el genoma bacteriano.

Las mutaciones se transmiten mediante transferencia vertical (de una bacteria a sus descendientes). Un ejemplo de este tipo de resistencia es la resistencia a quinolonas, como el ácido nalidíxico, que se produce por mutación en el gen *gyrA* que codifica la subunidad A del enzima DNA girasa, lo que impide la unión de la quinolona a este enzima esencial para la replicación del DNA.

En la transferencia génica horizontal uno o más genes de resistencia pueden diseminarse entre bacterias que comparten, temporal o permanentemente, un nicho ecológico. Éste es el mecanismo más efectivo y el principal responsable de la resistencia y multirresistencia. Para su funcionamiento se sirve de elementos genéticos móviles (EGM), también denominados unidades de captura génica (UCG), entre los que destacan el sistema integrón-casete génica, transposones, plásmidos e islas genómicas.

Los integrones son sistemas naturales de clonación y expresión que incorporan casetes génicas y las convierten en genes funcionales (Figura 8). Las casetes génicas (CG) son pequeños elementos móviles consistentes en una *orf* y un lugar de

recombinación *attC*. Pueden existir de manera transitoria en forma circular, pero no incluyen las funciones necesarias para su movimiento y expresión, dependiendo para ello de los integrones (Partridge *et al.*, 2009; Stokes y Hall, 1989).

Los integrones están compuestos por dos elementos principales: un gen que codifica una integrasa (*intI*) que media un proceso de recombinación específica entre el sitio *attI* del propio integrón y el sitio *attC* de la casete, permitiendo la integración de ésta, y uno o más promotores para su expresión. Una vez incorporadas, las casetes génicas constituyen la región variable del integrón.

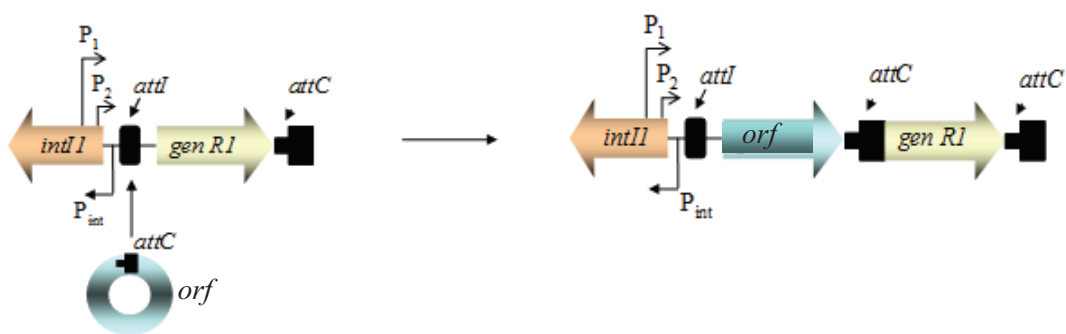


Figura 8: Estructura de un integrón genérico.

Los integrones se clasifican en dos grandes grupos. Por un lado, los integrones cromosómicos (CIs), identificados en el genoma de varias especies bacterianas, que albergan entre 20 y 200 casetes génicas, la mayoría de ellas de función metabólica o desconocida (Rowe-Magnus *et al.*, 2001; Stalder *et al.*, 2012). Por otro lado, los denominados integrones móviles o integrones de multirresistencia (MIs), que contienen entre dos y ocho casetes génicas e incluyen genes de resistencia a diversos antimicrobianos. Se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes bacterias, jugando un papel muy importante en la dispersión de resistencias (Fluit y Schmitz, 2004). Su frecuencia es especialmente relevante en bacterias patógenas Gram negativas que infectan al hombre y los animales, incluyendo diferentes serotipos de *S. enterica* (Guerra *et al.*, 2000; Carattoli, 2001; Fluit y Schmitz, 2004). Dentro de este grupo, y en función de la secuencia aminoacídica de la proteína IntI, se han descrito cinco clases de integrones: clase 1 (*intI1*), clase 2 (*intI2*), clase 3 (*intI3*), clase 4 (*intISXT* o *intI9*) y clase 5 (*intIHS*); siendo más comunes los de clase 1.

Los integrones de clase 1 típicos se caracterizan por presentar dos segmentos

conservados (5'-CS y 3'-CS) que flanquean una región central variable donde pueden encontrarse una o varias casetes génicas. El segmento 5'-CS se caracteriza por tener uno o dos promotores (para la expresión de los genes insertados), el gen de la integrasa *intI1* y *attI1*. En el segmento 3'-CS se hallan generalmente genes que dotan a la bacteria de resistencia a sulfonamidas (*sul1*) y a compuestos derivados del amonio cuaternario (*qacE*, frecuentemente con la delección $\Delta 1$), detrás de los cuales aparece una *orf5*, de función desconocida (Recchia y Hall, 1995; Carattoli, 2001). A continuación se pueden encontrar o no una o dos secuencias de inserción (IS1326 e IS1356), seguido de un módulo de transposición defectivo (*tni*) y toda la estructura está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (IRs) (Figura 9).

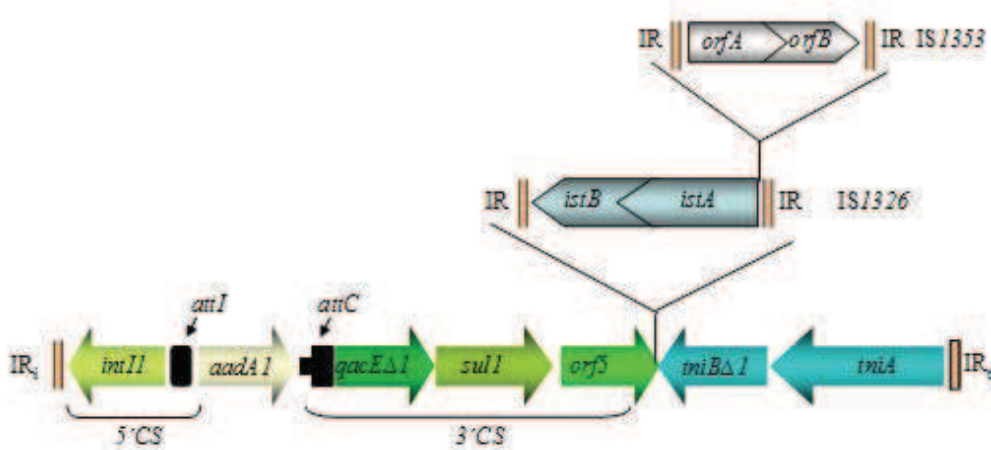


Figura 9: Estructura de un integrón de clase I.

Los elementos genéticos transponibles son elementos genéticos móviles que poseen la maquinaria necesaria (enzima transposasa y proteínas reguladoras) para promover su propia translocación desde un sitio donador a un sitio receptor. Pueden dividirse en dos grandes grupos:

Secuencias de Inserción (IS): son elementos más sencillos cuyo tamaño oscila entre 700 y 1000 pb. Poseen una región central que codifica la transposasa flanqueada por secuencias repetidas que oscilan entre 10 y 40 pb.

Transposones (Tn): son de mayor tamaño ya que, además de los genes necesarios para la transposición, contienen genes accesorios que pueden conferir resistencia a antimicrobianos (Roberts *et al.*, 2008; Wagner, 2006). Estos se dividen en dos clases.

- 1) Transposones de clase 1 o compuestos. Presentan una estructura modular formada por dos copias de una misma IS flanqueando una región central variable que frecuentemente incluye genes de resistencia a antimicrobianos. Son las IS de los extremos las que aportan la maquinaria necesaria para la movilización de todo el conjunto como una unidad. Un ejemplo de este tipo de transposones compuestos es el transposón *Tn10* (Figura 10).

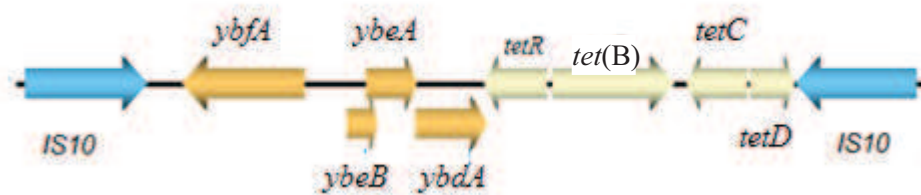


Figura 10: Transposón compuesto *Tn10*.

- 2) Transposones de clase 2 o complejos. Constituyen probablemente el grupo de elementos transponibles con mayor distribución en bacterias Gram negativas. Se encuentran delimitados por IRs de longitud variable (de 35 a 40 pb), contienen genes que codifican los enzimas transposasa (*tnpA*) y resolvasa (*tnpR*), y una secuencia *res*. Todos estos elementos llevan a cabo el proceso de transposición replicativa que tiene lugar en dos etapas. En la primera, se genera un cointegrado entre las moléculas donadora y receptora por acción del enzima TnpA, seguido de la replicación del transposón y de una serie de nucleótidos presentes inicialmente en el sitio diana de la inserción. En la siguiente etapa, el enzima TnpR resuelve el cointegrado mediante una recombinación específica de sitio entre las secuencias *res* de cada una de las copias del transposón. Dentro de este grupo se encuentran los transposones *Tn3* (Figura 11) y *Tn1721* (Figura 12).



Figura 11: Transposón complejo *Tn3*.

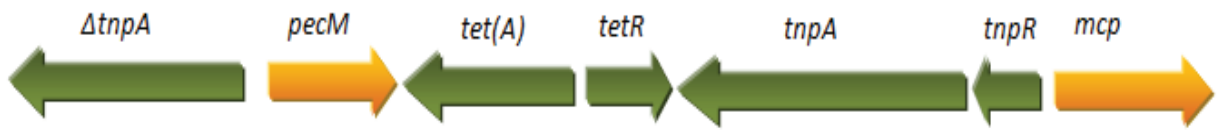


Figura 12: Transposón complejo Tn1721.

Los plásmidos son elementos genéticos extra-cromosómicos, con DNA de cadena doble, generalmente circulares que tienen la capacidad de replicación autónoma (Figura 13). No codifican funciones esenciales para la célula, pero sí genes que otorgan ventajas al codificar funciones metabólicas, de virulencia y de resistencia a antimicrobianos. Están presentes en casi todas las especies bacterianas y su tamaño varía desde unas pocas Kb (2 Kb) hasta unas 400 Kb (Bennett, 2008; Carattoli, 2009).

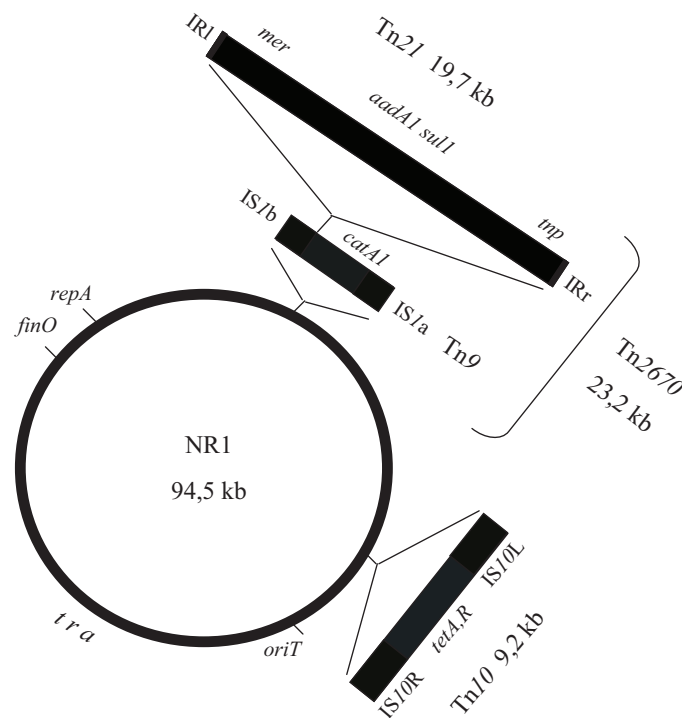


Figura 13: Plásmido conjugativo con un transposón compuesto Tn10 (resistencia a tetraciclina) y una isla de resistencia plasmídica formada por dos transposones, Tn9 (resistencia a cloranfenicol) y Tn21 (resistencia a mercurio). Este último porta a su vez un integrón con genes de resistencia a estreptomicina y sulfadiazina.

En la transferencia génica horizontal los plásmidos son considerados piezas clave, ya que muchos de ellos pueden pasar de una célula a otra mediante conjugación o movilización. La conjugación se puede considerar como un proceso que coordina una

replicación en círculo rodante con un transportador macromolecular. Para que esta transferencia de ADN tenga lugar, se requiere un contacto directo entre la célula donadora y la receptora. En el caso de las bacterias Gram negativas se precisan tres componentes esenciales: el transferosoma, formado por un sistema de secreción de tipo 4 (SST4) que por un lado, se encarga de la síntesis del pilus sexual (filamento extracelular que inicia el contacto entre las bacterias) y por otro, actúa a modo de jeringuilla para la inyección del ADN; el relaxosoma, un conjunto de proteínas que procesan el ADN; y una proteína acopladora que conecta ambas entidades (Figura 14) (Filutowicz *et al.*, 2008). Todos estos procesos y su regulación están codificados por genes localizados en el plásmido conjugativo.

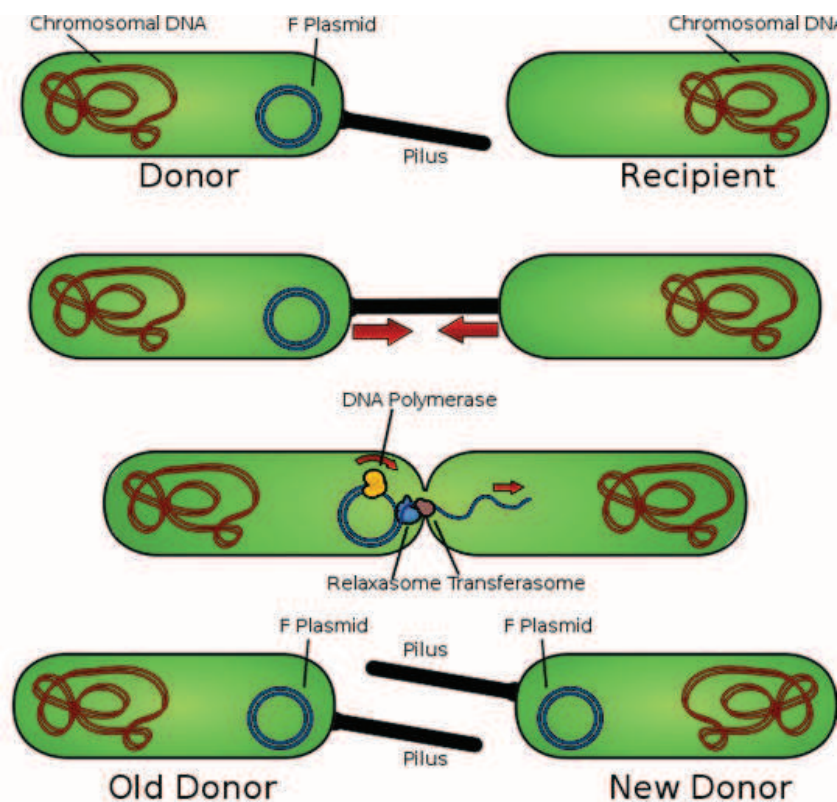


Figura 14: Proceso de conjugación con transferencia de un plásmido de una bacteria donadora a una receptora a través del pilus sexual.

El problema de la resistencia a los antimicrobianos es un problema a nivel mundial que preocupa a diferentes organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el Centro para la

Vigilancia y el Control de las Enfermedades (CDC) de EEUU, etc. Desde estos organismos se llevan a cabo medidas educativas dirigidas al público y a los profesionales de la salud para recoger datos sobre el consumo de antimicrobianos, reducir el uso, fomentar el desarrollo de nuevos agentes, vigilar activamente la evolución de las tasas de resistencia y fomentar la investigación de resistencias (Baquero y Garau, 2010; Campos *et al.*, 2010)

Métodos de tipificación

Debido a los cambios en el patrón de presentación de las enfermedades transmitidas por alimentos y a la emergencia de nuevas variantes dentro de una especie, es importante detectar cepas, linajes o clones patógenos para el hombre, determinar su cadena de transmisión y buscar medidas de control. Esto requiere la diferenciación intraespecie que se consigue mediante los métodos de tipificación. En *Salmonella* la serotipificación es el método de tipificación primario y universalmente aceptado, pero es necesaria la aplicación de métodos adicionales para subdividir los serotipos. Estos se clasifican en dos grupos:

Métodos de tipificación fenotípicos: basados en características biológicas o bioquímicas. Además de la serotipificación, ya citada, destacan los siguientes:

- 1) Fagotipificación: se basa en la sensibilidad o resistencia de aislamientos pertenecientes al mismo serotipo frente a una serie de fagos. Los lotes de fagos no suelen estar disponibles o comercializados, por lo que sólo se pueden acceder a ellos en laboratorios de referencia, donde se utiliza como marcador epidemiológico secundario para serotipos relevantes, como Typhimurium, Enteritidis, Hadar y Virchow.
- 2) Perfil de resistencia a antimicrobianos: se basa en la determinación del patrón de sensibilidad o resistencia de los aislamientos a un conjunto de antimicrobianos. Es útil como marcador en el diagnóstico de brotes y, obviamente, para el seguimiento de la efectividad de los antimicrobianos en uso. Se realiza utilizando las técnicas de difusión en agar y dilución en medios sólidos o líquidos. En diagnóstico clínico rutinario se utilizan

técnicas automatizadas basadas en dilución en medio líquido y observación del crecimiento mediante turbidez.

Métodos de tipificación genotípicos: basados en el análisis del genoma completo o de parte de él. Entre ellos se incluyen análisis de plásmidos; protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis en campo pulsado (PFGE), técnicas utilizadas en este proyecto y que serán ampliamente explicadas en el apartado de material y métodos.

- 1) Análisis de plásmidos: se trata de un método rápido, barato y sencillo, utilizado en numerosos laboratorios, que requiere la extracción de DNA plasmídico, seguida de su separación y visualización en geles de agarosa.
- 2) Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): que consiste en la amplificación o replicación enzimática “in vitro” de uno o más fragmentos de DNA, pudiendo llegar a copiarse 10^6 veces.
- 3) Electroforesis en campo pulsado (PFGE): basada en el estudio de la variación de la secuencia de nucleótidos del DNA total, revelada por el polimorfismo en los fragmentos de restricción generados por endonucleasas específicas con baja frecuencia de corte. Esta técnica es una variación de la electroforesis convencional en geles de agarosa en la que la orientación del campo eléctrico se altera periódicamente (pulsos), permitiendo la separación de fragmentos de gran tamaño.

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos de procedencia de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby

Los 14 aislamientos de *S. Derby* utilizados para la realización de este proyecto fueron cedidos por el Laboratorio de Salud Pública (LSP), de la Agencia de Sanidad y Consumo del Principado de Asturias (PA). Se designan con las siglas LSP y dos números que indican el orden y año de recogida. Estos aislamientos se obtuvieron a partir de superficies de canales porcinos y de distintos alimentos cárnicos entre los años 2008 y 2012 (Tabla 1).

Tabla 1. Aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby utilizadas en este estudio

Aislamiento	Origen
LSP 14/08	Derivado cárnico
LSP 293/08	Superficie canal porcino
LSP 63/09	Superficie canal porcino
LSP 4/11	Picadillo
LSP 6/11	Chorizo criollo
LSP 19/11	Picadillo
LSP 20/11	Picadillo
LSP 21/11	Picadillo
LSP 22/11	Picadillo
LSP 23/11	Picadillo
LSP 73/12	Superficie canal porcino
LSP 216/12	Producto cárnico fresco
LSP 217/12	Producto cárnico fresco
LSP 218/12	Producto cárnico fresco

LSP, Laboratorio de Salud Pública

Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados en este proyecto son los que se muestran a continuación. Todos ellos fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Agar EMB (Eosin Methylene Blue Agar; *Oxoid*): se empleó para el crecimiento

de los aislamientos. Es un medio sólido selectivo y diferencial diseñado para el aislamiento de bacterias patógenas intestinales Gram negativas. El medio contiene peptona, sales biliares, tiosulfato, carbonato de calcio, agar, eosina, azul de metileno y lactosa.

LB (Caldo Luria-Bertani): se empleó para el crecimiento de las bacterias en medio líquido (5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 5 g de NaCl y 1 L de H₂O destilada).

Müller-Hinton (MH; *Oxoid*): se empleó para la determinación de la sensibilidad a antibióticos. Contiene caseína ácida hidrolizada, extracto de carne y almidón.

Siembra de las bacterias y conservación

La siembra de los aislamientos se realizó bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo vertical. El método varió según se utilizaran medios sólidos o líquidos.

Siembra en medio sólido. Existen varios tipos de siembras:

Siembra por agotamiento: se disemina el inóculo con el asa de siembra sobre una zona cercana al borde de la placa dibujando una serie de estrías. A continuación se esteriliza el asa introduciéndola directamente en la llama de un mechero y se dibuja otra serie de estrías partiendo de las anteriores. Se repite el mismo procedimiento hasta completar la placa (Figura 15). Este método fue empleado para la obtención de colonias de los aislamientos LSP. El medio de cultivo utilizado fue el agar EMB.

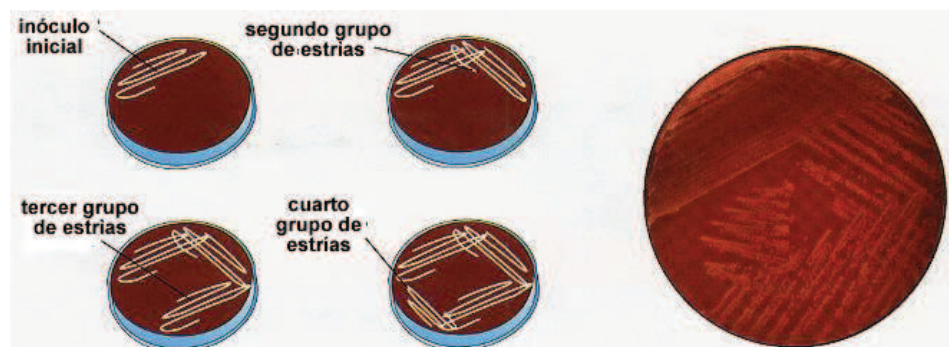


Figura 15: Esquema de siembra por agotamiento.

Siembra en masa o sábana: se depositan 100 μ l de un cultivo líquido en el centro de la placa y se reparten de manera homogénea por toda la superficie del medio. Esto se consigue con ayuda de un asa de Digrafsky esterilizada o con un hisopo estéril. Este método fue empleado para el crecimiento de los aislamientos LSP en medio MH, para determinar su sensibilidad frente a agentes antimicrobianos.

Siembra en medio líquido: normalmente se utilizan 2,5 ml de medio de cultivo LB y el inóculo procede de colonias aisladas en medio sólido o de un pre-cultivo en medio líquido.

A partir de medio sólido: con el asa de siembra estéril se toma inóculo de una colonia aislada en EMB, se introduce en el medio líquido y se mezcla con éste.

A partir de pre-cultivo líquido: se toman 5 μ l del pre-cultivo y se introducen en 2,5 ml de medio fresco.

Después de la realización de la siembra se procedió a la incubación: los tubos de medio líquido se incubaron a 37°C con agitación y las placas de medio sólido a la misma temperatura en estático

Los aislamientos crecidos en placas de medio EMB fueron conservados a 4°C.

Macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante (PFGE)

La tipificación de los aislamientos se llevó a cabo mediante una técnica basada en la digestión del DNA total con una endonucleasa de restricción que corta con baja frecuencia, seguida de electroforesis en campo pulsante (PFGE), que permite separar fragmentos de gran tamaño, que van desde las 20 Kb a más de 1000 Kb. El proceso implica la inmovilización de un cultivo bacteriano en bloques de agarosa donde tendrá lugar la lisis celular y la digestión del DNA liberado. El proceso se describe a continuación:

Preparación de los bloques: a partir de las colonias crecidas en medio EMB e incubadas a 37°C durante toda una noche, se obtuvo una suspensión bacteriana en 2ml de tampón CSB (1 ml de Tris-HCL 1M pH8, 200 μ l EDTA 0,5M pH8, enrasado a 100

ml con H₂O destilada), hasta conseguir una absorbancia de 1,35 a 610 nm.

Se preparó agarosa especial para los bloques (Seakem Gold Agarose, *Cambrex*) al 1% en una solución de SDS (1%) en tampón TBE 0,5X (5 ml de TBE 5X (54 g/L de Tris (hidroximetil) aminometano, 27,5 g/L ácido bórico, 20 ml EDTA 0,5M pH8) y enrasar a 100 ml con H₂O destilada) y se mantuvo en un baño a 70°C. Se añadieron 20 µl de proteinasa K a cada suspensión de células bacterianas y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. A continuación se mezclaron 200 µl de suspensión celular con 200 µl de agarosa y se distribuyó en moldes, que se dejaron a 4°C durante 15 minutos para su solidificación.

Lisis bacteriana: se preparó una solución con 2 ml de tampón de lisis (5 ml de Tris-HCl, 10 ml EDTA 0,5M pH8, 10 ml de sarcosina 10%, enrasado a 100 ml H₂O destilada) suplementado con 10 µl de proteinasa K. Se pasaron los bloques de agarosa a esta solución y se dejó incubar durante 2 horas en un baño de agua con agitación a una temperatura de 55°C.

Lavados de los bloques: pasadas las 2 horas se lavaron los bloques con 5 ml de H₂O destilada estéril, en la que se mantuvieron durante 15 minutos; este paso se realizó dos veces. A continuación se lavaron con 5 ml de buffer TE estéril (10 ml Tris/HCl 1M pH8, 2 ml EDTA 0,5M pH8 y enrasar a 1 L con H₂O destilada) durante 15 minutos cuatro veces. Los bloques se guardaron en 1 ml de TE a 4°C.

Digestión enzimática: se empleó ¼ bloque por aislamiento para cada digestión. Se utilizaron dos enzimas de restricción de manera independiente: XbaI (Tris/HCl 0,1M pH7,5, MgCl₂ 0,1M, Dithiothreitol 0,01M, NaCl 0,5M) y BlnI (Tris/HCl 0,2M pH8,5, MgCl₂ 0,1M, Dithiotreitol 0,01M, KCl 1M). Se equilibró ¼ de bloque en 50 µl de tampón de equilibrado (45 µl de H₂O destilada estéril, 5 µl de tampón de digestión específico para cada enzima) durante 30 minutos a 4°C. A continuación se añadieron 43 µl de H₂O destilada estéril, 5 µl de tampón de digestión y 2 µl de enzima y se incubó durante 3-4 horas a 37°C. Antes de cargar el gel se eliminó la mezcla de digestión, se añadieron 50 µl de TBE 0,5X a cada muestra y se dejó reposar durante 15 minutos a 4°C.

Como control de tamaño se utilizaron el marcador λ ladder (*New England BioLabs*) y el DNA de *S. Branderup* H9812 digerido con *XbaI*, de acuerdo con el protocolo propuesto por PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>), la red internacional de subtipificación molecular de patógenos transmitidos por alimentos, para normalizar y comparar perfiles PFGE.

Preparación del gel de agarosa: se prepararon 150 ml de agarosa al 1% disolviendo 1,5 g (Pulsed Field Certified Agarose D-5, *Pronadisa*) en 150 ml de TBE 0,5X. A continuación se colocó cuidadosamente $\frac{1}{4}$ de bloque digerido sobre cada una de las púas de un peine dispuesto en el molde utilizado para preparar el gel y se dejó reposar con el fin de que los bloques se fijasen al peine y no se deslizaran al verter la agarosa. Por último se vertió en el molde la agarosa fundida por ebullición y enfriada a 60°C, y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Electroforesis: se realizó en una cubeta de electroforesis de campos pulsados CHEF DR-III con 2L de TBE 0,5X. El voltaje fue de 6V/cm, y se empleó una rampa lineal pulsada de 2 a 64 segundos durante 22 horas a 14°C, con un ángulo de orientación de 120° que determina lo que deben girar los fragmentos cada vez que se cambia la orientación del campo (Figura 16).

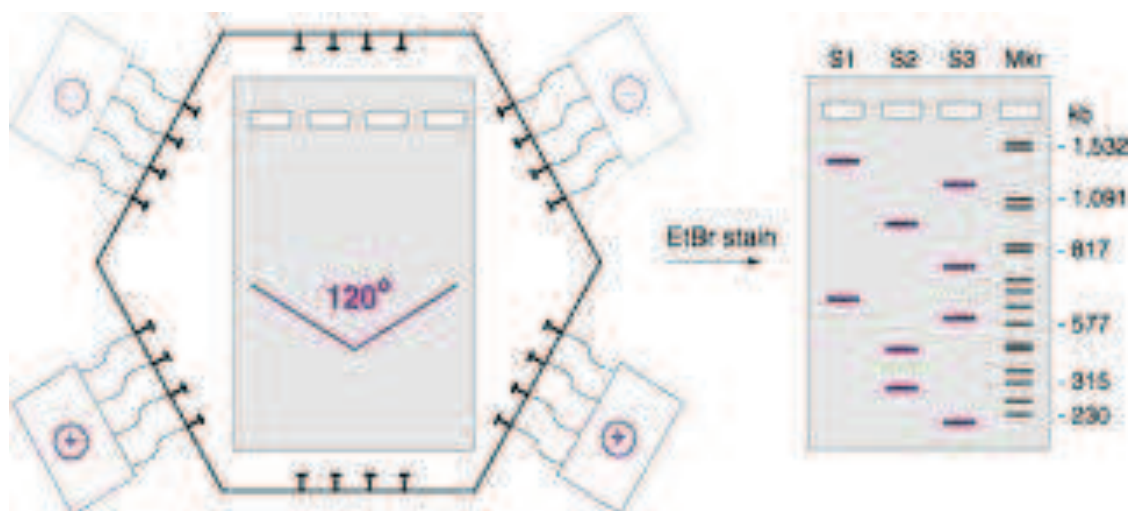


Figura 16: Gel de agarosa en cubeta de electroforesis de PFGE.

Tinción del gel y visualización: se tiñó el gel en una solución acuosa de 200 ml de bromuro de etidio (20 μ l/200 ml, a partir de una disolución 10 mg/ml) durante 10

minutos. El gel se destiñó con agua destilada y se visualizó en un transiluminador ultravioleta.

Los resultados del gel fueron procesados con el programa informático BioNumerics (*Applied Maths*), mediante el cual se construyeron dendogramas de similitud basados en el coeficiente de Dice (S), que expresa la probabilidad de que una banda en un perfil esté también en otro. Este es el índice que menos se ve afectado por las bandas erráticas cuando la similitud entre muestras se debe más a dobles presencias que a dobles ausencias. Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$S_D = \frac{2a}{2a+b+c}$$

a = número de bandas comunes a los dos perfiles.

b = número de bandas presentes en el primer perfil pero no en el segundo.

c = número de bandas presentes en segundo perfil pero no en el primero.

Además, se calculó el índice de discriminación (ID), que indica la probabilidad de que dos aislamientos no relacionados, sean asignados a tipos diferentes mediante la técnica utilizada. Viene determinado por el número de tipos establecidos por dicha técnica y la frecuencia relativa de cada tipo. Se puede calcular mediante el índice de diversidad de Simpson, con la siguiente ecuación:

$$ID = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_j^s n_j(n_j - 1)$$

N = número total de aislamientos en la muestra.

S = número total de tipos descritos.

n_j =número de cepas pertenecientes al tipo j .

Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos

Se estudió la sensibilidad a 9 agentes antimicrobianos por el método de difusión en agar (antibiograma), que refleja la capacidad de un determinado compuesto para matar o inhibir el crecimiento de una bacteria. Para su realización se inoculó en 2,5 ml de medio LB una colonia de cada aislamiento a analizar y se dejó incubar en agitación a 37°C durante 16 horas.

Pasado ese tiempo los cultivos se diluyeron añadiendo 10 µl en 1 ml de LB y se inocularon 100 µl de cada dilución sobre la superficie de una placa de medio MH, mediante el método de siembra en sábana. A continuación se dispusieron discos de papel, de pequeño tamaño, impregnados con una cantidad concreta de antimicrobiano (Tabla 2) sobre la superficie del medio inoculado. Es importante dejar una cierta distancia de separación entre ellos (de unos 2,5 cm) para que se puedan diferenciar correctamente los halos de sensibilidad (Figura 17).

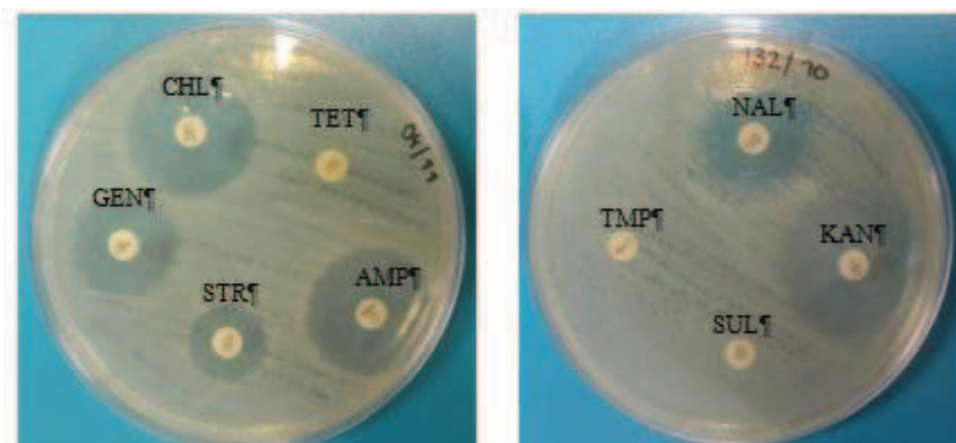


Figura 17: Forma de disposición de los 9 discos de antimicrobianos en placas de MH.

Las placas se dejaron incubar durante una noche a 37°C, colocadas con la tapa hacia arriba para evitar la caída de los discos. Al día siguiente se procedió a la interpretación de los resultados. Para ello, se midió el diámetro de los halos de inhibición y los resultados se establecieron en base a los criterios de interpretación del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009; Tabla 2).

Tabla 2: Antimicrobianos utilizados, cantidad y criterios de interpretación.

Antimicrobiano	Cantidad (μg)	Tamaño del halo (mm)		
		Susceptibilidad	Resistencia intermedia	Resistencia
Ampicilina (AMP)	10	≤ 13	17-16	≥ 17
Gentamicina (GEN)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamicina (KAN)	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Estreptomicina (STR)	10	≤ 11	12-14	≥ 15
Tetraciclina (TET)	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Ácido nalidíxico (NAL)	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Sulfonamidas (SUL)	300	≤ 12	13-16	≥ 17
Trimetoprim (TMP)	5	≤ 10	11-15	≥ 16
Cloranfenicol (CHL)	30	≤ 12	13-17	≥ 18

Reacción en cadena de la polimerasa

Una vez conocido el fenotipo de resistencia de los aislamientos de *S. Derby* se procedió a la identificación de los genes responsables y los elementos genético móviles asociados. Para ello se utilizó la técnica de amplificación por PCR o reacción en cadena de la polimerasa. Este método se divide en tres etapas: desnaturalización, anillamiento y elongación que se repiten un número determinado de ciclos.

El DNA molde utilizado en la PCR se libera por ebullición. Para ello se transfiere 1 ml de un cultivo en medio LB a un tubo *ependorf* y se centrifuga a 14.000 rpm durante 6 minutos. Se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta, se resuspende el sedimento en 300 μl de TE estéril y se hierve en un baño de agua durante 10 minutos. Una vez hervido se enfría en hielo y se centrifuga a 4°C, 14.000 rpm durante 2 minutos. Finalmente se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo *ependorf*, que se guarda bajo condiciones de congelación. Este DNA extraído corresponde al material genético total (cromosómico y plasmídico) del aislamiento.

Además del DNA molde, la PCR requiere de oligonucleótidos específicos que actuarán como iniciadores directo y reverso para la reacción de síntesis y que son complementarios a los extremos del fragmento que se quiere amplificar; también de los

cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs), del enzima DNA polimerasa termorresistente (como la Taq polimerasa) y del tampón de reacción. El volumen de cada reactivo se ajusta según sea el volumen total requerido, utilizándose 15-25 μ l para la visualización de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa y 50 μ l para purificar los fragmentos con objeto de secuenciarlos (Tabla 3).

En las tablas 5 y 6 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores utilizados para la detección por PCR de genes de resistencia y de EGM. En concreto se estudió la presencia o ausencia de genes de integrones de clase 1 y de los transposones Tn10, Tn3 y Tn1721.

Tabla 4: Oligonucleótidos empleados para la detección de genes de resistencia en los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Temperatura de anillamiento	Amplicón (Pb)	Referencia
<i>bla</i> _{TEM-1} (AMP)	TTGGGTGCACGAGTGGGT TAATTGTTGCCGGGAAGC	55	503	Arlet y Phillippon, 1991
<i>aadA1</i> (STR)	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC ATTGCCAGTCGGCAGCG	70	526	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
<i>aadA2</i> (STR)	TGTTGGTTACTGTGGCCGTA GATCTCGCCTTTCACAAAGC	56	622	
<i>tet</i> (A) (TET)	GCTACATCCTGCTTGCCCT CATAGATTCGCCGTGAAGA	55	210	Ng <i>et al.</i> , 1999
<i>tet</i> (B) (TET)	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAATACCG	55	659	Ng <i>et al.</i> , 1999
<i>sul1</i> (SUL)	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	65	436	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
<i>sul2</i> (SUL)	TCAACATAACCTCGGACAGT GATGAAGTCAGCTCCACCT	55	707	Chu <i>et al.</i> , 2001

Tabla 5: Oligonucleótidos empleados para la detección de integrones de clase 1 y de los transposones Tn10, Tn3 y Tn1721 en los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby.

Gen o Región	Secuencia 5'-3'	Temperatura de anillamiento	Amplicón (Pb)	Referencia
Región Variable (Integrón clase 1)	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	55	variable	Lèvesque <i>et al.</i> , 1995; Guerra <i>et al.</i> , 2001
<i>intI1</i> (Integrón clase 1)	GCCTTGCTGTTCTTCTAC GATGCCTGCTTGTCTAC	55	558	Ng <i>et al.</i> , 1999; Guerra <i>et al.</i> , 2001
<i>qacEΔ1</i> (Integrón clase 1)	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	64-66	436	Sandvang <i>et al.</i> , 1997; Guerra <i>et al.</i> , 2001
<i>orf5</i> (Integrón clase 1)	ATGCACGACGCTGCGGCGTGGATG CAGCCGGGATTGAAAGTGTGACG	60	388	Martin/ (AF071413)
<i>istB</i> (Integrón clase 1)	TGGCATGGCACACGCCATTGAGGC AATGGCTGTGGCCAGGTGAGTC	60	307	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
<i>orfAB</i> (Integrón clase 1)	TCGATTACTTGGCAAAGTGCCCCC TGTCCGAATGGATAACCGGATG	60	783	Martin/ (AF071413)
<i>tniBA1</i> (Integrón clase 1)	GCGCCCACGCCACGGTTGCCGGG GCCGGCGCAGCGGGAGCGAAGC	60	333	Martin/ (AF071413)
<i>tniA</i> (Integrón clase 1)	GATCCTCCGGCGCACGCTGACCCA ATCTGGTCGAACGGTTTGGCGG	60	480	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
Is10-F/R2 (Tn10)	CTACCGAGTAACACCACACCGCTC AGCATCAGGGCGATTAGCAGC	60	536	Martínez, N., 2007
Is10-I (Tn10)	CTGAATGAATCCCCTAATG	55	9148	Schnabel y Jones, 1999
<i>tetR</i> (Tn10)	ACAACCCGTAAACTCGCC TTCCAATACGCAACCTAAAG	55	366	Morszeck <i>et al.</i> , 2004
<i>ybdA</i> (Tn10)	CGTACATGCCAAAGTTTCCACG	60	*a	
<i>ybfA</i> (Tn10)	TTGCCTGCTTTGTCACCTTC	60	*b	
<i>tnpA</i> (Tn3)	GTGCTGACTGGCAGGCAAATCGG GCCTGAAAATCAACCAGTCTGGC	60	532	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
<i>TnpA1721</i> (Tn1721)	ACTGGCTGCAAAGTGTTGAA TCCGTAAGGGCCGAAACTTC	60	360	

a* utilizado conjuntamente con Is10-I

b* utilizado conjuntamente con *tetR*

Tabla 3: Componentes de la mezcla de reacción de PCR.

Volumen final	DNA molde	H ₂ O	Oligonucleótido Directo 10 μM	Oligonucleótido Reverso 10 μM	Tampón 10x	dNTPs 2 mM	Taq Polimerasa 5 U/μl
15	1,5	7,425	1,5	1,5	1,5	1,5	0,075
25	2,5	12,375	2,5	2,5	2,5	2,5	0,125
50	5	24,5	5	5	5	5	0,5

Los volúmenes a utilizar se indican en μl. Todos los reactivos se descongelan y mantienen en hielo hasta la introducción de la mezcla en el termociclador. dNTPs, desoxirribonucleótidos.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *MinicyclerTM* (MJ Research INC) o *Gene Amp PCR System* (Perkin-Elmer). Como se indicó previamente la PCR consta de tres etapas: desnaturalización, anillamiento y elongación, que se repiten un cierto número de veces, de manera cíclica (Figura 18). Estos ciclos van precedidos de una etapa inicial de desnaturalización y seguidos de una etapa final de elongación. A continuación se describe el proceso con más detalle.

- Desnaturalización inicial: tiene lugar a una temperatura de 95°C durante 5 minutos. En este paso se separan las dos cadenas del DNA molde.
- Se realizan de 25 a 35 ciclos (lo más común son 30) que consisten en:
 - Desnaturalización: 5 segundos a 94-95°C.
 - Anillamiento: se produce la unión a las regiones complementarias en el DNA molde de los oligonucleótidos directo y reverso, que actuarán como iniciadores para la síntesis de DNA por la Taq polimerasa. La temperatura adecuada depende de los oligonucleótidos utilizados y se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$2(A+T) + 4(G+C) = T^a - 4 = T^a \text{ final}$$

Generalmente se encuentra en el rango de 50 a 65°C y se aplica de 30 segundos a 1 minuto.

- Elongación: Este paso se caracteriza por la adición secuencial de los distintos dNTPs a partir del extremo 3' de los iniciadores, llevada a cabo por la Taq polimerasa (*Roche*) que actúa siguiendo las instrucciones del

DNA molde. Generalmente se realiza a 72°C y el tiempo depende de la longitud del fragmento que se desee amplificar, correspondiéndose a 1 minuto por cada 1000 pares de bases a amplificar.

- La elongación final también tiene lugar a 72°C y puede durar entre 5 y 10 minutos.

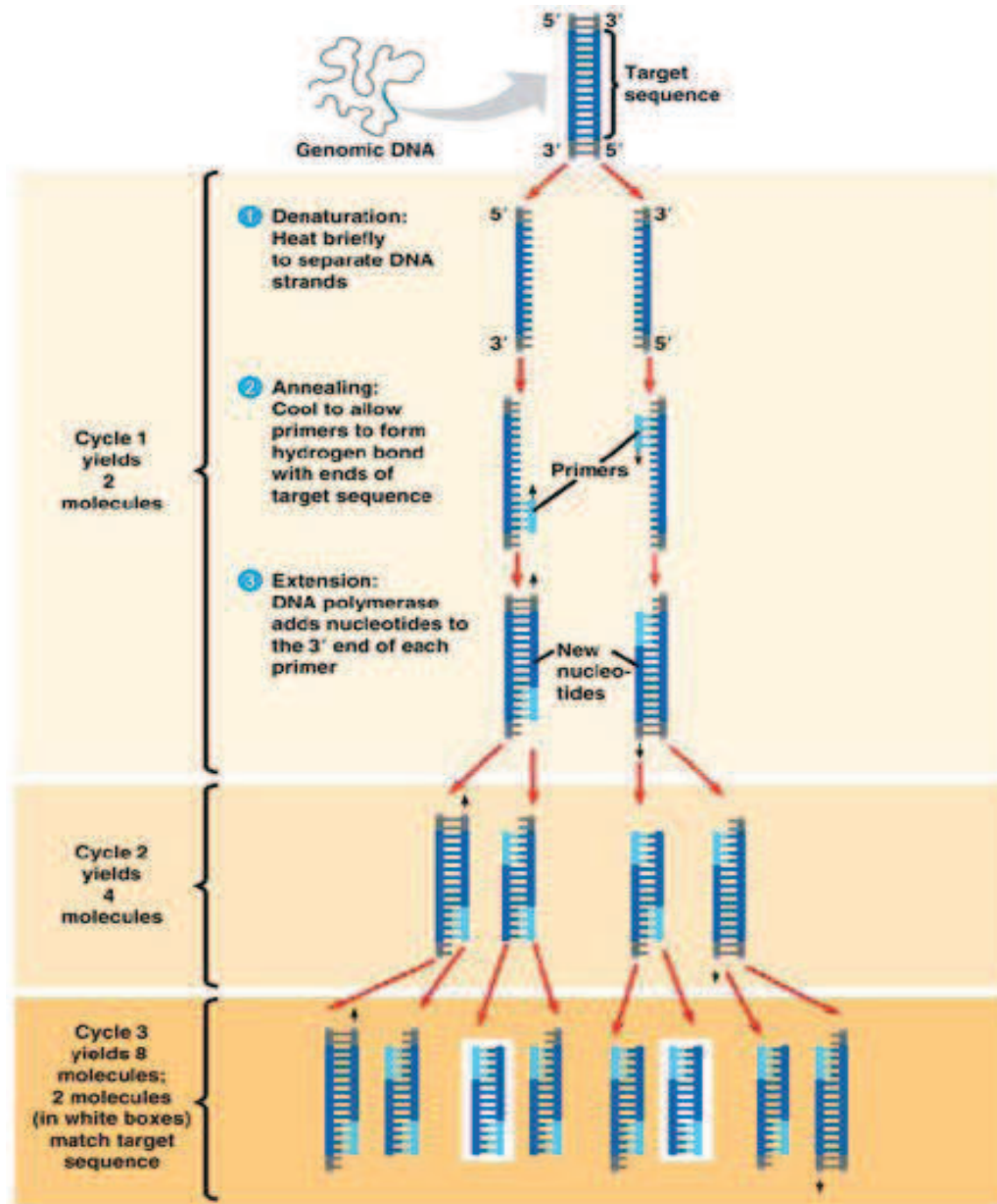


Figura 18: Fases de la reacción de amplificación mediante PCR

Una vez realizada la PCR, los fragmentos obtenidos se visualizan por electroforesis en gel de agarosa. Para la visualización por electroforesis se añade a cada una de las muestras 1/10 de tampón de carga (EDTA pH8 100 mM, glicerol al 50%,

SDS 1%, azul de bromofenol 0,2% (p/v), que actúa como colorante) y se colocan en un gel de agarosa. Como control de tamaños se utiliza DNA del fago λ digerido con PstI. Para preparar el gel se utiliza la agarosa a una concentración del 0,8% al 2% en tampón TAE 1X (preparado a partir de un stock a 25X y enrasado con agua destilada a 1L; el TAE 25X se prepara con 242 g Tris, 57,1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0,5M pH 8 y se completa hasta un volumen de 2 L con H₂O destilada). Se deja correr durante 45 minutos a 90 mV y posteriormente se tiñe sumergiéndolo en una solución diluida de bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) durante 5-15 minutos. El gel se destiñe en H₂O destilada para eliminar restos de bromuro de etidio, y se visualiza en un transiluminador con luz ultravioleta.

Secuenciación

La secuenciación de fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo para la detección de los cambios en el gen que codifica el enzima DNA girasa causantes de la resistencia al ácido nalidíxico en aislamientos de *S. Derby*.

Tras la reacción de PCR el DNA se purificó mediante un kit (*GE Healthcare, UK*), que consta de columnas por las que se hace pasar el ADN (*GFX MicroSpin™*) y 3 soluciones preparadas (*Wash buffer type 1, Capture buffer type 3, Elution buffer type 4*). El procedimiento que se siguió fue el que se describe a continuación:

Se añadieron 250 μ l de *Capture buffer type 3* a cada una de las muestras de reacción de PCR. La mezcla se depositó en las columnas proporcionadas por el kit, previamente colocadas en tubos colectores, y se centrifugó a 8.000 rpm durante 2 minutos, tras los cuales se extrajeron las columnas y se desechó el líquido eluido. A continuación se colocaron de nuevo las columnas dentro de los tubos, se añadieron 500 μ l de *Wash buffer type 1*, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 1 minuto y se transfirieron a tubos *ependorf* estériles. Tras esta segunda centrifugación se añadió a cada columna 50 μ l de *elution buffer type 4* (que consiste en H₂O destilada) y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 minuto. Pasado este tiempo se volvieron a centrifugar a 8.000 rpm durante 3 minutos, recogiendo el DNA en los tubos *ependorf* (Figura 19). Este se guardó a -20°C hasta su envío para la secuenciación.

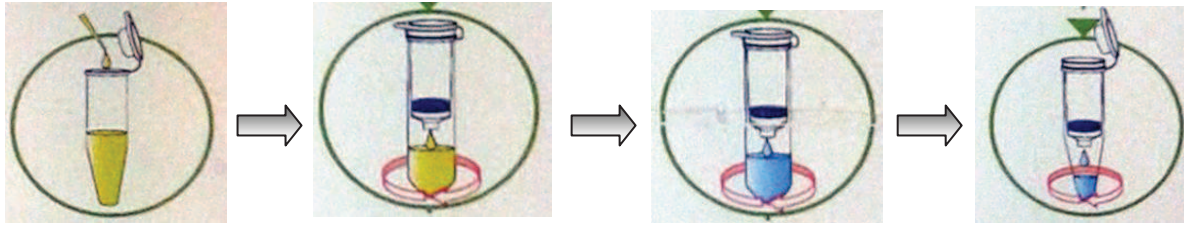


Figura 19: Esquema de las fases de purificación del DNA para la secuenciación

La secuenciación fue llevada a cabo por la compañía MACROGEN Inc. (Amsterdam). Las secuencias obtenidas se visualizaron con el programa *Chromas* (Griffith University) (Figura 20) y se procesaron con el programa *Clone Manager Professional Suite* versión 7

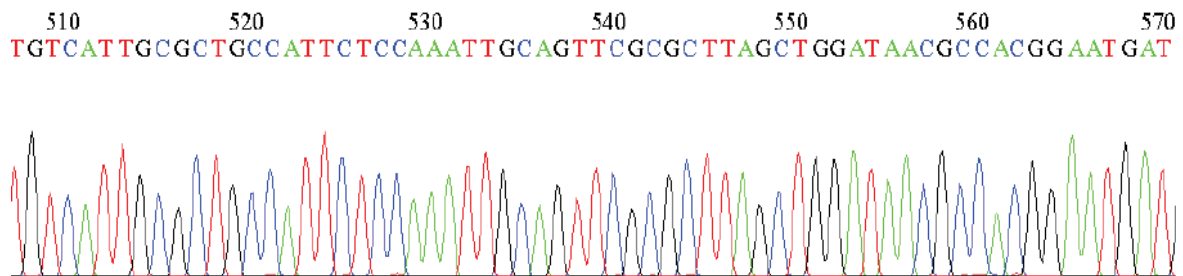


Figura 20: Cromatograma

Análisis plasmídico

Para el estudio de los plásmidos se utilizó un método basado en lisis alcalina, que aprovecha las diferencias existentes entre el DNA cromosómico y el plasmídico. La técnica realizada fue el método de Kado y Liu (Kado y Liu, 1981) que permite la extracción de plásmidos de gran tamaño. Para ello se utilizaron dos controles de tamaño procedentes de dos aislamientos VR2 y LT2 que portan plásmidos conocidos. VR2 lleva el plásmido pUO-StVR2 de 130Kb, mientras que LT2 lleva el plásmido pSLT de 94Kb. Los pasos a seguir se detallan a continuación:

Se sembró en 2,5 ml de LB una colonia aislada de los aislamientos a analizar y se incubó en agitación a 37°C toda la noche. Al día siguiente se transfirieron 1,5 ml del cultivo a un tubo *ependorf*, se centrifugaron durante 5 minutos a 14.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Al precipitado obtenido se adicionaron 20 µl de la solución KD-I (5 ml de Tris-HCl 1M pH 8, 200 µl de EDTA 0,5M pH 8 y H₂O destilada hasta

enrasar a 100 ml) y se resuspendieron las células para obtener una suspensión homogénea. A continuación, se añadieron 100 µl de la solución KD-II o mezcla de lisis (0,60 g de Tris, 3 g de SDS, 4,1 ml de NaOH 2N y enrasar hasta 100 ml con H₂O destilada; pH a 12,5) y se agitaron los tubos con suavidad por inversión. La muestra se incubó en un baño de agua a 55°C durante 30 minutos, tras los cuales se adicionaron 50 µl de fenol ácido y 50 µl de cloroformo-isoaminoalcohol, se mezcló suavemente por inmersión y se centrifugó de 10 a 15 minutos para separar las fases. En un nuevo tubo *eppendorf* se recogió la mayor cantidad posible de la fase acuosa con cuidado de no arrastrar la interfase que contiene los restos celulares.

El DNA plasmídico presente en la fase acuosa se visualizó por electroforesis en gel. Para ello se añadió 1/10 de tampón de carga a las muestras y se colocaron en un gel de agarosa al 0,6% en tampón TAE 1X. Como control se utilizó DNA del fago λ digerido con PstI. El gel se dejó correr durante 180 minutos a 120 mV y posteriormente se tiñó sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio durante 10-15 minutos. El gel se destiñó en H₂O destilada y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta, al igual que en el caso de fragmentos de PCR.

Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos de otros aislamientos de *S. enterica* procedentes de alimentos

Con fines comparativos, se realizaron antibiogramas a otros aislamientos de *S. enterica* procedentes de alimentos. En la tabla 6 se muestran los 60 aislamientos analizados, su serotipo y su procedencia.

Tabla 6: Aislamientos de *Salmonella enterica* no pertenecientes al serotipo Derby.

Aislamiento LSP	Serotipo	Origen
LSP 13/08	Paratyphi B	Derivado cárnico
LSP 16/08	London	Derivado cárnico
LSP 17/08	Stanley	Derivado cárnico
LSP 18/08	Stanley	Derivado cárnico
LSP 257/08	Goldcoast	Superficie canal bovino
LSP 258/08	Goldcoast	Superficie canal bovino
LSP 263/08	4,12:d:-	Superficie canal porcino
LSP 265/08	4,12:d:-	Superficie canal porcino

Aislamiento LSP	Serotipo	Origen
LSP 266/08	4,12:d:-	Superficie canal porcino
LSP 267/08	Lekke	Superficie canal porcino
LSP 269/08	4,12:d:-	Superficie canal bovino
LSP 270/08	4,12:d:-	Superficie canal bovino
LSP 271/08	4,12:d:-	Superficie canal bovino
LSP 286/08	4,12:d:-	Superficie canal porcino
LSP 287/08	London	Superficie canal porcino
LSP 288/08	London	Superficie canal porcino
LSP 289/08	London	Superficie canal porcino
LSP 290/08	London	Superficie canal porcino
LSP 292/08	4,12:d:-	Superficie canal porcino
LSP 17/09	Ohio	Hamburguesa
LSP 32/09	Muenchen	Picadillo
LSP 33/09	Muenchen	Picadillo
LSP 34/09	Muenchen	Picadillo
LSP 35/09	Litchfield	Picadillo
LSP 36/09	Muenchen	Picadillo
LSP 37/09	Muenchen	Picadillo
LSP 38/09	Muenchen	Chorizo de ternera
LSP 124/09	Enteritidis	Cascara de huevo
LSP 125/09	Enteritidis	Cascara de huevo
LSP 126/09	Enteritidis	Cascara de huevo
LSP 127/09	Enteritidis	Chorizo curado
LSP 136/09	4,12:d:-	Chorizo curado
LSP 132/10	Newport	Pollo al ajillo
LSP 141/10	Enteritidis	Lenguado relleno de marisco
LSP 142/10	Enteritidis	Sopa de marisco
LSP 7/11	London	Chorizo criollo
LSP 8/11	London	Chorizo criollo
LSP 9/11	London	Chorizo criollo
LSP 10/11	London	Chorizo criollo
LSP 11/11	London	Hamburguesa
LSP 12/11	London	Chorizo criollo
LSP 64/11	London	unknown
LSP 206/11	Bredeney	unknown
LSP 232/11	Wien	unknown
LSP 98/12	Rissen	Superficie canal porcino
LSP 99/12	Rissen	Superficie canal porcino
LSP 100/12	Infantis	Salsa ali-oli
LSP 101/12	Sub IV 6,14:z4,z23:-	Almejas
LSP 111/12	Hadar	Navajas
LSP 112/12	Hadar	Almejas
LSP 171/12	Veneciana	Navajas

Aislamiento LSP	Serotipo	Origen
LSP 189/12	Monofásica 4,12:i:-	Producto cárnico fresco
LSP 190/12	Monofásica 4,12:i:-	Producto cárnico fresco
LSP 191/12	Monofásica 4,5,12:i:-	Producto cárnico fresco
LSP 192/12	Monofásica 4,5,12:i:-	Producto cárnico fresco
LSP 193/12	Monofásica 4,5,12:i:-	Producto cárnico fresco
LSP 194/12	Monofásica 4,5,12:i:-	Producto cárnico fresco
LSP 195/12	Monofásica 4,5,12:i:-	Producto cárnico fresco
LSP 196/12	Monofásica 4,12:i:-	Producto cárnico fresco
LSP 215/12	Monofásica 4,12:i:-	Superficie canal bovino

LSP, Laboratorio de Salud Pública; todos los serotipos pertenecen a las subespecie 1 (no indicado) excepto uno que pertenece a la subespecie IV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby

Los aislamientos de *S. Derby* utilizados para la realización de este proyecto, en total 14, se obtuvieron a partir de muestras de canales de porcino y de alimentos cárnicos durante los años 2008, 2009, 2010, 2011 y 2012.

Estos aislamientos fueron cultivados en medio EMB mediante la técnica de siembra por agotamiento y posterior incubación a 37°C. En todos los casos las colonias obtenidas fueron transparentes, aspecto característico del género *Salmonella*, que no fermenta la lactosa presente en dicho medio (Figura 21).

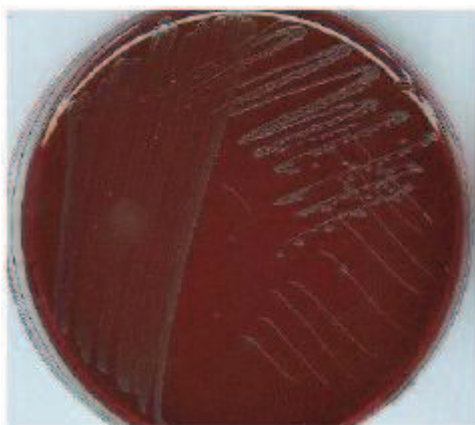


Figura 21: Crecimiento de *Salmonella enterica* en medio EMB.

Tipificación mediante macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante

Como se comentó anteriormente, se utilizaron para ello las endonucleasas XbaI y BlnI. El análisis de los aislamientos de *S. Derby* por digestión con XbaI, seguida de la separación de los fragmentos por PFGE reveló 9 perfiles, designados X1 a X9. Estos perfiles incluyeron de 14-19 fragmentos con tamaños comprendidos entre unas pocas pares de bases y 1.100 Kb (Figura 22).

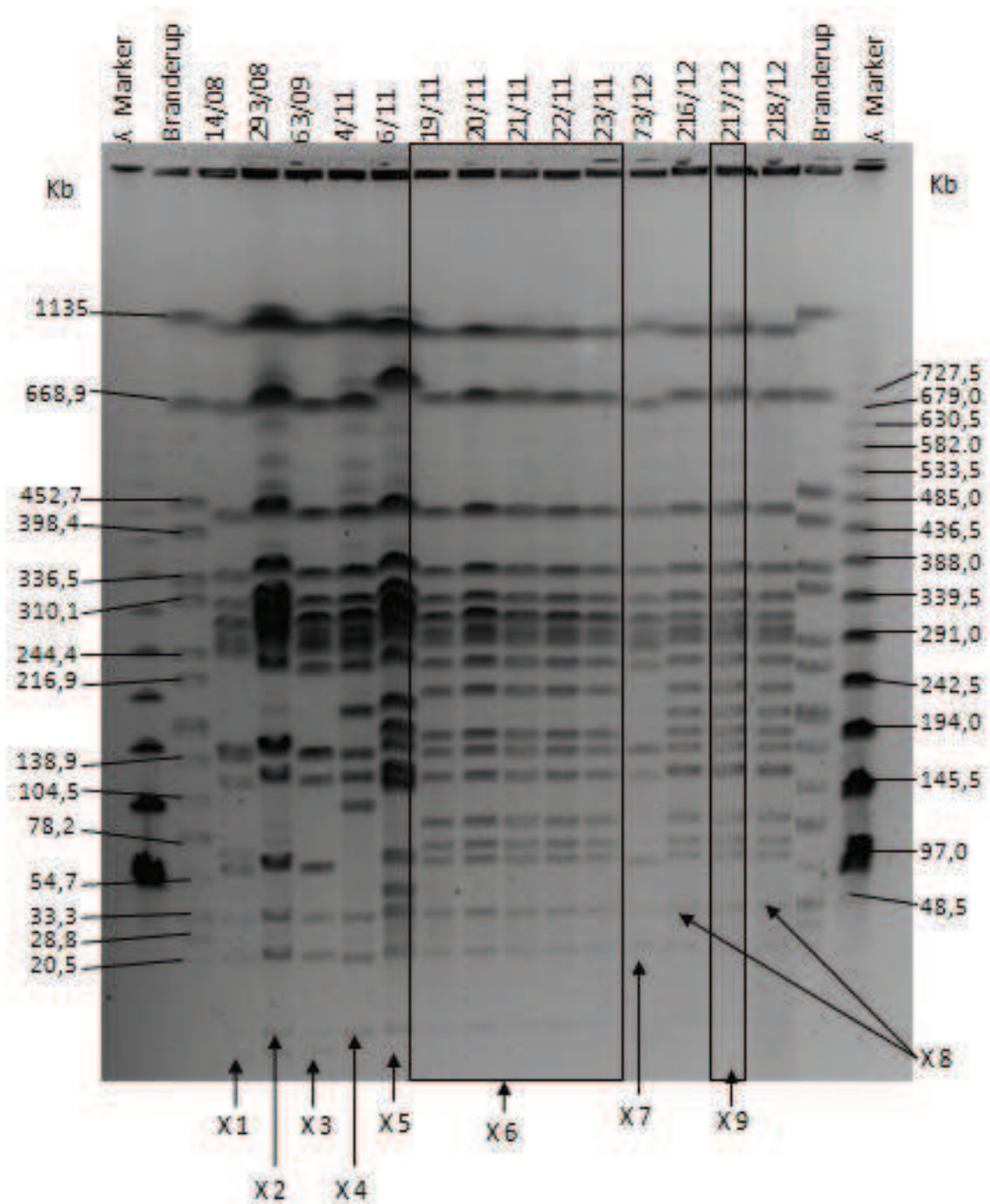


Figura 22: Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby. Calles 1 y 18, λ ladder PFGE marker; 2 y 17 DNA de *S. enterica* serovar Branderup H9812 digerido con XbaI; 3 a 16 perfiles X1 a X9 de los aislamientos analizados.

La mitad de los aislamientos mostraron perfiles únicos (X1 a X5 y X9); 5 aislamientos (19/11, 20/11, 21/11, 22/11 y 23/11) compartieron el perfil X6, y los 2 restantes (216/12 y 218/12) el perfil X8.

A partir de los 9 perfiles obtenidos se construyó un dendograma, basado en el coeficiente de similitud de Dice y utilizando el programa informático BioNumerics (Figura 23).

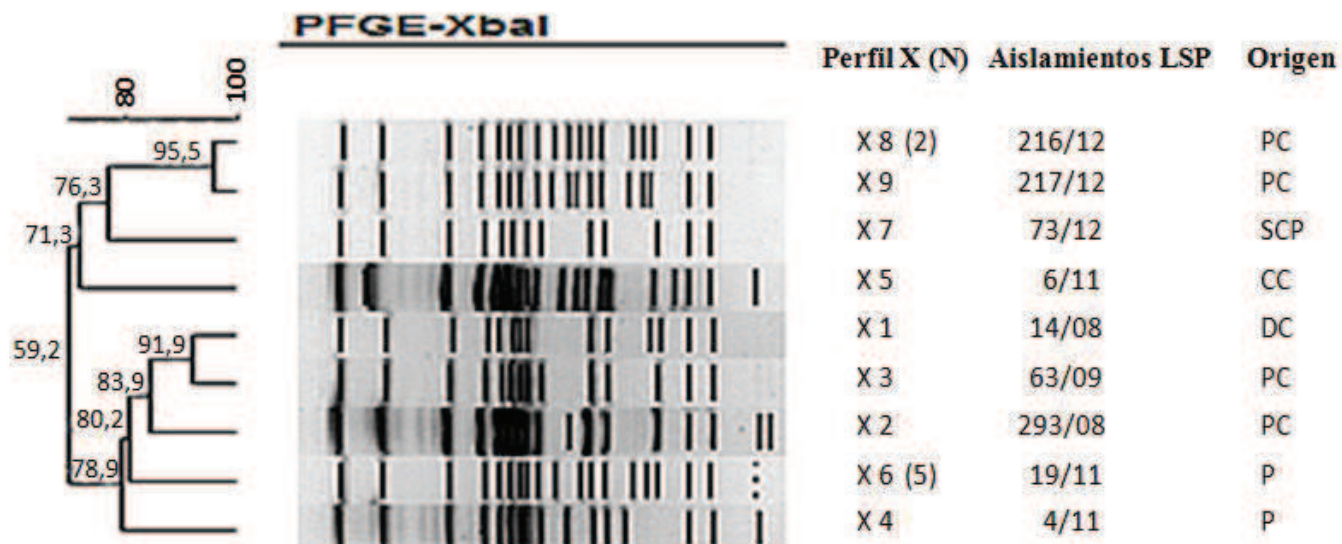


Figura 23: Dendograma de similitud basado en los perfiles XbaI-PFGE de *S. enterica* serotipo Derby, donde sólo se muestra un aislamiento representativo de cada perfil. N, número de aislamientos con el perfil indicado cuando fueron más de 1; LSP, Laboratorio de Salud Pública; CC, chorizo criollo; P, picadillo; PC, producto cárnico fresco; SCP, superficie canal porcino.

El dendograma reveló 2 agrupaciones que se separan a un coeficiente de similitud del 59,2%. La primera, establecida a un coeficiente de similitud del 71,3%, incluye 5 aislamientos. La segunda está integrada por 9 aislamientos, que presentan una similitud $\geq 78,9\%$, siendo 5 de ellos idénticos.

El índice de discriminación de los aislamientos de *S. Derby* obtenido por XbaI fue de 0,88.

El análisis de los aislamientos de *S. Derby* con el enzima BlnI generó 7 perfiles. En este caso cada perfil estaba formado por entre 12 y 15 fragmentos con tamaños entre 28 y 1.100 Kb, que se designaron con la letra B seguida de un número (Figura 24).

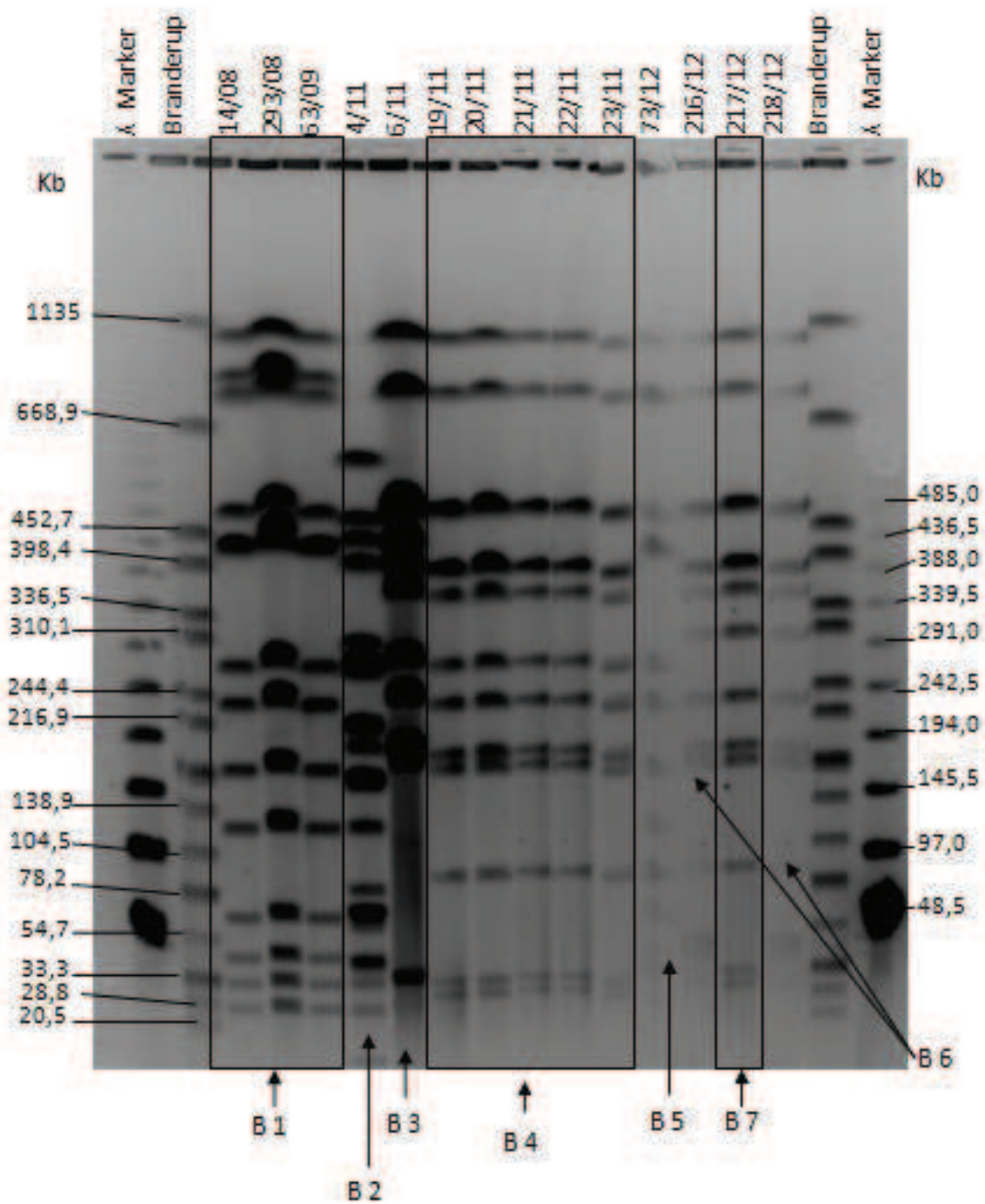


Figura 24: Perfiles BlnI-PFGE de aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby. Calle 1 y 18, λ ladder PFGE marker; 2 y 17, DNA de *S. enterica* serovar Branderup H9812 digerido con XbaI, 3 a 16 perfiles B1 a B9 de los aislamientos analizados.

4 aislamientos mostraron perfiles únicos (B2, B3, B5 y B7); 5 aislamientos (19/11, 20/11, 21/11, 22/11 y 23/11) compartieron el perfil B4, 3 aislamientos (14/08,

293/08, 63/09) el perfil B1 y los 2 restantes (216/12 y 218/12) el perfil B6. A partir de los 7 perfiles obtenidos se construyó el dendograma de similitud que se muestra en la figura 25.

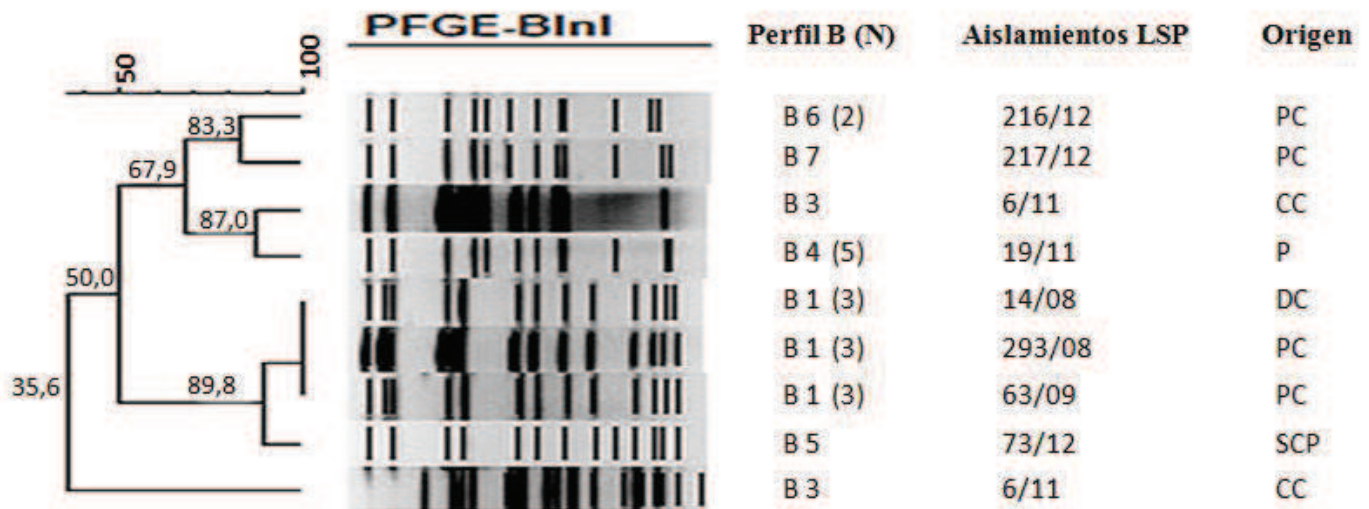


Figura 25: Dendograma de similitud basado en los perfiles BlnI de *S. enterica* serotipo Derby, seleccionando aislamientos representativos de cada perfil. N, número de aislamientos con el perfil indicado cuando fueron más de 1; LSP, Laboratorio de Salud Pública; CC, chorizo criollo; P, picadillo; PC, producto cárnico fresco; SCP, superficie canal porcino

El dendograma construido en base a los perfiles BlnI agrupó los 14 aislamientos en dos clusters, separados a un coeficiente de similitud del 35,6%. Uno de ellos incluye exclusivamente al aislamiento 4/11 y el otro a los 14 restantes, repartidos en dos subclusters con 9 y 5 aislamientos, respectivamente. Dentro del primer subcluster (similitud $\geq 67,9\%$), los aislamientos 216/12 y 218/12 por un lado y los aislamientos 19/11, 20/11, 21/11, 22/11 y 23/11 por otro, compartieron el mismo perfil. En el segundo subcluster, 3 aislamientos cuyos perfiles XbaI habían sido diferentes (14/08, 293/08 y 63/09) coinciden, sin embargo, en cuanto a perfil BlnI.

El índice de discriminación los aislamientos de *S. Derby* obtenido por BlnI fue de 0,84.

Análisis fenotípico de la resistencia a antimicrobianos

En un segundo paso se valoró la sensibilidad/resistencia de los aislamientos de *S. Derby* frente a un panel de 9 antimicrobianos mediante la técnica de difusión en agar. Los antibióticos utilizados para analizar las resistencias fueron ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, ácido nalidíxico, estreptomycin, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim (Tabla 3). El mecanismo de actuación de los antimicrobianos ensayados y los resultados obtenidos se muestran en las tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 7: Antimicrobianos utilizados, grupo y mecanismo de actuación.

Antimicrobiano	Grupo	Mecanismos de actuación
Ampicilina	β -lactámico	Interfiere con la biosíntesis del peptidoglicano, componente esencial de la pared celular.
Gentamicina	Aminoglucósido	Se une de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando la iniciación de la síntesis de proteínas.
Kanamicina	Aminoglucósido	Se une de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando la iniciación de la síntesis de proteínas.
Estreptomycin	Aminoglucósido	Se une de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando la iniciación de la síntesis de proteínas.
Tetraciclina	Tetraciclina	Se une de manera reversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando la elongación de la cadena peptídica.
Cloranfenicol	Fenicoles	Inhibe la síntesis proteica al unirse reversiblemente a la subunidad ribosomal 50S bloqueando la actuación del enzima peptidil transferasa.
Ácido nalidíxico	Quinolona	Bloquea a los enzimas topoisomerasa II (DNA girasa) y topoisomerasa IV, que intervienen en los procesos de replicación, partición y transcripción del DNA.

Antimicrobiano	Grupo	Mecanismos de actuación
Sulfonamidas	Sulfonamida	Análogos estructurales del ácido p-amino benzoico. Inhiben de forma competitiva al enzima dihidropteroato sintetasa, impidiendo la síntesis de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. Este último interviene en la síntesis de purinas y pirimidinas (elementos esenciales en la construcción de los ácidos nucleicos).
Trimetoprim	Diaminopirimidina	Compite por la enzima dihidrofolato reductasa impidiendo, al igual que las sulfonamidas, la síntesis de ácido fólico.

Considerando a los antimicrobianos individuales, la resistencia más frecuente fue a ácido nalidíxico (9/14), seguida por tetraciclina (8/14), estreptomycin y sulfonamidas (4/14 cada una) y ampicilina (3/14). Por el contrario ninguno de los aislamientos mostró resistencia a cloranfenicol, gentamicina, kanamicina y trimetoprim.

Las resistencias detectadas se distribuyeron en 9 perfiles, donde R0 incluye a un único aislamiento sensible a todos los antimicrobianos analizados. Los demás perfiles comprenden una (R1 y R2), dos (R3), tres (R4 a R6) o cuatro (R7 y R8) resistencias, considerándose los dos últimos como multirresistentes.

Tabla 8: Perfiles de resistencia de aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby procedentes de canales porcinas y alimentos cármicos

Perfil-R	Fenotipo	Genotipo	EGM	Perfil-P	Perfiles X B	Aislamientos LSP	Origen
R0	Sensible			P5	X5 B3	6/11	CC
R1	T	<i>tet</i> (B)	Tn10	P4	X4 B2	4/11	P
R2	N	<i>gyrA</i> (Asp ₈₇ /Asn)		P6	X6 B4	19/11, 20/11, 21/11, 22/11, 23/11	P
R3	N-T	<i>gyrA</i> (Asp ₈₇ /Asn)-NI		P9	X9 B7	217/12	PC
R4	A-N-T	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>gyrA</i> (Asp ₈₇ /Asn)- <i>tet</i> (A)		P8	X8 B6	216/12	PC
				P10	X8 B6	218/12	PC
R5	S-Su-T	<i>aadA2-sul1-tet</i> (A)	In, Tn1721	P3	X3 B1	63/09	SCP
R6	S-Su-T	<i>aadA2-sul1-sul2-tet</i> (A)	In, Tn1721	P2	X2 B1	293/08	SCP
R7	N-S-Su-T	<i>gyrA</i> (Asp ₈₇ /Asn)- <i>aadA2-sul1-tet</i> (A)	In, Tn1721	P1	X1 B1	14/08	DC
R8	A-S-Su-T	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>aadA2-sul2-tet</i> (A)	Tn3	P7	X7 B5	73/12	SCP

R, Resistencia; LSP, Laboratorio de Salud Pública; EGM, elemento genético móvil; P, plasmídico; A, ampicilina; N, ácido nalidixico; S, estreptomicina; Su, sulfonamidas; T, tetraciclina; NI, no identificado; In, integrón de clase 1; Tn, transposón; CC, chorizo criollo; DC, chorizo cármico; P, picadillo; PC, producto cármico fresco; SCP, superficie canal porcino

Detección de genes de resistencia a antimicrobianos

Los aislamientos de *S. Derby* resistentes a algún antimicrobiano fueron analizados mediante PCR para identificar los genes de resistencia responsables. (Tabla 8).

En los 8 aislamientos resistentes a tetraciclina se investigó la presencia de los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)*, que codifican proteínas de membrana que actúan como bombas de expulsión del antimicrobiano. En 6 aislamientos, 14/08, 293/08, 63/09, 73/12, 216/12 y 218/12, se detectó el gen *tet(A)*; en el aislamiento 4/11 el gen implicado fue *tet(B)*, mientras que en el aislamiento 217/12 el gen causante de la resistencia a tetraciclina no pudo ser identificado, ya que no se obtuvo un resultado positivo para ninguno de los 3 estudiados.

Los 4 aislamientos resistentes a estreptomicina fueron positivos para el gen *aadA2*, que codifica una enzima adenil transferasa que modifica el antibiótico, inactivándolo.

En los 4 aislamientos resistentes a sulfonamidas se investigó la presencia de los genes *sul1*, *sul2* y *sul3*, que codifican enzimas dihidropteroato sintetasa alternativas, resistentes a dichos agentes. Se encontró el gen *sul1* en 2 aislamientos, 14/08 y 63/09; el gen *sul2* en el aislamiento 73/12; y en el caso del aislamiento 293/08 amplificaron ambos genes.

En los 3 aislamientos que presentaban resistencia a ampicilina se realizaron ensayos usando iniciadores específicos para los genes *bla_{TEM-1}* y *bla_{PSE-1}* que codifican β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de las penicilinas. En todos los casos amplificó el gen *bla_{TEM-1}*.

La resistencia ácido nalidíxico se debe a mutaciones en los genes que codifican las enzimas topoisomerasa II (DNA girasa, que consta de dos subunidades, A y B) o topoisomerasa IV. Dado que las mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la DNA girasa, son la causa más común de resistencia al ácido nalidíxico en *S.*

enterica, se amplificó este gen a partir de 4 de los 9 aislamientos resistentes a este compuesto y se secuenciaron los fragmentos obtenidos. Los aislamientos fueron 14/08 (perfil combinado X1 B1); 21/11 (escogido como representante del perfil X6 B4 que comparte con 19/11, 20/11, 22/11 y 23/11); 216/12 (perfil X8 B6 al igual que 218/12) y 217/12 (perfil X9 B7). Los 4 cuatro fragmentos secuenciados mostraron la misma mutación en el codón correspondiente al Aspártico de la posición 87 (Asp₈₇) que cambió a Asparagina (Asn).

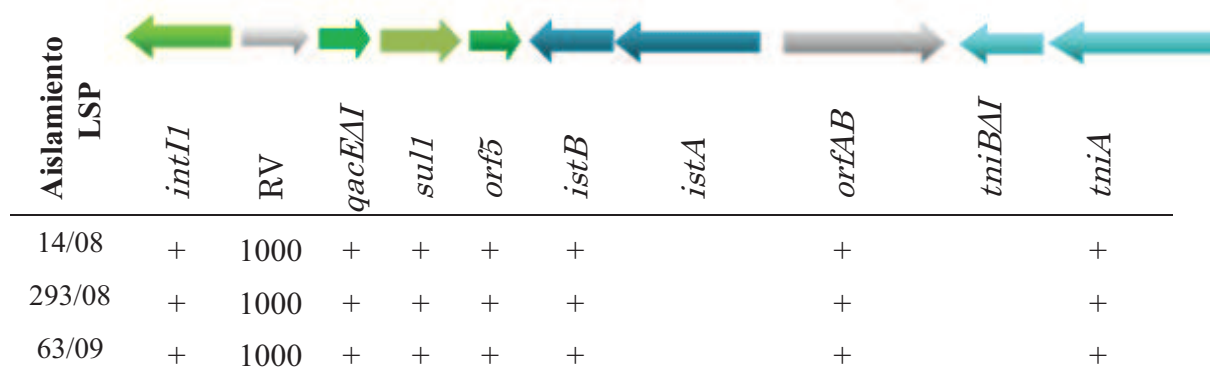
Detección de Elementos Genéticos Móviles (EGM)

A continuación se llevó a cabo la detección de EGMs previamente descritos en asociación con los genes de resistencia identificados, en concreto, los integrones de clase 1 y los transposones Tn10, Tn1721 y Tn3. La presencia de dichos elementos se puso de manifiesto mediante amplificación por PCR de genes o regiones específicas de cada uno de ellos (Tablas 5; Figuras 26, 27, 28 y 29).

Como se comentó anteriormente, los integrones de clase 1 contienen el gen *sulI* de resistencia a sulfonamidas en su segmento 3'-CS. Por ello su presencia se estudió en los 3 aislamientos en los que se había encontrado ese gen: 14/08, 293/08 y 63/09. Todos ellos dieron amplificación positiva para el gen *intI1*, que codifica la integrasa de clase 1, y generaron un amplicón de unas 1000 pb con los oligonucleótidos 5'CS-3'CS, correspondiente a la región variable donde se localizan las casetes génicas del integrón. El tamaño del amplicón es consistente con la inserción de la casete génica *aadA2*, ampliamente distribuida en integrones de clase 1 de *S. enterica*. Otras amplificaciones positivas demostraron la presencia de IS1353 (*orfAB*), IS1326 (*istB*) y del módulo de transposición defectivo (*tniA*) en el integrón de los aislamientos de *S. Derby* (Figura 26).

El gen *tet(B)*, que codifica una bomba de expulsión que confiere resistencia a tetraciclina, se localiza normalmente en el transposón Tn10. La presencia de este transposón en el único aislamiento de *S. Derby* portador del gen *tet(B)*, 4/11, se confirmó en base a la amplificación positiva de un fragmento comprendido entre los

genes *ybdA* y *tetR*, y de la secuencia de inserción *IS10* característica de este transposón compuesto (Figura 27). Probablemente, sólo una de las dos copias de esta secuencia de inserción está presente, ya que no fue posible amplificar el fragmento comprendido entre *ybfA* e *IS10*.



Figuras 26: Resultados de las amplificaciones mediante PCR realizadas a partir de los aislamientos que contenían el gen *sulI* asociado a integrones de clase 1. La región variable (RV) presentó un tamaño de unas 1000 pb, consistente con la presencia del gen *aadA2*.

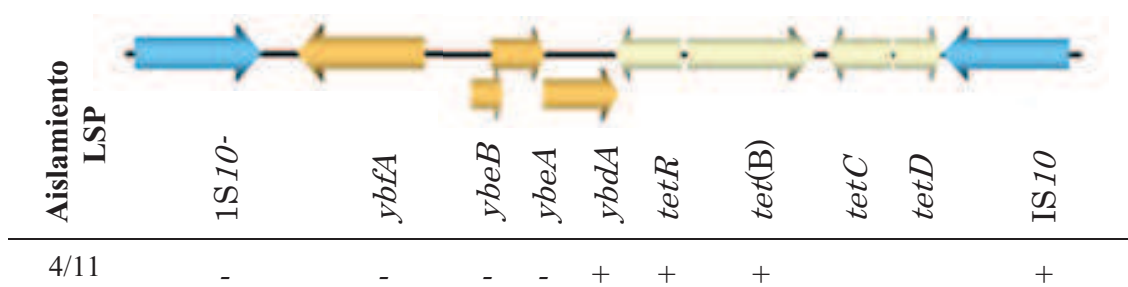
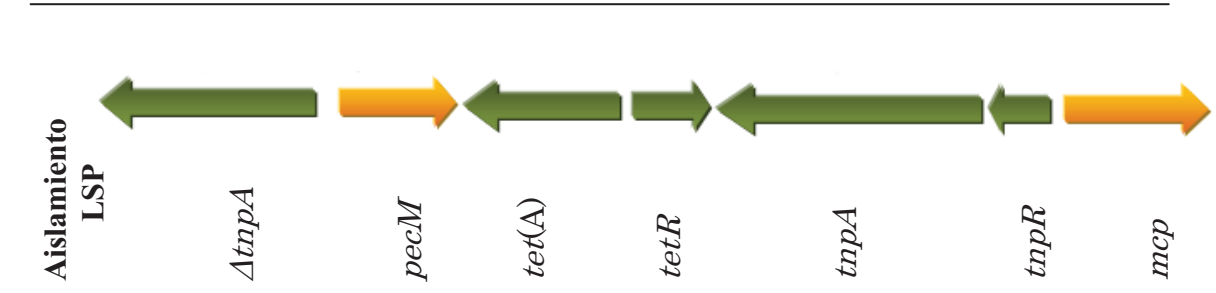


Figura 27: Resultados de las amplificaciones mediante PCR de genes o regiones específicas del transposón *Tn10* en el único aislamiento de *S. enterica* serotipo Derby portador del gen *tet(B)*.

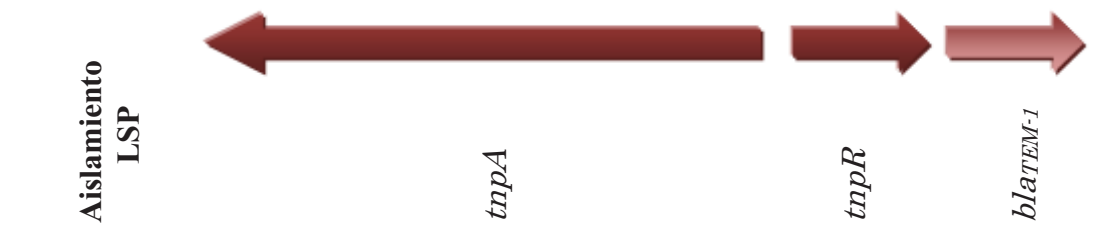
El gen *tet(A)* que, al igual que *tet(B)*, codifica una bomba de expulsión de tetraciclina, es transportado por el transposón complejo *Tn1721*. La presencia de este transposón se puso de manifiesto en 4 de los 7 aislamientos portadores de *tet(A)*, 14/08, 293/08, 63/09 y 218/12. De hecho, a partir de todos ellos se obtuvieron los amplicones correspondientes al gen *tnpA*, específico de este transposón. En los otros 3 aislamientos portadores de *tet(A)*, 16/12, 73/12 y 217/12 esas amplificaciones fueron negativas (Figura 28). En estos aislamientos, el transposón *Tn1721* podría estar deletado o el gen *tet(A)* podría tener una localización diferente.



Aislamiento LSP	$\Delta tnpA$	<i>pecM</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tetR</i>	<i>tnpA</i>	<i>tnpR</i>	<i>mcp</i>
14/08			+		+		
293/08			+		+		
63/09			+		+		
16/12			+		-		
73/12			+		-		
217/12			-		-		
218/12			+		+		

Figura 28: Resultados de la amplificación mediante PCR del gen *tnpA* que codifica la transposasa de Tn1721, en los aislamientos que contenían el gen *tet(A)*.

El gen *bla*_{TEM-1} de resistencia a ampicilina se localiza normalmente en el transposón Tn3. Para determinar la asociación entre *bla*_{TEM-1} y Tn3 se realizó una PCR de anclaje entre el gen de resistencia y el gen *tnpR* adyacente, que codifica la resolvasa del transposón. Además también se realizó una amplificación del gen *tnpA* que codifica la transposasa específica de este transposón. Estos estudios se llevaron a cabo en los 3 aislamientos resistentes a ampicilina, 73/12, 216/12 y 218/12, obteniéndose resultados positivos sólo en 73/12. En los otros 2 aislamientos podrían existir versiones deletionadas de Tn3 o el gen *bla*_{TEM} tendría una localización diferente (Figura 29).



Aislamiento LSP	<i>tnpA</i>	<i>tnpR</i>	<i>bla</i> _{TEM-1}
73/12	+	+	+
216/12	-	-	+
218/12	-	-	+

Figura 29: Resultados de la amplificación mediante PCR de genes del transposón Tn3 en aislamientos que contenían el gen *bla*_{TEM-1}.

Detección de plásmidos

El estudio de los plásmidos se llevó a cabo mediante el método extracción de Kado y Liu.

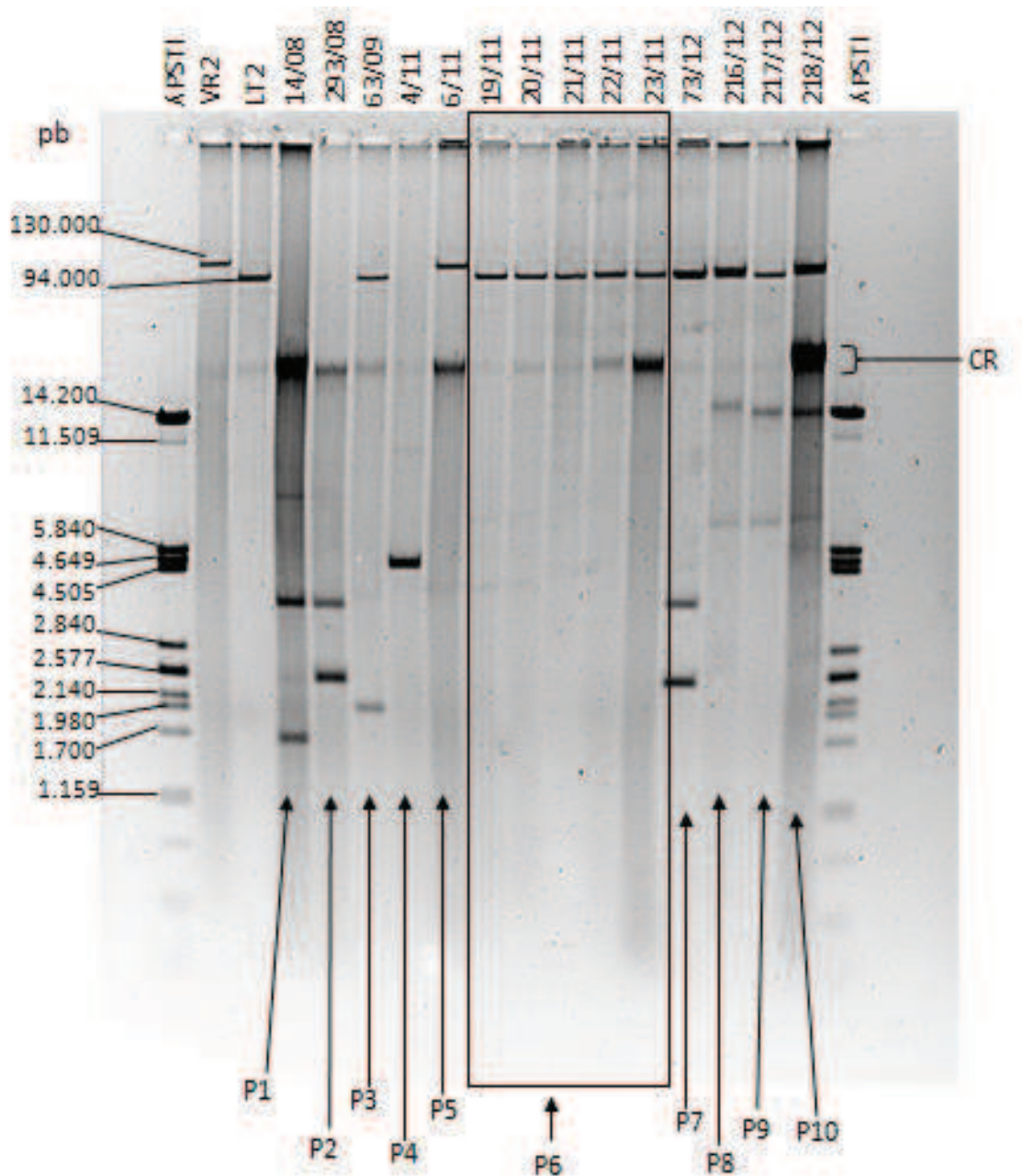


Figura 30: Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby. Calles 1 y 18, DNA del fago λ digerido con PstI; 2: Plásmido pUO-StVR2 de 130 Kb; 3: Plásmido pSLT de 94 Kb; 4-17, perfiles plasmídicos P1 a P10 de los aislamientos analizados; CR, DNA cromosómico.

El análisis plasmídico de los 14 aislamientos reveló la presencia de DNA extracromosómico en todos ellos. Cabe destacar que todos, excepto tres (14/08, 293/08 y 4/11), contienen plásmidos de gran tamaño: 130 Kb (6/11) o 90 Kb (63/09, 19/11, 20/11, 21/11, 22/11, 23/11, 73/12, 216/12, 217/12 y 218/12), aproximadamente. Además, el de 90 Kb aparece acompañado de uno o más plásmidos de menor tamaño (entre 2 y 14 Kb) en 4 aislamientos (63/09, 73/12, 216/12, 217/12 y 218/12). En total, los aislamientos de *S. Derby* presentaron 10 perfiles plasmídicos, designados con P seguida de un número (Figura 30). La posible contribución de estos plásmidos, tanto a la resistencia como a otras funciones ventajosas para *S. Derby*, será investigada en el futuro.

En conjunto, las técnicas de tipificación utilizadas permitieron diferenciar a todos los aislamientos de *S. Derby*, excepto un grupo de cuatro recuperados de picadillo durante el año 2011 (19/11, 20/11, 21/11, 23/11). Estos aislamientos, que compartieron todas las características analizadas, se asignaron a una misma cepa que pudo haber contaminado la carne utilizada en la preparación del picadillo. Los 10 aislamientos restantes corresponden a cepas diferentes, lo que revela la diversidad de *S. Derby* circulante en el Principado de Asturias.

Análisis de la sensibilidad a antimicrobianos de otros serotipos de *S. enterica* procedentes de alimentos e identificación de los genes responsables

Con fines comparativos se realizaron antibiogramas a otros aislamientos de *S. enterica* no pertenecientes al serotipo Derby, procedentes de alimentos (Tabla 6). En total se utilizaron 60 aislamientos pertenecientes a 19 serotipos de *S. enterica* subesp. *enterica* o I (59 aislamientos bifásicos o monofásico) y a un serotipo de *S. enterica* subesp. *houtenae* o IV (1 aislamiento). Se valoró la sensibilidad de los 60 aislamientos frente al mismo panel de 9 antimicrobianos utilizados para el análisis de *S. Derby* (Tabla 3)) y se identificaron los genes responsables de la mayor parte de las resistencias detectadas. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9: Perfiles de resistencia y procedencia de aislamientos de *S. enterica* pertenecientes a serotipos distintos de *S. Derby*

Perfil-R	Fenotipo	Genotipo	Aislamientos LSP	Origen
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo London (12)				
Lo-R0	Sensible		16/08, 64/11	DC, D
Lo-R1	N	NI	287/08, 288/08, 289/08, 290/08, 7/11, 8/11, 10/11, 11/11, 12/11	SCP, CC, HA
Lo-R2	N-T	<i>tet(A)</i>	9/11	CC
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo 4,12:d:- (9)				
Mf1-R1	N		263/08, 265/08, 266/08, 270/08, 271/08, 286/08, 292/08, 136/09	SCP, SCB, CCU
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Enteritidis (6)				
E-R0	Sensible		124/09	HU
E-R1	N	NI	125/09, 126/09, 127/09, 141/10, 142/10	HU, LEN
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Muenchen (6)				
M-R0	Sensible		32/09, 33/09, 34/09, 36/09, 37/09, 38/09	P, CT
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo 4,5,12:1:- (5)				
Mf2-R1	T	<i>tet(B)</i>	191/12, 192/12, 193/12, 194/12, 195/12	PC
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo 4,12:i:- (4)				
Mf3-R1	A-S-Su-T	<i>bla_{TEM-1}-strAB-sul2-tet(B)</i>	189/12, 190/12, 196/12,215/12	PC, SCB
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Hadar (2)				

H-R1	N-T	NI- <i>tet</i> (A)	111/12	NA
H-R2	N-S-T	NI- <i>strAB-tet</i> (A)	112/12	AL
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Rissen (2)				
Rs-R1	A-C-S-Su-T-Tp	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>cmiA</i> - <i>aadA2-sulI-sul3-tet</i> (A)- <i>dhfrA1</i>	99/12	SCP
Rs-R2	A-C-S-Su-T-Tp	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>cmiA</i> - <i>aadA2-sulI-sul2-sul3-tet</i> (A)- <i>dhfrA1</i>	98/12	SCP
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Stanley (2)				
S-R1	N	NI	17/08, 18/08	DC
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Goldcoast (2)				
Go-R0	Sensible		257/08, 258/08	SCB
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Wien (1)				
W-R1	A-C-S-Su-T-Tp	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>cmiA</i> - <i>aadA2-sulI-sul2-sul3-tet</i> (B)- <i>dhfrA1</i>	232/11	D
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Paratyphi (1)				
Pa-R1	A-N-S-Su-Tp	<i>bla</i> _{TEM-1} -NI - <i>aadA2-sulI-dhfrA12</i>	13/08	DC
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Newport (1)				
N-R1	A-Su-T-Tp	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>sul2-tet</i> (A)- <i>dhfrA12</i>	132/10	PAJ
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Ohio (1)				
O-R1	N	NI	17/09	HA

<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Veneciana (1)			
V-R1	N	NI	171/12
			NA
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Bredeneý (1)			
B-R0		Sensible	206/11
			D
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Infantis (1)			
I-R0		Sensible	100/12
			SA
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Lekke (1)			
Le-R0		Sensible	267/08
			SCP
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Litchfield (1)			
Li-R0		Sensible	35/09
			P
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV) serotipo 6,14:z4,z23:- (1)			
IV-R0		Sensible	101/12
			AL

R, Resistencia; LSP, Laboratorio de Salud Pública; Mf1, serotipo monofásico 4,12:d:-; Mf2, serotipo monofásico 4,5,12:i:-; Mf3, serotipo monofásico 4,12:i:-; Lo, London; E, Enteritidis; M, Muenchen; H, Hadar; Rs, Rissen; Go, Goldcoast; W, Wien; Pa, Paratyphi B; Ne, Newport; O, Ohio; V, Veneciana; B, Bredeneý; I, Infantis; Le, Lekke; Li, Litchfield; IV, *S. enterica* subsp. IV (*houtenae*) serotipo 6,14:z4,z23:-; A, ampicilina; C, cloranfenicol; G, gentamicina; K, kanamicina; N, ácido nalidixico; S, estreptomina; Su, sulfonamidas; T, tetraciclina; Tp, Trimetoprim; NI, no identificado; AL, almejas; CC, chorizo criollo; CCU, chorizo curado; CT, chorizo de ternera; D, desconocido; DC, derivado cárnico; HA, hamburguesa; HU, huevo; LEN, lenguado relleno de marisco; NA, navajas; P, picadillo; PAJ, pollo al ajillo; PC, producto cárnico fresco; SA, salsa alioli; SCB, superficie canal bovino; SCP, superficie canal porcino

Se encontraron 12 aislamientos de *S. London* distribuidos en tres perfiles. Lo-R0, que incluye 2 aislamientos sensibles a todos los antimicrobianos estudiados; Lo-R1 formado por 9 aislamientos resistentes a ácido nalidíxico; y Lo-R2 con un único aislamiento resistente también a ácido nalidíxico y portador del gen *tet(A)* de resistencia a tetraciclina.

El segundo serotipo más frecuente fue *S. enterica* subsp. *enterica* perteneciente al serotipo monofásico 4,12:d:-, con 9 aislamientos que fueron agrupados en el perfil Mf1-R1 caracterizados por mostrar resistencia a ácido nalidíxico.

Terceros en frecuencia fueron *S. Enteritidis* y *S. Muenchen*, ambos con 6 aislamientos. En el caso de *S. Enteritidis*, 5 fueron resistentes a ácido nalidíxico (perfil E-R1) y uno sensible (perfil E-R0), mientras que todos los de *S. Muenchen*, fueron sensibles, asignándose al perfil Mu-R0.

El cuarto serotipo más frecuente fue la variante monofásica 4,5,12:i -, de *S. enterica* subsp. *enterica*, con 5 aislamientos resistentes a tetraciclina (perfil Mf2-R1) en los que se detectó el gen *tet(B)*.

En quinta posición se sitúa la variante monofásica 4,12:i:-, con el perfil Mf-R3 compartido por 4 aislamientos, que se caracterizó por la presencia de genes *bla*_{TEM-1}, *strAB*, *sul2* y *tet(B)* que confieren resistencia a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina.

Al serotipo Hadar se asignaron 2 aislamientos, cada uno con un perfil diferente. H-R1 incluyó resistencia al ácido nalidíxico y resistencia a tetraciclina, conferida por el gen *tet(A)*, y H-R2 presentó, además los genes *strAB* responsables de la resistencia adicional a estreptomicina.

Al igual que *S. Hadar*, el serotipo Rissen incluyó 2 aislamientos con 2 perfiles diferentes: Rs-R1 y Rs-R2. Ambos comparten las resistencias frente a ácido nalidíxico y tetraciclina, conferida esta última por el gen *tet(A)*, y H-R2 presenta además el gen *sul2* de resistencia a sulfonamidas.

A los serotipos Stanley y Goldcoast se asignaron también 2 aislamientos, que en el primer caso compartieron el mismo perfil (S-R1) de resistencia a ácido nalidíxico y en el segundo caso fueron sensibles (Go-R0).

Los demás serotipos (9 en total) incluyeron un único aislamiento y, por tanto, un único perfil. Destacan los perfiles multirresistentes de *S. Wien* [W-R1: ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim/*bla*_{TEM-1}, *cmlA*, *aadA2*, *sul1*, *sul2* y *sul3*, *tet(B)* y *dhfrA1*]; *S. Newport* [N-R1: ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y trimetoprim/*bla*_{TEM-1}, *aadA2*, *sul1* y *dhfrA12*] y *S. Paratyphi B* [Pa-R1: ampicilina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim/*bla*_{TEM-1}, *sul2*, *tet(A)* y *dhfrA12*].

Otros serotipos con un sólo aislamiento fueron *S. Ohio*, *S. Veneciana*, ambos con resistencia a ácido nalidíxico, *S. Bredeney*, *S. Infantis*, *S. Lekke*, *S. Litchfield* y el único aislamiento no perteneciente a *S. enterica* subesp. *enterica*, sino a la subsp. IV, todos ellos sensibles a los antimicrobianos ensayados.

Consideradas las resistencias individuales en conjunto, la más común fue a ácido nalidíxico, presentada por 31 de los 60 aislamientos pertenecientes a 8 serotipos. Sin embargo, las bases genéticas de esta resistencia no fueron investigadas. En segundo lugar se detectó la resistencia a tetraciclina, observada en 16 aislamientos de 7 serotipos. En tercer, cuarto y quinto lugar se sitúan las resistencias frente a ampicilina, estreptomicina y sulfonamida, encontrada cada una de ellas en 9 aislamientos, pertenecientes en cada caso a 5 serotipos distintos. En sexto lugar se sitúa la resistencia a trimetoprim detectada en 5 aislamientos de 4 serotipos. Por último, en séptimo lugar está la resistencia a cloranfenicol, encontrada sólo en 3 aislamientos de 2 serotipos. Por el contrario ninguno de los aislamientos analizados mostró resistencia a kanamicina ni a gentamicina.

Comparación de *S. enterica* serotipo Derby con otros serotipos encontrados en alimentos en el Principado de Asturias

A excepción de *S. Typhimurium* (que no se incluyó en el presente trabajo por ser objeto de una Tesis Doctoral de nuestro grupo), *S. Derby* fue el serotipo más común en las muestras analizadas por el LSP del PA.

En cuanto a la resistencia frente a antimicrobianos, destaca la diversidad de perfiles detectados en *S. Derby* (14 aislamientos repartidos en 8 perfiles; Tabla 8), mientras que otros serotipos mayoritarios analizados en este trabajo fueron más homogéneos. Este es el caso de *S. London* y *S. 4,12:d:-*, con 12 y 9 aislamientos, distribuidos en 3 perfiles y 1 perfil, respectivamente.

De los 8 perfiles de *S. Derby*, sólo 4 (R0, R1, R2 y R3, con 0, 1 o 2 resistencias) fueron compartidos, al menos a nivel de fenotipo, por aislamientos de otros serotipos. Se comprobó, sin embargo, que los genes de resistencia detectados en *S. Derby*, *bla*_{TEM-1}, *aadA2*, *sul1*, *tet(A)* y *tet(B)*, se encuentran ampliamente representados en los otros serotipos de la misma procedencia. Estos genes confieren resistencia a antimicrobianos ampliamente utilizados en medicina y veterinaria y, la mayoría, también como promotores de crecimiento animal y para el control de infecciones bacterianas en plantas de interés agrícola. La localización de estos genes en EGM, como se demostró en el caso de *S. Derby*, ha contribuido probablemente a su eficaz dispersión.

Destacar, finalmente, que de los 8 perfiles de *S. Derby*, R7 y R8 incluyen resistencia a 4 o más agentes antimicrobianos no relacionados. Por ello, los aislamientos con dichos perfiles se consideran multirresistentes. Aislamientos multirresistentes se detectaron también en los serotipos *S. 4,12:i:-*, *S. Rissen* y *S. Wien*, pero los perfiles presentados (Mf-R3, Rs-R1 y Rs-R2, y W-R1; Tabla 9) no coinciden en ningún caso con los de *S. Derby*.

CONCLUSIONES

1. El análisis de los aislamientos por macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante reveló 9 perfiles XbaI y 7 perfiles BlnI, siendo los índices de discriminación de 0,88 y 0,84, respectivamente.
2. El análisis de la susceptibilidad/resistencia a 9 antimicrobianos, junto con los genes de resistencia identificados mediante PCR revelaron 9 perfiles, donde un único aislamiento fue sensible a todos los antimicrobianos analizados y dos fueron considerados como multirresistentes.
3. El análisis de EGM asociados con genes de resistencia identificados mostró la presencia de integrones de clase 1 (*aadA2*, *sulI*) en 3 aislamientos y de los transposones Tn1721 [*tet(A)*], Tn10 [*tet(B)*] y Tn3 (*bla_{TEM-1}*) en 3, 2 y 2 aislamientos, respectivamente.
4. El análisis plasmídico mostró 10 perfiles, de los cuales 7 incluían plásmidos de gran tamaño, 130 Kb o 90 Kb. Apareciendo en 4 aislamientos el de 90 Kb acompañado de uno o más plásmidos de menor tamaño.
5. En conjunto las técnicas de tipificación permitieron diferenciar todos los aislamientos de *S. Derby* excepto un grupo de 4 recuperados de picadillo en el año 2011, que compartieron todas las características analizadas y se asignaron a una misma cepa. Los 10 aislamientos restantes correspondieron a cepas diferentes, lo que reveló la diversidad de *S. Derby* circulante en el Principado de Asturias.
6. De acuerdo con la amplia utilización de ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina en medicina, veterinaria, agricultura y/o como promotores del crecimiento animal, los genes de resistencia *bla_{TEM-1}*, *aadA2*, *sulI*, *tet(A)* y *tet(B)* se encontraron ampliamente representados en diferentes serotipos recuperados, al igual que *S. Derby*, de canales de porcino y derivados cárnicos en el Principado de Asturias.

ABREVIATURAS

A	Ampicilina.
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
AL	Almejas.
B	Bredeney.
C	Cloranfenicol.
CC	Chorizo Criollo.
CCU	Chorizo Curado.
CDC	Centre for Disease Prevention and Control (Centro para la prevención y control).
CG	Casetes Génicas.
CI	Integrones cromosómicos.
CNE	Centro Nacional de Epidemiología.
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute.
CR	DNA Cromosómico.
CT	Chorizo de Ternera.
D	Desconocido.
DC	Derivado Cárnico.
dNTPs	Desoxinucleótidos.
E	Enteritidis.
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeo para la prevención y control de enfermedades).
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).
EGM	Elementos Genéticos Móviles.
EMB	Eosin Methylene Blue Agar.
G	Gentamicina.
GC	Guanina-Citosina.
Go	Goldcoast.
H	Hadar.
HA	Hamburguesa.
HU	Huevo.

I	Infantis.
ID	Índice de Discriminación.
IRs	Repeticiones Terminales Invertidas.
Is	Elementos de Inserción.
ISC III	Instituto de Salud Carlos III.
K	Kanamicina.
LB	Caldo Luria-Bertani.
Le	Lekke.
LEN	Lenguado relleno de Marisco.
Li	Litchfield.
LNRSSSE	Laboratorio Nacional de referencia de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> (Spanish National Reference Laboratory for <i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i>).
Lo	London.
LSP	Laboratorio de Salud Pública.
LSPPA	Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias.
M	Muenchen..
Mf1	Serotipo monofásico 4,12:d:-.
Mf2	Serotipo monofásico 4,5,12:i:-.
Mf3	Serotipo monofásico 4,12:i:-.
MH	Müller-Hinton.
MIs	Integrones Móviles o de Multirresistencia.
N	Ácido Nalidixico.
NA	Navajas.
Ne	Newport.
NI	No Identificado.
O	Ohio.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORFs	Pautas de lectura abiertas.
P	Picadillo.
Pa	Paratyphi B.

PABA	Acido Paraaminobenzoico.
PAJ	Pollo al Ajillo.
PC	Producto Cárnico Fresco.
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Gel de Electroforesis de Campo Pulsado).
R	Resistencia.
Rs	Rissen.
S	Estreptomicina.
SA	Salsa Alioli.
SCB	Superficie Canal Bovino.
SCP	Superficie Canal Porcino.
S_D	Coefficiente de Dice.
Su	Sulfonamidas.
T	Tetraciclina.
Tn	Transposón compuesto.
Tp	Trimetoprim.
UCG	Unidades de Captura Génica.
UE	Unión Europea.
V	Veneciana.
W	Wien.
IV	<i>S. enterica</i> subsp. IV (<i>houtenae</i>) serotipo 6,14:z4,z23:-.

BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).** 2013. Informe anual sobre zoonosis y brotes de enfermedades de transmisión alimentaria en la Unión Europea en 2011.
- Alekshum, M.N., Levy, S.B.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128, 1037-1050.
- Bances, M.** 2011. Tesis Doctoral Universidad de Oviedo. Brotes de Salmonelosis en el Principado de Asturias (2002-2009): Caracterización y adscripción a grupos genómicos de cepas implicadas.
- Baquero, F., Álvarez-Ortega, C., Martínez, J.L.** 2009. Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ Microbiol Rep* 1, 469-476.
- Baquero, F., Garau, J.** 2010. Prudent use of antimicrobial agents; revisiting concepts and estimating perspectives in a global world. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28, 487-488
- Bennett, P.M.** 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153, 347-357.
- Brenner, G., Cardoso, M., Rabsch, W., Schwarz, S.** 2006. Phenotypic and genotypic differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates. G.B. Michael et al. / *Veterinary Microbiology* 118 (2006) 312–318.
- Buckley, M.** 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem. 1-32. American Academy of Microbiology. Ed Washington DC, USA.
- Campos, J., Perez-Vázquez, M., Oteo, J.** 2010. Las estrategias internacionales y las campañas para promover el uso prudente de los antibióticos en los profesionales y los usuarios. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 28, 50-54.
- Cantón, R., Coque, T.M., Baquero, F.** 2003. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Curr Opin Infect Dis*.16:315-325.

- Carattoli, A.** 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 32:243-259.
- Carratoli, A.** 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2227-2238.
- Centro Nacional de Epidemiología (CNE).** 2012. Boletín Epidemiológico Semanal (BES), vol. 20, nº14, 124-139.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI).** 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. M100-S19 vol 29 N° 3.
- Collazos, J.A, García, C, Carvajal, A., Rubio, P.** 2013. Caracterización de la infección por varios serotipos de *Salmonella*. <http://albeitar.portalveterinaria.com>. (15/05/2013)
- Corral, J. L. y Perea, E. J.** 1992. *Salmonella*. En: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. E. J. Perea (ed.). Ed. Dogma, Barcelona. Págs.: 647-61.
- Crump, J.A., Mintz, E.D.** 2010. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin Infect Dis* 50(2):241-6.
- De Toro, M.** 2013. Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en *Salmonella enterica*. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica. Tesis Doctoral con Mención Internacional. Universidad de la Rioja.
- Errecalde, J.O.** 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO Producción y Sanidad Animal. pp. 5-36. Editado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y alimentación. Roma, Italia.
- European Food Safety Authority (EFSA).** 2008. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007/1 Part A:

Salmonella prevalence estimates *The EFSA Journal* (2008) 135, 1-111

- European Food Safety Authority (EFSA)** 2013. The European Union Summary Report on Trends and sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011.
- Filutowicz, M., Burgess, R., Gamelli, R. L., Heinemann, J. A., Kurenbach, B., Rakowski, S. A. y Shankar, R.** 2008. Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid* 60: 38-44.
- Fluit, A.C., Schmitz, FJ.** 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.* 10:272-288.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G.** 2004. Taxonomic outline of Prokariotes *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^a Edition. Release 5.0., Springer-Verlag, New York. 79-122.
- Guerra B, Laconcha, I., Soto S.M., González Hevia, M.A., Mendoza, M.C.** 2000. Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol Lett* 190:341-347.
- Instituto de Salud Carlos III (ISC III).** 2009. Infecciones por *Salmonella* no tifoidea de origen humano en España. Sistema de información Microbiológica. Años 2000-2008. Boletín epidemiológico semanal 17, 193-204.
- Instituto de Salud Carlos III (ISC III).** 2010. Resultados de la Vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2010.
- Kado, C.I., Liu, S.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* 145:1365-1373.
- Livermore, D. M.** 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.* 36: S11-23.

- Martínez, N., Mendoza, M.C., Guerra, B., González-Hevia, M.A., Rodicio, M.R.** 2005. Genetic basis of antimicrobial drug resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica*, serotype Hadar from a Spanish region. *Microb Drug Resist*. 11:185-193.
- Martínez-Martínez, L., Ruiz de Alegría, C.** 2009. *Escherichia coli* resistente a gentamicina y sensible a amikacina. *Atlas del Antibiograma*. 141-143. Biomérieux University.
- Mendoza, M.C., Herrero, A., Rodicio, R.** 2009. Ingeniería evolutiva en *Salmonella*: la emergencia de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia a antimicrobianos en serotipos no tifoideos *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27(1):37-43.
- Microbiología Estomatológica.** 2009. Fundamentos y guía práctica. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Mossel, D.A., Moreno, B., Struijk, C. B.** 2002. *Microbiología de los alimentos*. 2ª edición. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Nugent, R., Back, E., Beith, A.** 2010. The race against drug resistance. A report of the Center for Global Development's Drug Resistance Working Group.
- Parry, C.M., Threlfall, E.J.** 2008. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis* 21(5):531-8.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R.** 2009. Gene cassettes and arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 33, 757-784.
- Partridge, S.R.** 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 35, 820-855.
- Prescott, L.M, Harley, J.P., Klein, D.A.** 2004. *Microbiología* 5ª ed. McGraw-Hill. Interamericana.
- Puerta, C., Urueña, C.** 2005. *Prácticas de Biología molecular*. Ed. Pontificia

Universidad Javeriana.

- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Tukel, C., Akcelik, M., Bäumlner, A.J.** 2006. Capsule mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* 74, 19-27.
- Recchia, G. D. y Hall, R. M.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 141: 3015-3027.
- Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guédon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J.I., Smith, C.J., Summers, A.O., Tsuda, M., Berg, D.E.** 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* 60, 167-173.
- Rodriguez, I.** 2009. Elementos genéticos móviles y resistencia a antimicrobianos en serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica*. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D.** 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Our Opin Microbiol* 4, 565-569.
- Silverman, M., Zieg, J., Hilmen, M., Simon, M.** 1979. Phase variation in *Salmonella*: genetic analysis of a recombinational switch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(1):391-395.
- Stalder, T., Barrau, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.C.** 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 3, article 119.
- Stark, K., Alpers, K.** 2004. Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003. *Epid. Bull.* 31, 251–260.
- Stokes, H.W., Hall, R.M.** 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3, 1669-1683.

- Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., Euzéby, J.P.** 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55:521-524.
- Todar, K.** 2008. Bacterial pathogens and diseases of humans. *Salmonella* and Salmonellosis. <http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html>.
- Torres, C., Moreno, M.A., Zarazaga, M.** 2010. Prudent use of antimicrobial agents: not just for humans. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28; 669-671.
- Valdezate, S., Vidal, A., Herrera-León, S., Pozo, J., Rubio, P., Usera, M.A. y Echeita, A.** 2004. Detección de un clon mayoritario de *Salmonella derby* en productos alimentarios humanos de origen porcino. XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(Supl 1):1-230
- Wagner, A.** 2006. Cooperation in fleeing in the world of transposable elements. *PLoS Comput Biol* 2, 162.
- Yim, G., Huimi Wang, H., Davies, J.** 2007. Antibiotics as signaling molecules. *Philosophical transactions of the Royal Society of Biological Sciences* 362, 1195-1200
- http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/punto_focal_efsa/detalle/informe_anual_zoonosis.shtml (15/05/2013)
- http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/detalle/salmonella.shtml (28/04/2013)
- <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf> (23/05/2013)
- http://www3.unileon.es/personal/wwdiafga/web_mex12/presentaciones_teoría/lección_4.pdf (15/05/2013)