UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

Caracterización de los aislamientos de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis causantes de salmonelosis en Asturias

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

MARINA LÓPEZ ÁLVAREZ

JUNIO, 2014

Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. http://www.unioviedo.es/MBTA

PROFESOR TUTOR:

Dra. Mª DEL ROSARIO RODICIO RODICIO, Catedrática de Microbiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que Dña. **MARINA LÓPEZ ÁLVAREZ** 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, 8ª promoción curso 2013-2014.

Oviedo, 6 de Junio de 2014

Fdo. Mª DEL ROSARIO RODICIO RODICIO

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos

En primer lugar agradecerle a mi directora de proyecto la Catedrática Mª del Rosario Rodicio Rodicio, por sus enseñanzas, paciencia y por el apoyo recibido.

A mis compañeros de laboratorio y del área de microbiología Javi, Nacho, Carla y Rocío. En especial a Raquel y Vane quienes se han convertido en mucho más que compañeras de laboratorio, gracias por estar ahí siempre, por enseñarme, ayudarme y sobre todo por las risas y los momentos del café. A Carla y Susana, por ayudarme y dejarme invadir su laboratorio siempre que lo necesité, y a Mario por estar ahí en los momentos de estrés para darme un abrazo. Agradecerle también a la Dra. García porque, a pesar de no haber coincidido en el laboratorio, su tesis se ha convertido en el primer lugar al que acudir para resolver dudas y entender determinados procedimientos.

A mis amigos Iván y David por estar siempre que los he necesitado y porque sé que lo seguirán estando sin importar los kilómetros de por medio. A Lucia por los momentos y las risas en clase, por apoyarme y animarme en todo momento.

A Javi por enseñarme que todo es posible con esfuerzo y perseverancia, gracias por hacerme ver que mis montañas son solo pequeños granitos de arena que con calma tienen solución y sobre todo gracias por confiar siempre en mí.

A mi familia por creer en mí.

Índice

RESUMEN I

LISTA DE FIGURAS IV

LISTA DE TABLAS VII

INTRODUCCIÓN 1

Brotes causados por *Salmonella enterica* 4

Objetivos 6

CONSIDERACIONES TEÓRICAS 7

Clasificación y nomenclatura: Estructura antigénica 9

Salmonella en la naturaleza 12

Patogenicidad, cuadros clínicos y tratamiento 13

Resistencia a antimicrobianos en *Salmonella* 15

Factores de virulencia 21

Tipificación 21

MATERIAL Y MÉTODOS 23

Cultivo y conservación de los aislamientos analizados 24

Análisis fenotípico de la resistencia a agentes antimicrobianos 28

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 30

Secuenciación 34

Análisis plasmídico. Extracción de DNA plasmídico 35

Electroforesis en campo pulsado (PFGE) 36

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39

Aislamiento de *Salmonella enterica* 40

Análisis fenotípico de la resistencia a antimicrobianos 40

Detección de genes de resistencia a antimicrobianos 44

Detección de elementos genéticos móviles (EGMs) 45

Detección de plásmidos 47

Tipificación mediante macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante 52

CONCLUSIONES 56

ABREVIATURAS 58

BIBLIOGRAFÍA 61

RESUMEN

RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue el estudio microbiológico de brotes causados por *Salmonella enterica* en el Principado de Asturias durante el periodo 2010-2013. En el estudio se incluyeron un total de 39 aislamientos (32 clínicos y 7 de alimentos) asociados a 7 brotes de *S. enterica* subespecie *enterica*, de los serotipos Enteritidis (3), Paratyphi B variedad Java (2), variante monofásica de Typhimurium (1), Infantis (1); y a un brote de *S. enterica* subsp. *salamae*.

Se determinaron los patrones de resistencia fenotípico/genotípico de todos los aislamientos frente a un total de 8 antimicrobianos. Todos los aislamientos fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados, a excepción de los de Enteritidis causantes de dos brotes, que presentaron resistencia a ácido nalidíxico debida a una mutación en el gen *gyrA*, y los de la variante monofásica de Typhimurium que fueron resistentes a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina gracias a los genes $bla_{\text{TEM-1}}$, *strA-strB*, *sul2*, *sul3* y *tet*(B). El gen *tet*(B) de resistencia a tetraciclina se localiza probablemente en un transposón Tn*10* defectivo.

Se investigó la presencia de plásmidos en los aislamientos de los distintos brotes encontrándose el plásmido de virulencia pSEV (60 kb) en todos los del serotipo Enteritidis, acompañado en los de un brote por un plásmido de pequeño tamaño.

La tipificación de los aislamientos mediante macrorrestricción-electroforesis de campo pulsante utilizando XbaI, demostró que los aislamientos implicados en un mismo brote presentaban perfiles idénticos y que los dos brotes de Paratyphi B variedad Java y los tres brotes de Enteritidis fueron originados por cepas diferentes.

ABSTRACT

The objective of this project was the microbiological study of outbreaks caused by *Salmonella enterica* in the Principality of Asturias during the period 2010-2013. A total of 39 isolates (32 and 7 from clinical and food samples, respectively) associated with 7 outbreaks caused by serotypes Enteritidis (3), Paratyphi B variety Java (2), monophasic variant of Typhimurium (1) and Infantis (1) of *S. enterica* subspecies *enterica*; and one outbreak of *S. enterica* subsp. *salamae* were included in this study.

Phenotypic/genotypic resistance patterns were determined using a total of 8 antimicrobial agents. All isolates were susceptible to all antimicrobials tested, with the exception of Enteritidis isolates involved in two of the three outbreaks that were resistant to nalidixic acid due to a mutation in the *gyrA* gene, and isolates of the monophasic variant of Typhimurium that were resistant to ampicillin, streptomycin, sulphonamides and tetracycline caused by the $bla_{TEM\text{-}1}$, *strA-strB*, *sul2*, *sul3* and *tet*(B) genes. The tetracycline resistant gene *tet*(B) is probably located in a defective Tn*10* transposon.

The presence of plasmids was investigated in isolates from the different outbreaks. All Enteritidis isolates carried the virulence plasmid pSEV (60 kb), accompanied by a small plasmid in the case of one outbreak.

The molecular typing of the isolates by macrorestriction pulsed-field electrophoresis using XbaI showed that the isolates involved in the same outbreak had identical profiles and that the two Paratyphi B var Java outbreaks and the three Enteritidis outbreaks were caused by different strains.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tendencia de los microorganismos más relevantes causantes de infecciones gastrointestinales en España (1989-2012). **2**

Figura 2: Evolución de los casos confirmados de salmonelosis humana en la UE, 2008-2012. **3**

Figura 3: Distribución de los diez serotipos de *Salmonella* más comunes encontrados en humanos en la UE en 2012. **3**

Figura 4: Serotipos implicados en los 93 brotes de salmonelosis detectados en el Principado de Asturias durante el periodo 2002-2009. **4**

Figura 5: Divisiones taxonómicas de la actual clasificación del género *Salmonella*. **8**

Figura 6: Género *Salmonella*. **A.** Célula de *Salmonella* al microscopio electrónico, morfología bacilar y flagelación perítrica. **B.** Crecimiento en el medio selectivo y diferencial. **9**

Figura 7: Pared celular de una bacteria Gram negativa y detalle de la estructura del lipopolisacárido. **10**

Figura 8: Variación de fase de los flagelos en *Salmonella*. **11**

Figura 9: Rutas de transmisión de los serotipos no tifoideos de *Salmonella.* **13**

Figura 10: Estructura de un integrón genérico. **17**

Figura 11: Estructura de un integrón de clase 1 típico. **18**

Figura 12: Representación de transposón compuesto Tn*10*. **19**

Figura 13: Representación esquemática del transposón complejo Tn*10*. **19**

Figura 14: Representación esquemática de un plásmido conjugativo (NR1) que contiene el transposón compuesto Tn*10* y una isla de resistencia formada por dos transposones, Tn*9* y Tn*21*, portador este último de un integrón de clase 1 típico. **20**

Figura 15: Representación esquemática de genes y factores de virulencia de *S. enterica.* **21**

Figura 16: Esquema de siembra por agotamiento. **28**

Figura 17: Representación esquemática de la disposición de discos con antibiótico sobre agar MH previamente inoculado. **29**

Figura 18: Representación esquemática de las etapas de una PCR. **33**

Figura 19: Representación esquemática de las etapas de la purificación del DNA. **34**

Figura 20: Ejemplo de un cromatograma correspondiente a un fragmento del gen *gyrA* de un aislamiento de *S.* Enteritidis resistente a ácido nalidíxico. **35**

Figura 21: Crecimiento característico de *S. enterica* en medio EMB. **40**

Figura 22: Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Enteritis implicados en los brotes BE-1/10 y BE-2/10. **48**

Figura 23: Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Enteritidis responsables de los brotes BE-2/10 y BE-3/11. **49**

Figura 24: Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Paratyphi B variedad Java (BPJ-1/10 y BPJ-2/12) y *S. enterica* subespecie *salamae* (BS-1/10). **50**

Figura 25: Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipos Infantis (BI-1/12) y de la variante monofásica de Typhimurium (BTm-1/13). **51**

Figura 26: Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de *S. enterica* causantes de los brotes BJP-1/10, BPJ-2/12 y BI-1/12. **52**

Figura 27: Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de Enteritidis causante del brote BE-2/10. **53**

Figura 28: Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de *S. enterica*. **54**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Brotes causados por *S. enterica* en el Principado de Asturias durante el período 2010-2013 **5**

Tabla 2: Formula antigénica de los serotipos de *S. enterica* implicados en los brotes analizados en este proyecto. **12**

Tabla 3: Cepas objeto de estudio. **25**

Tabla 4: Antimicrobianos y categorías de sensibilidad-resistencia. **29**

Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la detección de genes de resistencia, de elementos genéticos móviles y de virulencia. **30**

Tabla 6: Condiciones de amplificación. **32**

Tabla 7: Antimicrobianos utilizados, grupo y mecanismo de acción. **41**

Tabla 8: Susceptibilidad/Resistencia a antimicrobianos de aislamientos de *S. enterica* causantes de brotes en el Principado de Asturias. **42**

Tabla 9: Resultados. **46**

Introducción

Los serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica* se encuentran entre los patógenos de transmisión alimentaria más importantes a nivel mundial, ocupando el segundo lugar, por detrás únicamente de *Campylobacter* (Figura 1) y provocando miles de casos de gastroenteritis cada año, tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo.

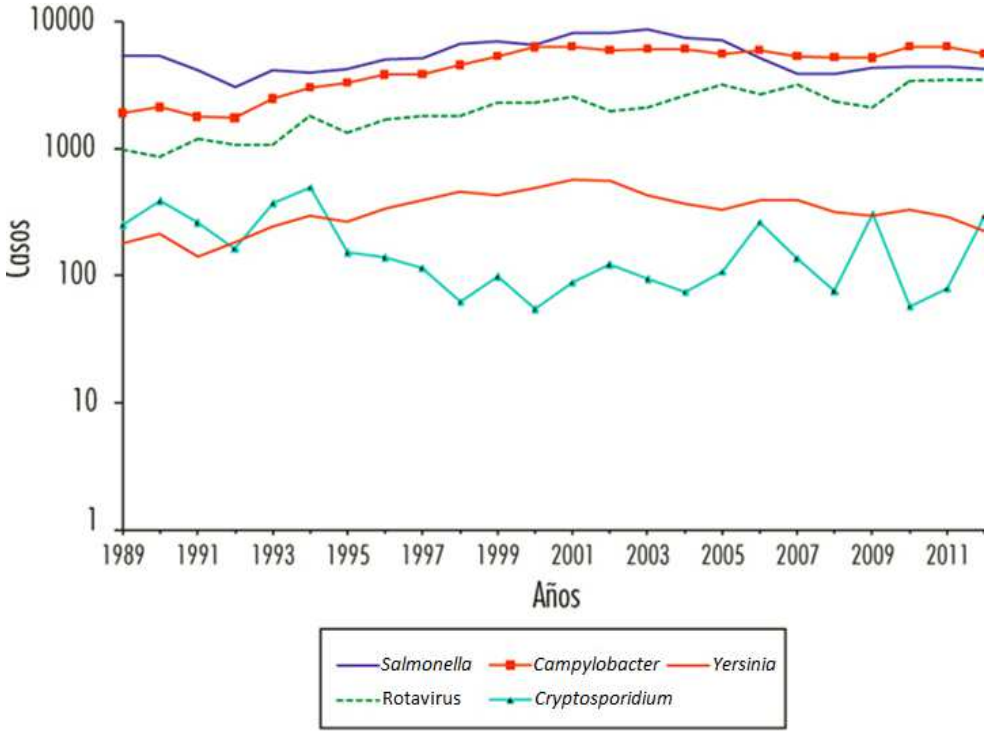

Figura 1. Tendencia de los microorganismos más relevantes causantes de infecciones gastrointestinales en España (1989-2012) (Red Nacional de Investigación Microbiológica).

Según datos aportados por la EFSA (European Food Safety Authority, 2008) en la Unión Europea (UE) se detectaron en el año 2011 un total de 97.897 casos de salmonelosis humana, lo que implica 20,7 casos por cada 100.000 habitantes. Esto representa una disminución del 5,4% respecto al año 2010, en el que se confirmaron 99.020 casos (Figura 2; EFSA, 2013), manteniéndose una tendencia decreciente iniciada en el año 2007. Dicho descenso es debido fundamentalmente a las estrictas políticas de control que han sido llevadas a cabo en la UE durante los últimos años. Cabe destacar el Reglamento (CE) 2160/2003 del Parlamento y del Consejo Europeos, sobre control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos, el cual exige la adopción de medidas apropiadas y eficaces para la detección y control de la presencia de *Salmonella* en todas las etapas de la producción, persiguiendo con ello la reducción de la prevalencia y del riesgo que esta bacteria supone para la salud pública.

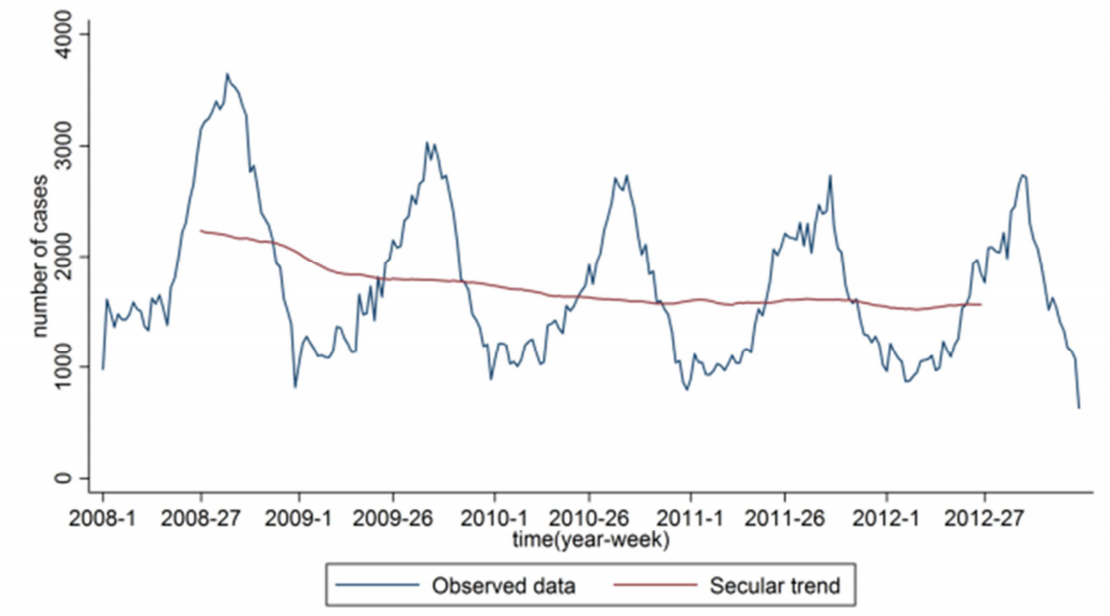

Figura 2. Evolución de los casos confirmados de salmonelosis humana en la UE, 2008-2012. (EFSA, 2013).

Los serotipos más frecuentes encontrados en humanos en la UE, al igual que en años anteriores, fueron Enteritidis y Typhimurium, representando un 41,3% y 22,1% respectivamente (Figura 3).

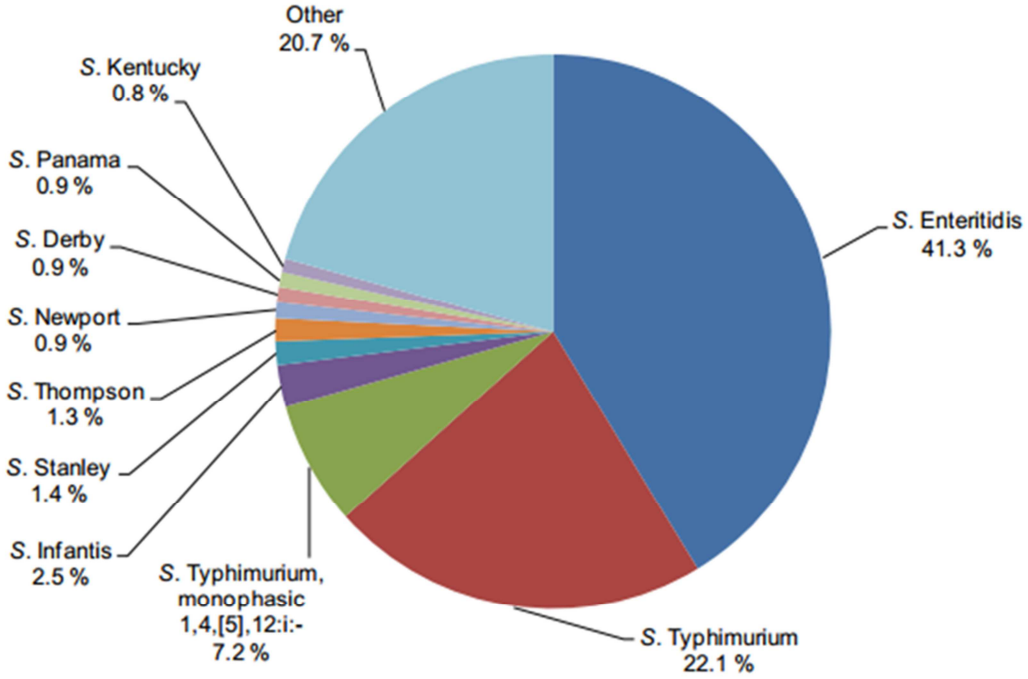

Figura 3. Distribución de los diez serotipos de *Salmonella* más comunes encontrados en humanos en la UE en 2012 (EFSA, 2013).

BROTES CAUSADOS POR *SALMONELLA ENTERICA*

Al igual que se observa con los casos esporádicos, el número de brotes por *S. enterica* ha ido también decreciendo, entendiendo por brote de transmisión alimentaria al incidente en el cual dos o más personas presentan una misma enfermedad después de la ingestión del mismo tipo de alimento y donde la evidencia epidemiológica implica al alimento como fuente de la enfermedad.

A pesar de la tendencia decreciente, los serotipos no tifoideos de *S. enterica* han sido en 2011 la causa más frecuente de brotes de origen alimentario (AESAN, 2013), notificándose en España 3.833 brotes (CNE, 2012).

En el Principado de Asturias se mantiene la tendencia decreciente así como la distribución en serotipos encontradas en España y otros países de la UE, detectándose 93 brotes en el periodo 2002-2009, que fueron causados por los serotipos Enteritidis (78), Typhimurium (11), Panama (2), Hadar (1) e Infantis (1) (Figura 4). Estos brotes han sido estudiados en el contexto de la tesis doctoral de M. Bances González (junio 2011), realizada en el Área de Microbiología de la Universidad de Oviedo. En dicho trabajo se analizaron 515 aislamientos asociados a los brotes: 401 de origen clínico y 114 de alimentos (M. Bances, Tesis Doctoral).

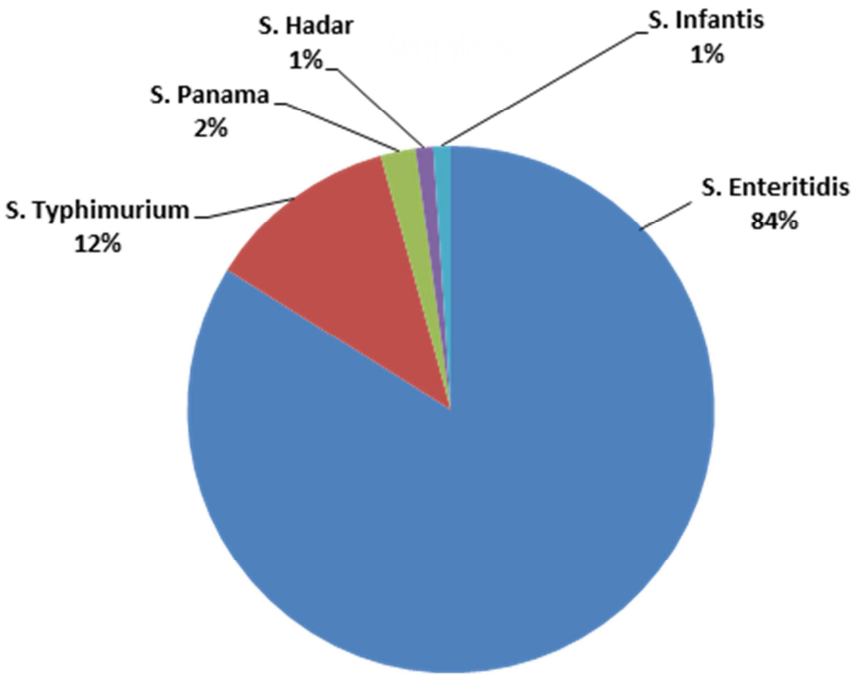

Figura 4. Serotipos implicados en los 93 brotes de salmonelosis detectados en el Principado de Asturias durante el período 2002-2009 (basado en M. Bances, Tesis Doctoral).

En el periodo 2010-2013 se detectaron 13 brotes causados por los serotipos Enteritidis (4), Typhimurium (2), variante monofásica 4,[5],12:i:- de Typhimurium (1), Paratyphi B variedad Java (2), Rissen (1), Intantis (1) y Poona (1) de *S. enterica* subespecie *enterica* de; y 1 brote asociado a *S. enterica* subespecie *salamae* (Tabla 1). Estos brotes se designan con la letra "B" seguida de la inicial(es) del serotipo o subespecie implicado, separado por "/" de los dos últimos dígitos del año en que ocurrió el brote.

Tabla 1. Brotes causados por *S. enterica* en el Principado de Asturias durante el período 2010-2013

Brote Año	Serotipo	Tipo de brote	Personas afectadas	Aislamientos Origen (N)
Salmonella enterica* subespecie *enterica				
2010				
BE-1/10	Enteritidis	Comunitario	4	Heces (4)
BE-2/10	Enteritidis	Comunitario	11	Heces (11) Alimentos (2)
BT-1/10	Typhimurium	Familiar	2	Heces (2)
BPJ-1/10	Paratyphi B var. Java	Familiar	2	Heces (2)
2011				
BE-3/11	Enteritidis	Familiar	2	Heces (2)
BP-1/11	Poona	Comunitario	19	Heces (31)
BR-1/11	Rissen	Comunitario	11	Heces (8) Orina (2) Sangre (1)
2012				
BT-1/12	Typhimurium	Familiar	2	Heces (2)
BI-1/12	Infantis	Comunitario	5	Heces (5) Alimentos (1)
BPJ-2/12	Paratyphi B var. Java	Familiar	2	Heces (2)
2013				
BTm-1/13	Typhimurium 4,[5],12:i:-	Familiar	4	Heces (4) Alimentos (4)

BE-4/13	Enteritidis	Comunitario	5	Heces (4) Sangre (1)
Salmonella enterica* subespecie *salamae				
2010				
BS1/10	-	Desconocido	4	Heces (4)

N, número de aislamientos; **B**, Brote; **E**, *S.* Enteritidis; **PJ**, *S.* Paratyphi variante Java; P, *S.* Poona; **R,** *S.* Rissen; **T**, Typhimurium; **Tm,** variante monofásica de *S.* Typhimurium; **S,** *S. enterica* subespecie *salamae*.

OBJETIVOS

Como continuación al trabajo iniciado por la Dra. M. Bances, en el presente proyecto se abordó el estudio microbiológico de los brotes causados por los serotipos Enteritidis, Typhimurium, Paratyphi B variedad Java e Infantis y por S. *enterica* subespecie *salamae*, durante el periodo 2010-2013. Cabe indicar que los brotes originados por Typhimurium en los años 2010 y 2012 y por Poona y Rissen en el año 2011 han sido estudiados independientemente. Los objetivos del proyecto fueron los siguientes:

1. Estudiar la resistencia a antimicrobianos e identificar los genes responsables.
2. Rastrear y caracterizar elementos genéticos móviles que pudieran contribuir a la resistencia.
3. Tipificar los aislamientos de *S. enterica* mediante macrorrestricción genómica seguida de electroforesis de campo pulsante (PFGE).

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

El género *Salmonella* pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales*, Clase *γ-Proteobacteria*, dentro del Dominio *Bacteria* (Garrity *et al.*, 2004). El género contiene dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. La primera incluye las subespecies *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Figura 5; Tindall *et al*., 2005). La subespecie I (*enterica*) se aísla de seres humanos y de animales de sangre caliente, perteneciendo a ella la mayoría de los aislamientos patógenos de humanos. Las demás subespecies de *S. enterica*, así como *S. bongori*, se encuentran principalmente en animales de sangre fría y en el ambiente. Además, de acuerdo con sus características antigénicas, las bacterias del género *Salmonella* se clasifican en serogrupos y serotipos, considerados estos últimos como especies hasta finales del siglo XX.

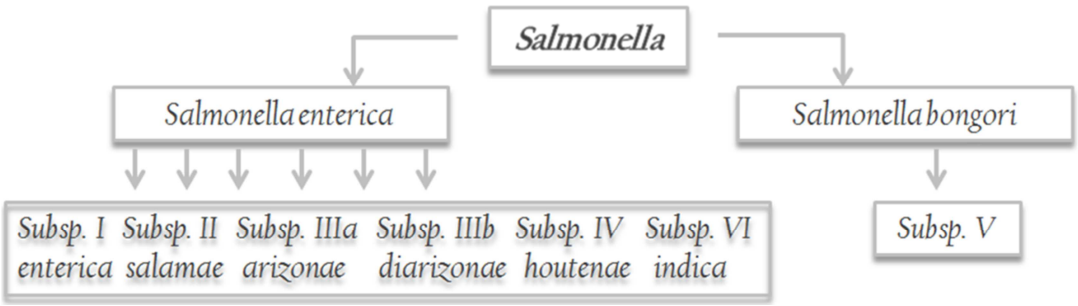

Figura 5. Divisiones taxonómicas de la actual clasificación del género *Salmonella*.

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, no productores de endosporas y normalmente móviles por flagelación perítrica (Figura 6A). Su contenido en guanina-citosina (GC) es de 50-53%. Son aero-anaerobios facultativos y la mayoría producen gas por fermentación de carbohidratos, especialmente glucosa. (Corral y Perea, 1992). Sintetizan el enzima catalasa, dan negativa la prueba de la citocromo oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y producen sulfuro de hidrogeno. Toleran elevadas concentraciones de sales biliares y pueden crecer en presencia de colorantes como el azul de metileno, la eosina, la fucsina ácida, el cristal de violeta o el verde brillante. Estas características permiten diseñar medios de cultivo selectivos para bacterias del género *Salmonella*, como son el agar Hektoen, el agar verde brillante o el agar eosina-azul de metileno. Además, las colonias de *Salmonella* en estos medios se pueden diferenciar de las originadas por otras enterobacterias, en base a su incapacidad de fermentar lactosa y/o a la producción de H_2S (Figura 6B).

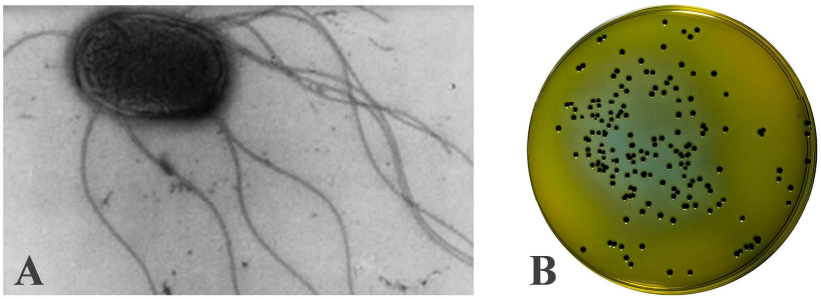

Figura 6. Género *Salmonella*. **A**. Célula de *Salmonella* al microscopio electrónico, morfología bacilar y flagelación perítrica. **B**. Crecimiento en el medio selectivo y diferencial: agar Hektoen. El color negro de las colonias se debe a la producción de H_2S.

La temperatura óptima de crecimiento de los miembros del genero *Salmonella* es de 35-37ºC, aunque pueden multiplicarse en un amplio rango de temperaturas, desde 5 a 45-47ºC. Toleran un pH entre 4,5-9 creciendo mejor a valores próximos a la neutralidad: 6,5-7,5. Presentan un buen desarrollo a una actividad de agua (a_w) de 0,945 a 0,999. No obstante, sobreviven largo tiempo en condiciones más extremas como las encontradas en productos deshidratados, y en alimentos pueden multiplicarse hasta valores de a_w iguales a 0,93 (Gledel, 1995; Mossel *et al*., 2002).

CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA: ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

De acuerdo con el esquema de Kauffmann-White-Le Minor, los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* se caracterizan inmunológicamente en base a tres antígenos de superficie: somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). De esta manera, se han identificado más de 30 serogrupos y más de 2500 serotipos (Popoff *et al*., 2004). La clasificación en serotipos tiene un gran interés desde el punto de vista clínico, donde se distinguen además los serotipos tifoideos (Typhi y Paratyphi), de los no tifoideos (el resto). El serotipo Typhimurium incluye la cepa tipo del género (LT2), cuyo genoma ha sido secuenciado (McClelland *et al*., 2001). Aunque la designación correcta de este serotipo seria *S. enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (Brenner *et al*., 2000), para abreviar se utilizarán los términos serotipo Typhimurium, o simplemente *S.* Typhimurium, a lo largo del presente trabajo. De la misma manera se procederá en el caso de otros serotipos.

Los antígenos somáticos (O), caracterizados por ser termoestables y alcohol-resistentes, forman parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas, correspondiendo concretamente a la cadena

lateral O del mismo (Figura 7). Se trata de una cadena heteropolisacarídica, más o menos larga, de composición altamente variable, de ahí que el antígeno O proporcione especificidad (Corral y Perea, 1992; Herrera-León, 2004).

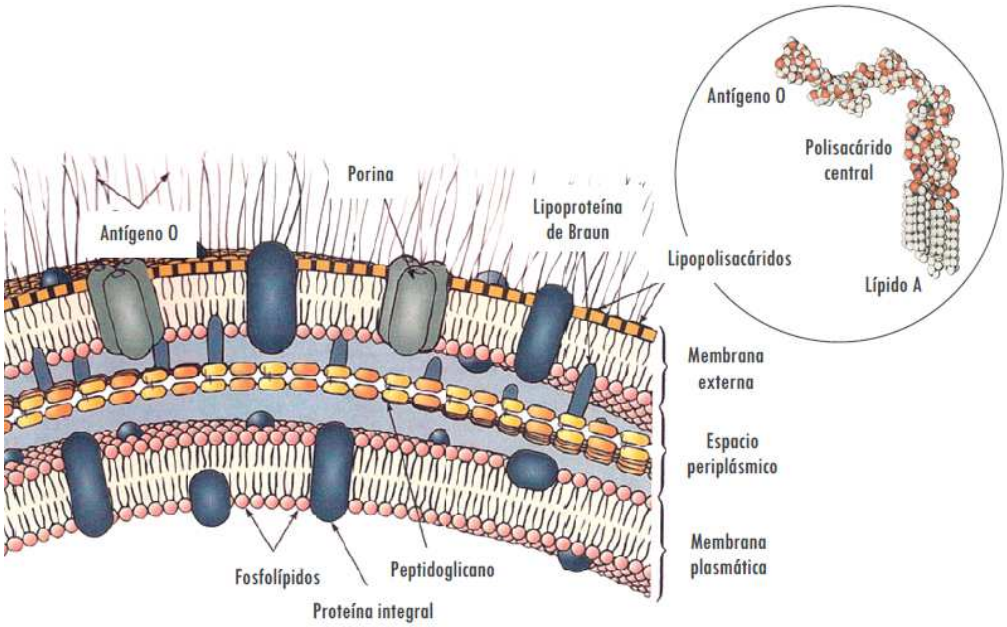

Figura 7. Pared celular de una bacteria Gram negativa y detalle de la estructura del lipopolisacárido.

Los antígenos flagelares (H) son de naturaleza proteica y termolábiles. Se corresponden con la flagelina, componente estructural de los flagelos bacterianos. Mientras que los extremos C y N terminales de esta proteína se encuentran altamente conservados, la región central presenta una gran variabilidad, lo que permite establecer los distintos antígenos flagelares. Algunos serotipos de *Salmonella*, denominados monofásicos, solo producen un tipo de antígeno H (por ejemplo, *S.* Typhi). Sin embargo, la mayoría son bifásicos, ya que el antígeno flagelar puede aparecer de forma alternativa en fase 1 (flagelina H1), llamada también específica y que es característica de cada serotipo, o en fase 2 (flagelina H2), que es menos específica y puede ser común a varios. Una cepa de *Salmonella* sólo expresa un tipo de antígeno flagelar en un determinado momento.

El sistema de cambio de fase está regulado por una recombinasa codificada por el gen *hin* que cataliza una inversión reversible de un fragmento de 993 pb que contiene el promotor del operón *fljBA*. En un sentido el promotor dirige la transcripción de los genes *fljB* y *fljA*, que codifican la flagelina de segunda fase y provoca la represión del gen *fliC*, que codifica la flagelina de fase uno. En este caso el antígeno H que se expresa

es el de segunda fase. Sin embargo, cuando el fragmento se invierte, los genes *fljA* y *fljB* no se expresan y no se produce la represión de *fliC*. De este modo la bacteria expresa el antígeno de primera fase (Figura 8).

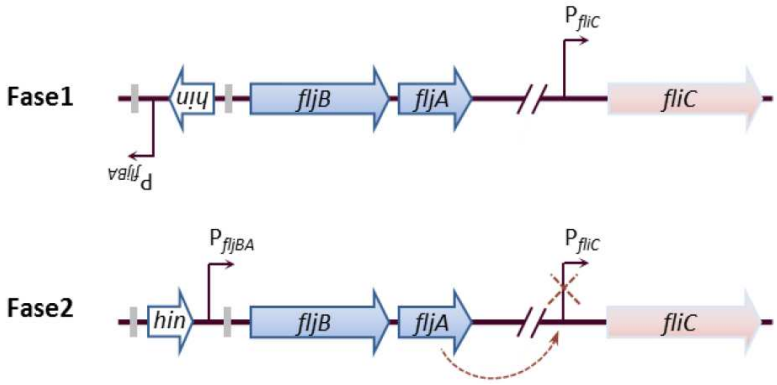

Figura 8. Variación de fase de los flagelos en *Salmonella* (Yamamoto y Kutskake, 2006)

La variación de fase proporciona una gran ventaja a las bacterias ya que las cepas que consigan cambiar de fase durante el proceso de infección podrán sobrevivir a la respuesta inmune del hospedador. Esto es debido a que el sistema inmune va a producir anticuerpos frente a la flagelina H1 de modo que aquellas bacterias que cambien de fase y produzcan flagelina H2 podrán escapar del mismo (Corral y Perea, 1992; Herrera-León *et al.*, 2004).

Los antígenos capsulares (K) están presentes en serotipos que poseen cápsula polisacarídica. Se destruyen por calentamiento a 60ºC durante una hora, y por ácidos y fenol diluidos. El único antígeno K descrito en el género *Salmonella* es el antígeno de virulencia (Vi), presente en tres serotipos muy invasivos: Typhi, Paratyphi C y Dublin (Raffatellu *et al.*, 2006).

Algunos serotipos de relevancia clínica se subdividen, a su vez, en fagotipos que se establecen en base a su susceptibilidad o resistencia frente a un panel de bacteriófagos.

Tabla 2. Formula antigénica de los serotipos de *S. enterica* implicados en los brotes analizados en este proyecto.

Serogrupo	Serotipo	Fórmula antigénica		
		Ags somáticos	Ags flagelares	
			Fase 1	Fase 2
B	Typhimurium	1,4,(5),12	i	-
C1	Infantis	6,7	r	1,5
D	Enteritidis	1,9,12	g,m	-
B	Paratyphi B (variante Java)	1,4,5,12	b	(1,2)

SALMONELLA EN LA NATURALEZA

El hábitat primario de *Salmonella* es el intestino de animales de sangre caliente y fría. La mayor parte de los serotipos pertenecen a los denominados serotipos no tifoideos. Algunos serotipos presentan un hospedador específico como es el caso de Gallinarum (gallinas) y Pullorum (pollos), aunque generalmente presentan un amplio rango de hospedador, pudiendo colonizar el intestino de distintas especies animales, incluyendo el hombre. En estos serotipos, la dosis infecciosa es aproximadamente de 10^6 bacterias, por lo que la transmisión persona-persona es prácticamente imposible. El microorganismo debe multiplicarse en el alimento hasta alcanzar su dosis infecciosa por lo que es mucho más frecuente en verano donde la temperatura es más favorable.

Existen, además, unos pocos serotipos que infectan de modo exclusivo a la especie humana. Estos pertenecen a los denominados serotipos tifoideos, en donde se encuentran Typhi y Paratyphi.

En cuanto a los serotipos mayoritarios, no tifoideos, su cadena de transmisión es relativamente compleja (Figura 9). 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.

A partir de los animales domésticos la bacteria puede llegar al hombre a través de distintas vías: 1) consumo de huevos de gallina o productos derivados de los mismos; 2) consumo de leche o derivados lácteos contaminados con materia fecal de las vacas; 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; 4) contaminación cruzada.

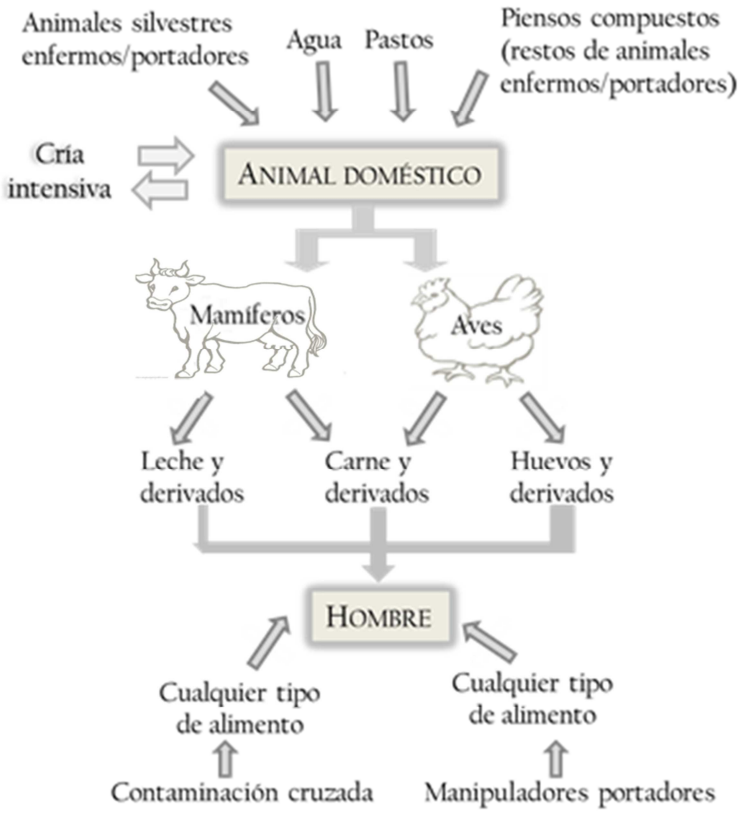

Figura 9. Rutas de transmisión de los serotipos no tifoideos de *Salmonella.*

PATOGENICIDAD, CUADROS CLÍNICOS Y TRATAMIENTO

La patogenicidad bacteriana es la capacidad de un parasito de causar daño a su hospedador, siendo compleja y multifactorial (Finlay y Falcow, 1989; Miller *et al*., 2000). Dependerá de aspectos relacionados con el agente patógeno, como la dosis infectiva, la vía de entrada y los factores de virulencia, y de aquellos relacionados con el hospedador y su sistema inmune.

Salmonella es un patógeno intracelular facultativo que, dependiendo del serotipo y del hospedador, puede causar una infección intestinal aguda conocida como

salmonelosis, infecciones focales extra-intestinales, bacteriemia y septicemia, todas ellas asociadas a serotipos no tifoideos, o fiebres entéricas debidas a los serotipos tifoideos.

Los serotipos no tifoideos son una de las causas más frecuentes de infecciones bacterianas transmitidas por alimentos que, en adultos sanos originan normalmente salmonelosis autolimitada. Sin embargo, como se indicó anteriormente, también pueden causar infecciones extraintestinales más o menos graves, predisponiendo a ello una serie de factores relacionados con el hospedador (enfermedades subyacentes o anomalías genéticas, fundamentalmente las que afectan al sistema inmune, así como edades extremas).

a. Enterocolitis aguda

Es la manifestación más común de la infección. En España se comunican cada año varios miles de casos de enterocolitis por *Salmonella*, causadas principalmente por los serotipos Enteritidis, Typhimuirum y Virchow. El periodo de incubación suele oscilar entre 6 y 48 horas. Tras este periodo comienza un cuadro clínico con fiebre, dolor de cabeza, mialgia, náuseas, vómitos y diarrea. La diarrea puede llegar a la deshidratación, sobre todo en niños y ancianos. Como se comentó anteriormente, la enfermedad es más grave en pacientes inmunodeprimidos, ancianos y niños, pudiendo causar en estos grupos de riesgo, importantes complicaciones.

En las formas benignas (las más frecuentes en la población normal) el único tratamiento requerido es la prevención de la deshidratación. Sin embargo, éste es necesario para combatir infecciones invasivas, debido a la alta mortalidad asociada, y para prevenirlas en personas con factores de riesgo reconocidos (Orden Gutiérrez y de la Fuente, 2001).

b. Infecciones focales extra-intestinales y septicemia.

Los serotipos no tifoideos pueden, aunque con menor frecuencia, dispersarse fuera del intestino por vía linfática y sanguínea. Esto puede provocar tanto infecciones focales extra-intestinales, como infecciones invasivas (bacteriemia y septicemia) potencialmente mortales. La septicemia está asociada a pacientes inmunocomprometidos o de edades extremas (ancianos y niños pequeños).

c. Fiebres entéricas

Las fiebres entéricas están producidas por los serotipos Typhi (responsable de la fiebre tifoidea) y Paratyphi A, B y C (causantes de las fiebres paratifoideas). Los serotipos tifoideos son endémicos en países en vías de desarrollo, mientras que las fiebres entéricas son esporádicas en los países desarrollados y afectan habitualmente a personas que han viajado a países con endemismo. Ambos serotipos se transmiten principalmente por aguas y en menor medida por alimentos contaminados con materia fecal. Se trata de infecciones invasivas graves, sobretodo en el caso de la fiebre tifoidea (Crump y Mintz, 2010, Meltzer y Schwartz, 2010).

RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN *SALMONELLA*

En las últimas décadas se ha producido un notable incremento en la incidencia de aislamientos de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos, que pueden ser naturales (antibióticos), sintéticos o semisintéticos. Los antibióticos son sustancias naturales producidas por los microorganismos como mecanismo de defensa frente a otros. Los antimicrobianos incluyen, además de los antibióticos, aquellos obtenidos por síntesis química o modificación química de los compuestos naturales. En países subdesarrollados, el aumento en la resistencia (R) se atribuye fundamentalmente a la utilización de dichos agentes en medicina humana. En los países desarrollados, sin embargo, la resistencia se debe principalmente a su utilización en animales destinados a la producción de alimentos, no sólo con fines terapéuticos y profilácticos, sino también como promotores del crecimiento. Esta última aplicación está actualmente prohibida en la Unión Europea. La resistencia es importante cuando el paciente necesita tratamiento y el problema se agrava en el caso de las bacterias con resistencia simultánea a múltiples drogas (MDR: Multiple Drug Resistance).

La resistencia bacteriana frente 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 por procesos de transferencia horizontal (Buckley, 2009; Martínez *et al*. 2009; Partridge, 2011). Los mecanismos de resistencia se pueden clasificar en dos grandes grupos: 1) Resistencia innata, esto es, por naturaleza; 2) Resistencia adquirida, mediante dos vías: la mutación y la transferencia horizontal de genes (Cantón *et al.*, 2003; Alekshun y Levy, 2007).

Las **mutaciones puntuales** pueden modificar genes o sus reguladores, alterando de este modo las dianas celulares de los agentes antimicrobianos y originando organismos resistentes. En la mayoría de los casos, la afecta sólo a una familia de antimicrobianos, aunque también puede llegar a conferir resistencia a múltiples fármacos o familias. Por otro lado, este fenotipo multirresistente puede conseguirse por acumulación de diferentes mutaciones, lo que se ve favorecido en cepas en las que los sistemas de reparación del DNA no funcionan correctamente (Cantón *et al.*, 2003; Livermore, 2003).

Un ejemplo de este tipo es la resistencia a quinolonas, como el ácido nalidíxico, que se produce por mutación en el gen *gyr*A que codifica la subunidad A del enzima DNA girasa, impidiendo la unión de la quinolona al enzima. Otro ejemplo es la resistencia a fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina, que se produce por mutaciones en los genes que codifican la DNA girasa y la topoisomerasa IV. Estas mutaciones se transmiten de una bacteria a sus descendientes: transferencia vertical.

Sin embargo, en la mayoría de los casos, la resistencia es consecuencia de la **adquisición de nueva información genética** por parte de la bacteria sensible, mediante transferencia horizontal. En la transferencia génica horizontal uno o más genes de resistencia pueden diseminarse entre bacterias que comparten un mismo nicho ecológico. En este proceso desempeñan un papel fundamental cuatro tipos de elementos genéticos móviles (EGMs): sistema casete génica-integrón, transposones, plásmidos e islas de resistencia (Cantón *et al*., 2003; Baquero, 2004; Miriagou *et al*., 2006).

a. Sistema casete génica-integrón

Los integrones son sistemas naturales de clonación y expresión que incorporan casetes génicas y las convierten en genes funcionales. Las casetes génicas (CGs) son pequeños elementos móviles consistentes en una pauta abierta de lectura (*orf*; open reading frame) y un sitio de recombinación específica: *attC* (Carattoli, 2001; Partridge *et al.*,2009; Stokes y Hall, 1989). Los integrones están formados por un gen que codifica la integrasa (*intI*) que lleva a cabo la recombinación entre el sitio del propio integron: *attI* y el sitio *attC* presente en la casete. Mediante dicha recombinación se produce la inserción de la casete en el integrón, pasando a formar parte de la región variable (RV) del mismo y expresándose a partir de uno o dos promotores localizados en el extremo 3’ del gen *intI* (Figura 10).

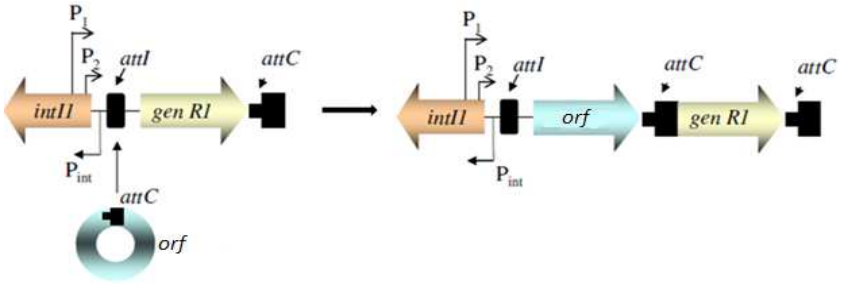

Figura 10. Estructura de un integrón genérico.

Dependiendo de la naturaleza de las casetes génicas, los integrones se clasifican en dos grupos: integrones de resistencia o integrones móviles, y superintegrones. (Fluit y Schmitz, 2004). En el primer caso, los integrones contienen fundamentalmente genes de resistencia a antimicrobianos y pueden encontrarse en transposones, plásmidos o en el cromosoma bacteriano; los superintegrones, mayor tamaño, se localizan en el cromosoma y no suelen ir asociados a elementos genéticos móviles. (Mazel, 2006). Dentro de este grupo se han descrito cinco clases de integrones en función de la secuencia aminoacídica de la proteína IntI: clase 1 (gen *intI1*), clase 2 (*intI2*), clase 3 (*intI3*), clase 4 (*intISXT* o *intI9*) y clase 5 (*intIHS*).

Los integrones de **clase 1** típicos (figura 11) son los más comunes. Se caracterizan por presentar dos segmentos conservados (5'-CS y 3'-CS) que flanquean una región central variable donde pueden encontrase una o varias casetes génicas. El segmento 5'CS contiene uno o dos promotores para la expresión de las *orfs* insertadas, el gen de la integrasa *intI1* y *attI1*. En el segmento 3'CS se sitúan genes que dotan a la bacteria de resistencia a compuestos derivados del amonio cuaternario (*qacE*, frecuentemente con la delección *Δ1*) y a sulfonamidas (*sul1*), y una *orf* de función desconocida (Recchia y Hall, 1995; Carattoli, 2001). A continuación se pueden encontrar o no, una o dos secuencias de inserción (IS*1326* e IS*1356*), seguido de un módulo de transposición defectivo (*tni*) y toda la estructura está flanqueada por repeticiones terminales invertidas (IRs; Inverted Repeats). En los últimos años se han detectado frecuentemente integrones de clase 1 que contienen el gen *sul3* en vez de *sul1* en un segmento 3'CS atípico.

Habitualmente los integrones de clase 1 se encuentran incluidos en transposones pertenecientes a la subfamilia Tn*21*.

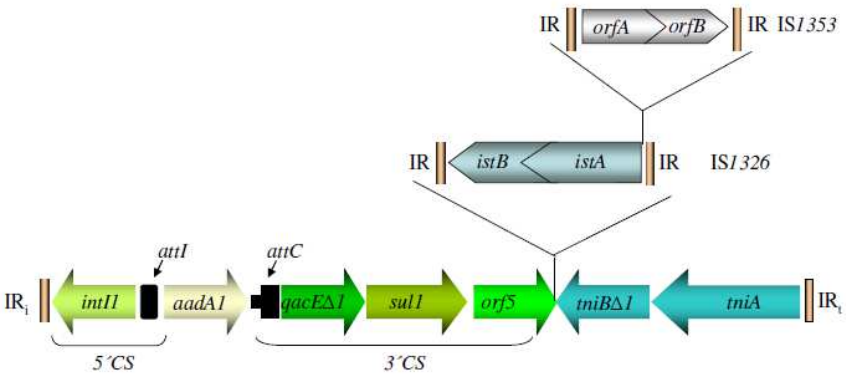

Figura 11. Estructura de un integrón de clase 1 típico.

b. Elementos genéticos transponibles

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, sin necesidad de homología entre ambos. Además, pueden contener genes de resistencia a antimicrobianos (Jackson *et al.*, 2011). Dentro de los elementos transponibles se incluyen:

Secuencias de Inserción (IS). Elementos sencillos cuyo tamaño oscila entre 700 y 1000 pb. Poseen una región central que codifica la transposasa flanqueada por IRs que oscilan entre 10 y 40 pb. Las secuencias de inserción se encuentran ampliamente distribuidas y debido a su movilidad contribuyen de modo importante a la producción de mutaciones y variabilidad de los genomas.

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

-Transpones de **clase 1** o compuestos. Presentan una estructura modular formada por dos copias de una misma secuencia de inserción que aportan la maquinaria necesaria para la movilización (Figura 12). Estas IS se encuentran flanqueando la región central, variable, que frecuentemente incluye genes de resistencia a antimicrobianos.

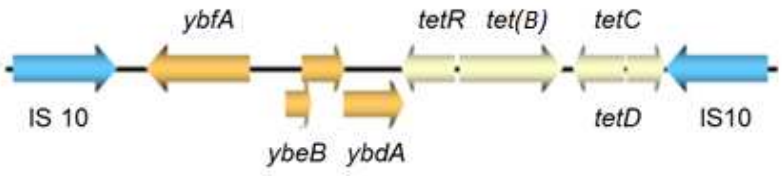

Figura 12. Representación de transposón compuesto Tn*10*.

-Transposones de **clase 2** o complejos. Están delimitados por IRs de longitud variable (35-40 pb), contienen genes que codifican los enzimas transposasa (*tnpA*) y resolvasa (*tnpR*), y una secuencia *res* (Figura 13). 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. Los transposones complejos constituyen probablemente el grupo de elementos transponibles con mayor distribución en bacterias Gram negativas.

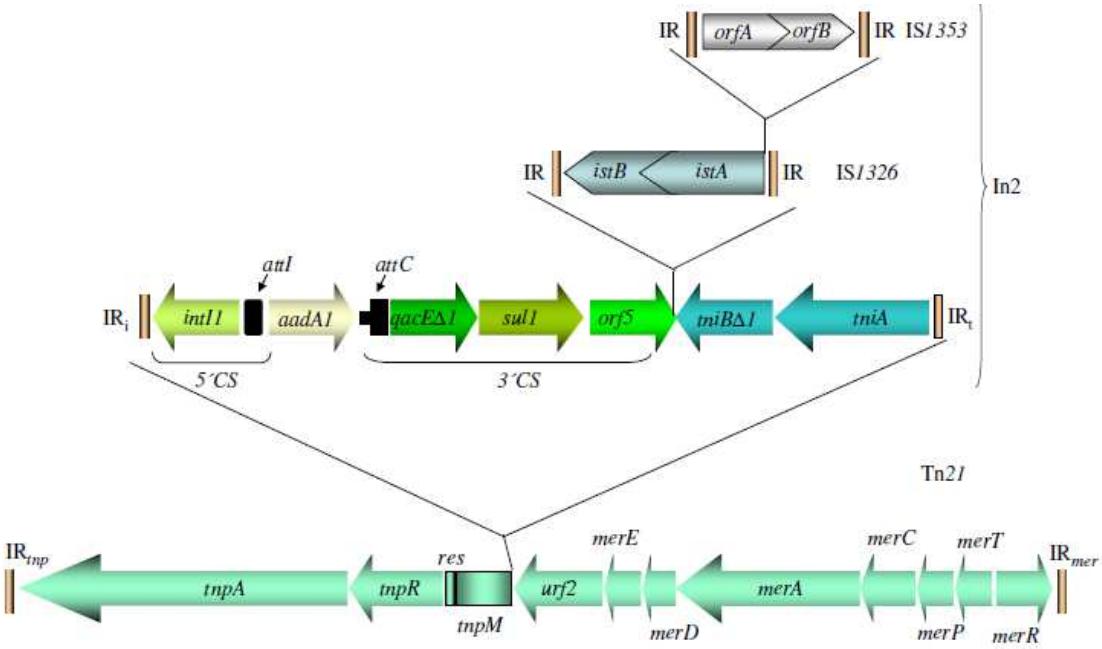

Figura 13. Representación esquemática del transposón complejo *Tn10*. (Liebert *et al.*, 1999)

Los **plásmidos** son elementos genéticos extra-cromosómicos que tienen la capacidad de replicarse de forma autónoma (herencia estable) (Figura 14). Codifican funciones de resistencia a antimicrobianos, virulencia, etc, que pese a no ser esenciales

para la célula, aportan una ventaja selectiva en determinados ambientes. 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).

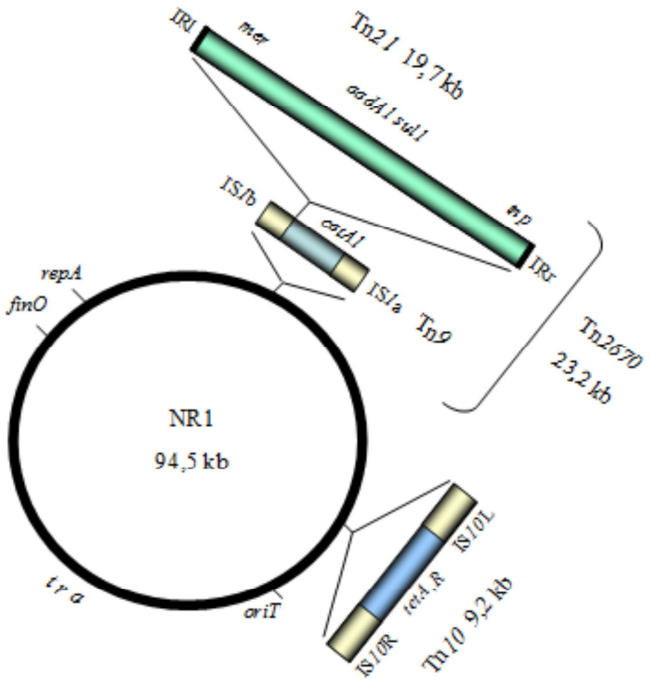

Figura 14. Representación esquemática de un plásmido conjugativo (NR1) que contiene el transposón compuesto Tn*10* y una isla de resistencia formada por dos transposones, Tn*9* y Tn*21*, portador este último de un integrón de clase 1 típico.

Los plásmidos son clave en los procesos de transferencia génica horizontal mencionados con anterioridad, ya que muchos de ellos pueden pasar de una célula a otra mediante conjugación o movilización. La conjugación es un mecanismo replicativo por el cual el plásmido se transfiere de una bacteria donadora a otra receptora. Dicha transferencia puede ocurrir incluso entre bacterias filogenéticamente distantes, lo que puede tener importantes consecuencias evolutivas.

La **isla genómica 1 (SGI1)** constituye uno de los ejemplos más representativos de resistencia cromosómica descrita en *Salmonella enterica* (Threlfall, 2000; Mulvey *et al*, 2006). Presenta un tamaño de 43 kb y se localiza en el cromosoma de *Salmonella* hacia el extremo 3' del gen *thdF*.

FACTORES DE VIRULENCIA

Salmonella posee en su genoma un gran número de genes que codifican factores de virulencia mediante los cuales lleva a cabo el proceso de infección (Figura 15). Entre ellos podemos distinguir dos grupos: 1) Genes que codifican estructuras superficiales de la bacteria (LSP, flagelos, cápsula y fimbrias); 2) Genes específicos de virulencia localizados en el cromosoma, plásmidos, islas de patogenicidad o profagos.

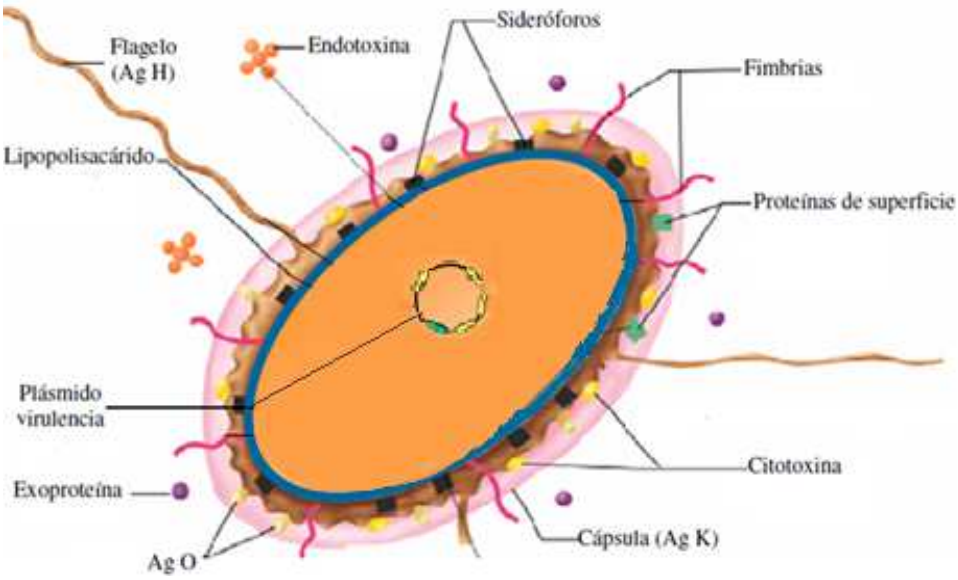

Figura 15. Representación esquemática de genes y factores de virulencia de *S. enterica*. (Madigan *et al.*, 1998, modificado).

Las estructuras superficiales son, además, dianas del sistema inmune del hospedador y, por tanto, presentan gran variabilidad antigénica debido a la presión selectiva a la que se encuentran sometidas. Con respecto a los genes específicos de virulencia, codifican factores solubles que actúan modificado la fisiología celular del hospedador o protegiendo a la bacteria de sistemas antimicrobianos del mismo.

TIPIFICACIÓN

Existen diferentes métodos de tipificación, además de la serotipificación explicada con anterioridad. Estos se pueden clasificar en dos grupos: Métodos de tipificación fenotípicos (fagotipificación y perfil de resistencia a antimicrobianos); y métodos de tipificación genotípicos (análisis plasmídico, PCR, electroforesis en campo pulsado: PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis, etc.).

a. Métodos de tipificación fenotípicos

La **fagotipificación** consiste en la subdivisión de aislamientos del mismo serotipo de *Salmonella* en fagotipos en base a las diferencias con respecto a la sensibilidad-resistencia frente a la infección y lisis de la bacteria por un papel de bacteriófagos específicos. Sólo está disponible para los serotipos más relevantes.

El **perfil de resistencia a antimicrobianos** es útil como marcador en el diagnóstico de brotes y para el seguimiento de la efectividad de los antimicrobianos en uso. Consiste en la determinación del patrón de sensibilidad o resistencia de los diferentes aislamientos de *Salmonella* a un conjunto de antimicrobianos.

b. Métodos de tipificación genotípicos

Los métodos de tipificación genotípicos están basados en el análisis del genoma parcial o completo. Dentro de ellos se incluyen diferentes análisis: 1) Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**). Consiste en la amplificación enzimática de uno o más fragmentos de DNA. 2) **Análisis plasmídico**. Requiere la extracción de DNA plasmídico, seguida de su separación y visualización en geles de agarosa. Es un método rápido, barato y sencillo. 3) PFGE. Se trata de una variación de la electroforesis convencional en geles de agarosa en la que la orientación del campo eléctrico se altera periódicamente a través de unos pulsos, permitiendo la separación de fragmentos de gran tamaño. Esta técnica se basa en el estudio de la secuencia nucleotídica del DNA que afectan a sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción utilizada.

Material y Métodos

CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS ANALIZADOS

Las cepas bacterianas de referencia y los aislamientos que han sido utilizadas en el presente trabajo se detallan a continuación.

Cepas de referencia:

Cepa control *S*. Typhimurium LT2. Sensible a antimicrobianos. Porta el plásmido de virulencia pSLT de 94 kb, específico del serotipo Typhimurium (McClelland *et al*., 2001).

Cepas control multirresistentes, procedentes de las colecciones del Laboratorio de Salud Pública (LSP) del Principado de Asturias o del Centro Nacional de Microbiología CNM, que actúan como centros regionales y nacionales de referencia de *Salmonella*:

S. Typhimurium LSP 14/92. Perteneciente al clon DT104 pentarresistente ACSSuT, portador de los genes bla_{PSE-1}, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet*(G) de localización cromosómica (Guerra *et al*., 2004).

S. Typhimurium LSP 146/02. Perteneciente al clon pentarresistente ACSSuT con los genes bla_{OXA-1}, *catA1*, *aadA1*, *sul1* y *tet*(B) localizados en el plásmido pUO-StVR2 (Herrero *et al.*, 2008).

S. Typhimurium 4,5,12:i:- LSP 389/97. Se trata de una variante monofásica de *S*. Typhimurium que no expresa la flagelina de segunda fase. Es resistente a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim, codificadas por los genes bla_{TEM-1}, *cmlA1*, *aac(3)*-IV, *aadA1*, *aadA2*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tet*(A) y *dfrA12* aportados por el plásmido pUO-STmRV1 (García *et al*., 2011).

S. Enteritidis CNM 4839/03. Resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim, gracias a los genes bla_{TEM-1}, *catA2*, *strA-strB*, *sul1*, *sul2* y *tet*(A) de localización plasmídica (Rodríguez *et al*., 2006).

Estas cepas se utilizaron como controles para el establecimiento de las bases moleculares de la resistencia a antimicrobianos y en tipificación.

S. Enteritidis ATCC 13076. Porta el plásmido de virulencia pSEV, específico del serotipo Enteritidis, y procede de la colección americana de cultivos tipo “American Type Culture Collection”.

Tabla 3. Cepas objeto de estudio.

Brote	Tipo de brote	Nº de afectados	Aislamiento	Sub-especie	Serotipo	Origen
1	Guardería	4	LSP 40/10	*enterica*	Enteritidis	Heces
	Guardería	4	LSP 41/10			Heces
	Guardería	4	LSP 42/10			Heces
	Guardería	4	LSP 43/10			Heces
2	Boda	11	LSP 139/10			Heces
	Boda	11	LSP 140/10			Heces
	Boda	11	LSP 141/10			Lenguado (relleno de marisco)
	Boda	11	LSP 142/10			Sopa de marisco
	Boda	11	LSP 177/10			Heces
	Boda	11	LSP 178/10			Heces
	Boda	11	LSP 189/10			Heces
	Boda	11	LSP 190/10			Heces
	Boda	11	LSP 191/10			Heces
	Boda	11	LSP 192/10			Heces
	Boda	11	LSP 193/10			Heces
	Boda	11	LSP 194/10			Heces
	Boda	11	LSP 195/10			Heces
3	Familiar	2	LSP 243/11			Heces
	Familiar	2	LSP 250/11			Heces

4	Restaurante	5	LSP 75/12	*enterica*	Infantis	Heces
	Restaurante	5	LSP 76/12			Heces
	Restaurante	5	LSP 77/12			Heces
	Restaurante	5	LSP 78/12			Heces
	Restaurante	5	LSP 79/12			Heces
	Restaurante	5	LSP 100/12			Salsa ali oli
5	Familiar	2	LSP 97/10	*enterica*	Paratyphi variante Java	Heces
	Familiar	2	LSP 98/10			Heces
6	Familiar	2	LSP 223/12			Heces
	Familiar	2	LSP 249/12			Heces
7	Familiar	4	LSP 254/13	*enterica*	Typhimurium monofásica	Carne de cerdo congelada
	Familiar	4	LSP 255/13			Lomo de cerdo
	Familiar	4	LSP 256/13			Cabeza y vísceras de cerdo
	Familiar	4	LSP 257/13			Corteza de cerdo
	Familiar	4	LSP 262/13			Heces
	Familiar	4	LSP 263/13			Heces
	Familiar	4	LSP 264/13			Heces
	Familiar	4	LSP 277/13			Heces
8	Desconocido		LSP 216/10	*salamae*	4,5,12:b:-	Heces
	Desconocido		LSP 228/10			Heces
	Desconocido		LSP 230/10			Heces
	Desconocido		LSP 232/10			Heces

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

Agar Eosina-Azul de metileno (EMB): Medio comercial, preparado según las instrucciones de la casa comercial (Oxoid). Se esterilizó por calentamiento hasta llevarlo a ebullición. Tras repartirlo en placas, estas se someten a la luz UV durante 15 minutos.

Agar Mueller-Hinton (MH): Medio comercial, preparado también según las instrucciones de la casa comercial (Oxoid).

Caldo Luria-Bertani (LB): Se preparó añadiendo 5 g de extracto de levadura, 5 g de triptona y 5 g de cloruro de sodio a un volumen de 1 litro de agua destilada.

Agar Luria-Bertani (LA): Se preparó a partir de caldo LB tras añadir 2 g de agar por cada 100 ml del medio líquido.

Los últimos tres medios fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121ºC y 1 atmósfera de presión.

Para el aislamiento de *Salmonella*, las cepas fueron sembradas por agotamiento (Figura 16) en medio EMB bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo vertical. Este medio es selectivo y diferencial para *Salmonella* debido a que contiene un colorante (azul de metileno) que inhibe el desarrollo de bacterias Gram-positivas. Además, la presencia de lactosa y de eosina (un indicador de pH) permite diferenciar entre bacterias Gram-negativas fermentadoras de lactosa (como *E.coli*), que originan colonias de color rojo oscuro al virar la eosina como consecuencia de la disminución del pH, y no fermentadoras de lactosa (como *Salmonella*) cuyas colonias son transparentes. A continuación, se resiembran por agotamiento las colonias correspondientes a cada cepa en placas de LA, para su conservación a 4ºC, o se inoculan en caldo LB para su posterior utilización. En todos los casos, la incubación se realiza durante 24 horas a 37ºC.

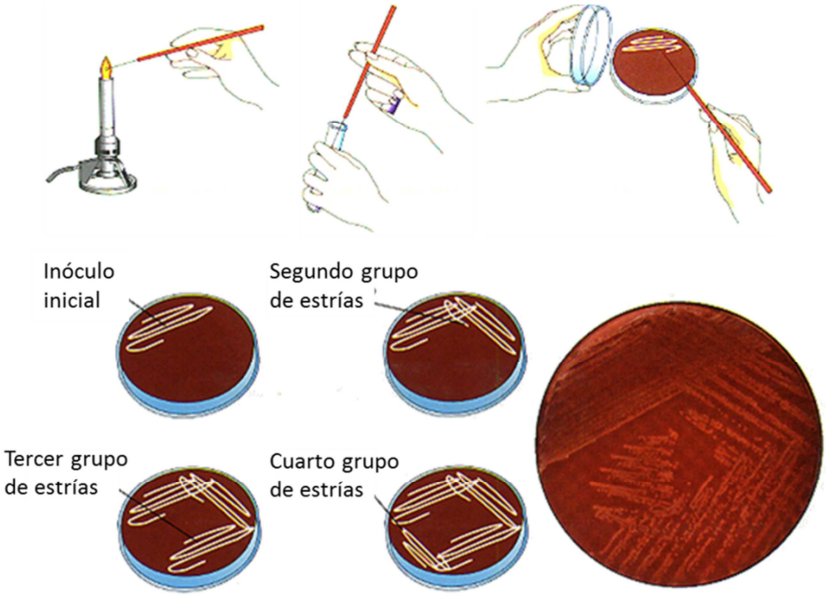

Figura 16. Esquema de siembra por agotamiento.

Para la conservación de las cepas a más largo plazo se añaden a 700 µl del cultivo en medio LB, 300 µl de glicerol. Se agita la mezcla con el fin de conseguir una población bacteriana homogénea que se almacena a -20ºC y/o -70ºC.

ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

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

Pasado ese tiempo se diluyó añadiendo a 10 µl del cultivo previamente incubado en 1 ml de LB. A continuación se inocularon 100 µl sobre la superficie de una placa de medio MH, mediante el método de siembra en sábana. Este método permite repartir de manera homogénea el cultivo líquido utilizando un hisopo estéril. Tras la inoculación se dispusieron discos de papel, de pequeño tamaño, impregnados con una cantidad concreta de antimicrobiano (Tabla 4) sobre la superficie del medio inoculado, dejando una cierta distancia de separación entre ellos (2,5 cm) para que se puedan diferenciar correctamente los halos de sensibilidad (Figura 17).

Figura 17. Representación esquemática de la disposición de discos con antibiótico sobre agar MH previamente inoculado.

Tabla 4. Antimicrobianos y categorías de sensibilidad-resistencia.

Agente antimicrobiano	Contenido disco (µg)	Diámetro del halo (mm)		
		R	IT	O
Ácido nalixídico	30	≤13	14-18	≤19
Ampicilina	10	≤13	14-16	≥17
Ciprofloxacina	5	≤31	21-30	≤20
Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18
Estreptomicina	10	≤11	12-14	≥15
Gentamicina	10	≤12	13-14	≥15
Sulfonamida	300	≤12	13-16	≥17
Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19
Trimetoprim	5	≤10	11-15	≥16

R, resistencia; IT, resistencia intermedia; O, susceptibilidad.

Las placas se dejaron incubar con la tapa hacia arriba durante una noche a 37°C. Al día siguiente se procedió a la interpretación de los resultados, midiendo el diámetro de los halos de inhibición. Los resultados del análisis fenotípico se establecieron en base a los criterios de interpretación del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009; Tabla 4).

AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación por PCR se utilizó para la detección de genes de resistencia, de elementos genéticos móviles y del gen de virulencia *spvC* de localización plasmídica. En las reacciones de amplificación se usó como molde 1,5-5 µl de DNA. 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 *eppendorf* y se centrifuga a 14.000 rpm durante 6 minutos. Se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta, se resuspende el sedimento en 300µl 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 *eppendorf*, que se guarda bajo condiciones de congelación. Este DNA extraído corresponde al material genético total (cromosómico y plasmídico) del aislamiento.

Además, para la amplificación por PCR hay que añadir dos oligonucleótidos apropiados que anillen con las cadenas opuestas del DNA molde y con sus extremos 3'orientados hacia el interior del fragmento que se quiere amplificar; los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, GE Healthcare); el enzima DNA polimerasa termorresistente (Roche Diagnostics) y su tampón de reacción. Los oligonucleótidos empleados, su secuencia, temperatura de anillamiento y el tamaño de los amplicones resultantes se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la detección de genes de resistencia, de elementos genéticos móviles y de virulencia.

Iniciador	Secuencia	Tamaño (pb)	TºC	Referencia
Resistencia a ácido Nalidíxico				
gyrA	AAATCTGCCCGTGTCGTTGGT/ GCCATACCTACGGCGATACC	343	55	Vila *et al.,* 1994
Resistencia a ampicilina				
bla_{PSE-1}	CGCTTCCCGTTAACAAGTAC/ CTGGTTCATTTCAGATAGCG	419	65	Sandvang *et al*., 1997
bla_{OXA-1}	AGCAGCGCCAGTGCATCA/ ATTCGCCCCAAGTTTCC	708	60	Guerra *et al*., 2000
bla_{TEM-1}	TTGGGTGCACGAGTGGGT/ TAATTGTTGCCGGGAAGC	503	55	Arlet y Phillipton, 1991

Resistencia a sulfonamidas				
sul1	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC/ GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	436	65	Sandvang *et al.,* 1997
sul2	TCAACATAACCTCGGACAGT/ GATGAAGTCAGCTCCACCT	707	55	Chu *et al*., 2001
sul3	GAGCAAGATTTTTGGAATCG/ CTAACCTAGGGCTTTGGA	700	50	Perreten y Boerlin, 2003
Resistencia a estreptomicina				
strA	AAAATCGCACCTGCTTCCC/ CCAATCGCAGATAGAAGGC	669	60	Madsen *et al.,* 2000
strB	GGATCGTAGAACATATTGGC/ ATCGTCAAGGGATTGAAACC	507	60	Martínez *et al.,* 2005
aadA2	TGTTGGTTACTGTGGCCGTA/ GATCTCGCCTTTCACAAAGC	622	56	Walker *et al.,* 2001
Resistencia a tetraciclina				
tet(A)	GCTACATCCTGCTTGCCT/ CATAGATCGCCGTGAAGA	210	55	Ng *et al.,* 2001
tet(B)	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG/ GTAATGGGCCAATAATACCG	659	55	Ng *et al.,* 1999
tet(G)	GCTCGGTGGTATCTCTGC/ AGCAACAGAATCGGGAAC	500	55	Guerra *et al*., 2001
Transposón Tn*3*				
tnpA	GTGCTGACTGGCAGGCAAATCGG/ GCCTGAAAATCAACCAGTCTGGC	532	60	Rodríguez *et al*., 2006
Transposón Tn*10*				
IS*10*	CTGATGAATCCCCTAATG	9148	55	Schnabel y Jones, 1999
tnpA (Tn*3*)	GTGCTGACTGGCAGGCAAATCGG/ GCCTGAAAATCAACCAGTCTGGC	536	60	Rodríguez *et al*., 2006.
tetD	ATGTGGCGAATAAAGCGGGT/ CAAACGACGAGCACGAATATAGC	108	60	Martínez, N. 2007
tetC	ATGCCTACATCACAACAAAAACTG/ TGCTGACAATGGCGTTTACCT	210	60	Martínez, N. 2007
tetR	ACAACCCGTAAACTCGCC/ TTCCAATACGCAACCTAAAG	366	55	Morsczeck *et al*., 2004
Integron de clase 1				
intI1	GCCTTGCTGTTCTTCTAC/	558	55	Ng *et al*., 1999

	GATGCCTGCTTGTTCTAC			
Genes de virulencia				
spvC	ACTCCTTGCAACCAAATGCGGA/ TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATCA	566	60	Chiu y Ou 1996

Las mezclas deben realizarse en hielo para asegurar la estabilidad de los componentes. Una vez elaboradas, la reacción se lleva cabo en un termociclador (MyCycler termal cycler, Bio-Rad; GeneAmp PCR System modelos 2400 o 9700, PE Applied Byosistems) donde tienen lugar las tres etapas del proceso de amplificación (desnaturalización, anillamiento y elongación) (Figura 18). Éstas constituyen un ciclo y cada ciclo se repite de 25 a 35 veces, bajo las condiciones que se recogen en la Tabla 6. Así se obtiene un incremento exponencial del número de copias del fragmento de ADN delimitado por los oligonucleótidos. Los ciclos van siempre acompañados de una etapa de desnaturalización inicial y de una etapa de elongación final. En todos los casos se incluyó un control positivo y un control negativo.

Tabla 6. Condiciones de amplificación

Desnaturalización inicial	Amplificación	Elongación final
	30 ciclos	
95ºC 5 min	95ºC 30 s	72ºC 5 min
	TºC[a] 30 s	
	72ºC t[b]	

[a]La temperatura de anillamiento es específica para cada pareja de iniciadores empleada y se indica en la Tabla 5.
[b]El tiempo de amplificación varía en función del tamaño del amplicón (1 minuto por cada 1000 pb).

A continuación se describe el proceso con más detalle:

1) Desnaturalización inicial: tiene lugar a una temperatura de 95ºC, la cual se mantiene durante 5 minutos. La desnaturalización del DNA permite la separación de las dos cadenas de DNA molde.
2) Amplificación: generalmente se realizan 30 ciclos, aunque puede variar de 25 a 35. En ellos tiene lugar: a) Desnaturalización, b) Anillamiento, mediante la cual 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 debe calcularse para cada caso a partir de la siguiente formula:

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

c) Elongación, etapa en la que se produce la adición secuencial de los distintos dNTPs a partir del extremo 3' de los iniciadores. La elongación es llevada a cabo por la polimerasa que actúa siguiendo las "instrucciones" del DNA molde a una temperatura de 72ºC. El tiempo de elongación ha de calcularse, siendo de 1 minuto por cada 1000 pares de bases a amplificar.

3) Elongación final: Se lleva a cabo a 72ºC y puede durar entre 5 y 10 minutos.

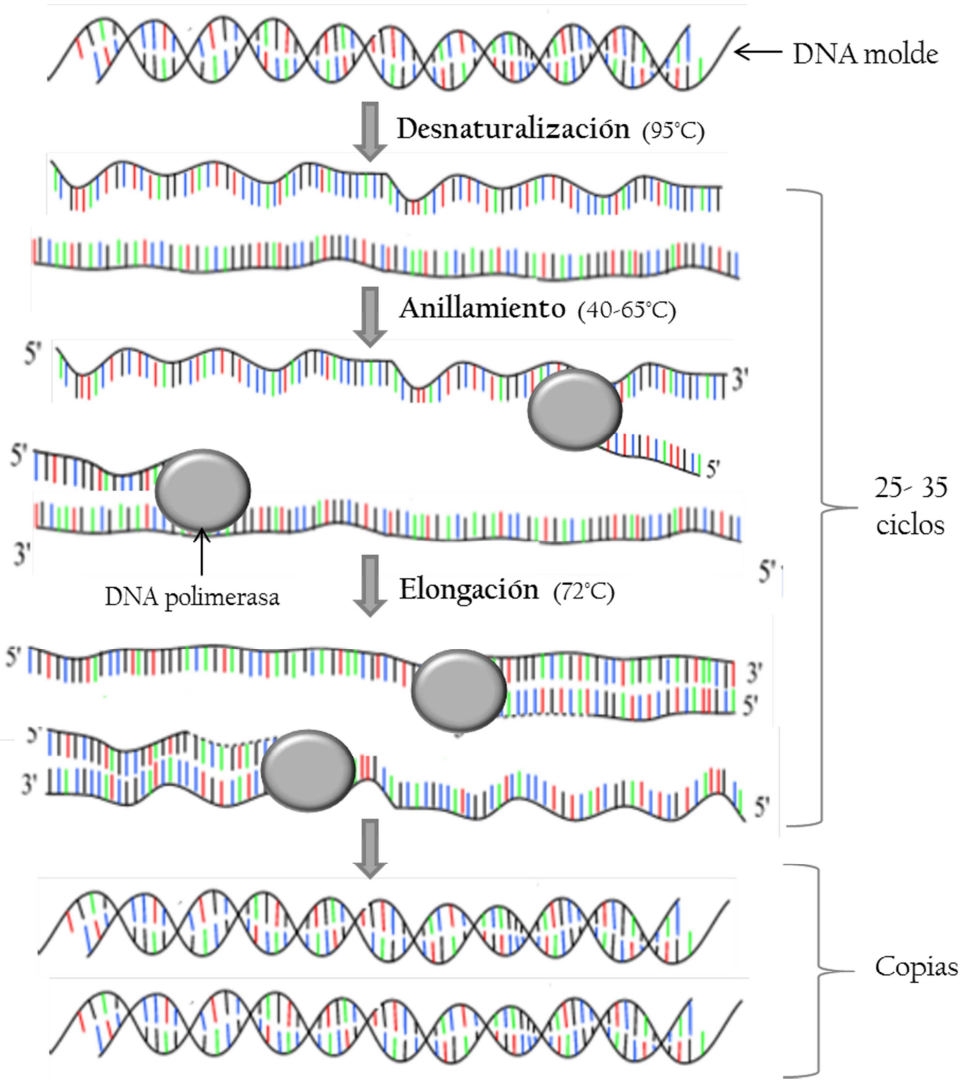

Figura 18. Representación esquemática de las etapas de una PCR.

La separación de los fragmentos tuvo lugar mediante electroforesis en geles de agarosa (1-1,5% en tampón TAE; Tris-Acetato 40 mM pH8-EDTA 1 mM), utilizando como marcador molecular el DNA del fago λ digerido con el enzima de restricción PstI (Takara) a 37ºC durante 1 noche. Posteriormente, los geles se tiñeron con una solución acuosa de Bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV incorporado al sistema de captación de imágenes Gel Doc™ XR (Bio-Rad).

SECUENCIACIÓN

La secuenciación de los 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 los aislamientos de *S.* Enteritidis estudiados.

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 MicroSpinTM*) 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 µl de *Capture buffer type 3* a cada uno de los productos de amplificación por 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 los tubos de las columnas y se desechó el líquido eluido. A continuación se colocaron de nuevo tubos en las columnas dentro de los tubos, se añadieron 500 µl de *Wash buffer type 1*, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 1 minuto y se transfirieron a tubos *eppendorf* estériles. Tras esta segunda centrifugación se añadió a cada columna 50 µl de *elution buffer type 4* (que consiste en H_20 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 *eppendorf* (Figura 19) que se mantuvieron a -20ºC hasta su envío para la secuenciación.

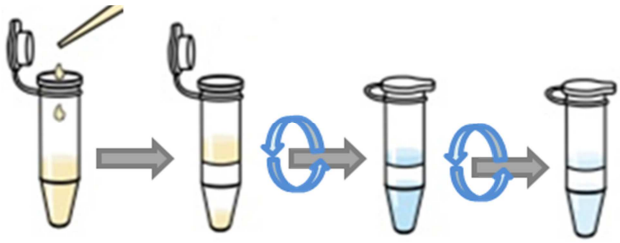

Figura 19. Representación esquemática de las etapas de la purificación del DNA.

La secuenciación fue llevada a cabo por la compañía MACROGEN Inc. (Amsterdam). Las secuencias obtenidas (Figura 20) se procesaron con los programas *Clone Manager Professional Suite* versión 7 *y ContigExpress®*.

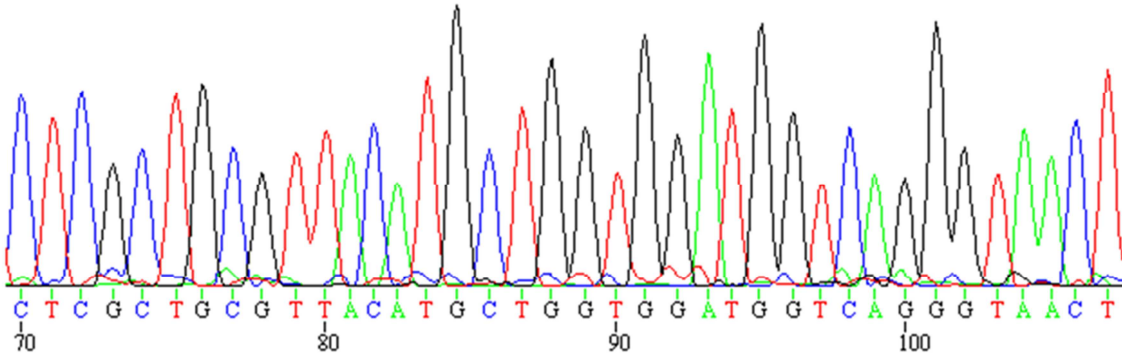

Figura 20. Ejemplo de un cromatograma correspondiente a un fragmento del gen gyrA de un aislamiento de *S.* Enteritidis resistente a ácido nalidíxico.

ANÁLISIS PLASMÍDICO. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

El método utilizado para la extracción del DNA plasmídico y poder determinar su tamaño molecular consiste en la lisis alcalina descrita por **Kado y Liu** (1981). Este método aprovecha las diferencias existentes entre el DNA cromosómico y el plasmídico permitiendo purificar plásmidos de gran tamaño (hasta 150 kb) de forma rápida.

Para la realización de la técnica se sembró en 2,5 ml de LB una colonia aislada de los diferentes aislamientos en estudio y se incubó una noche en agitación a 37ºC. Posteriormente, se transfirió 1,5 ml del cultivo en LB a un tubo eppendorf, se centrifugó 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 H_20 destilada hasta enrasar a 100 ml) y se resuspendieron las células para obtener una suspensión homogénea. Dicha solución KD-I se utiliza, por tanto, para resuspender el sedimento bacteriano. A continuación, se añadieron 100 µl de la solución KD-II (0,60 g de Tris, 3 g de SDS, 4,1 ml de NaOH 2N, enrasar hasta 100 ml con H_20 destilada; pH a 12,5) y se invirtieron varias veces los tubos con suavidad. La solución KD-II se utiliza para lisar las células gracias al detergente SDS. Una vez añadida la solución de lisis se procedió a la incubación de las muestras en un baño de agua a 55ºC durante 30 minutos lo que, junto al pH básico, conduce a la desnaturalización del DNA

plasmídico y del DNA cromosómico. Tras este periodo de incubación se añadieron 50 µl de fenol ácido y 50 µl de cloroformo-isoaminoalcohol, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó 15 minutos para separar las distintas fases. En un nuevo tubo eppendorf se recogió la mayor cantidad posible de fase acuosa evitando el arrastre de los restos celulares de la interfase. Esta contiene el DNA plásmídico (circular, covalentemente cerrado y superenrrollado) que se renaturaliza al disminuir el pH por acción del fenol ácido. Sin embargo, el DNA cromosómico, fragmentado durante la extracción, permanece insoluble en la interfase.

Para su visualización, 20 µl de la solución del plásmido obtenida junto a 2 µl de tampón de carga, se sometiron a electroforesis en geles de agarosa al 0,6% en tampón TAE 1X.

Como control de tamaños se utilizaron los plásmidos de E.coli 39R861, R1, RP4, R27 y V517. Además del DNA del fago λ digerido con el enzima de restricción PstI y HindIII. Los geles fueron teñidos y visualizados siguiendo el método explicado anteriormente.

ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE)

La tipificación de los aislamientos de los diferentes brotes 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). La electroforesis en campo pulsante (Sambrook *et al.*, 2001) 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 (más de 1000 kb). Cuando el primer campo eléctrico se aplica al gel, las moléculas se desplazan hacia el polo positivo, en la dirección del mismo. Después de un tiempo este primer campo se suprime y se activa otro formando ángulo con el anterior. El DNA antes de migrar en la dirección del segundo campo eléctrico debe cambiar su conformación y reorientarse. La reorientación requiere de un tiempo que va a depender del tamaño de los fragmentos, siendo mayor en los de mayor tamaño.

El resultado de la técnica es la generación de perfiles de un número variable de bandas (PFGE-tipos o pulsotipos), de tamaños comprendidos entre 15 kb y más de 1000

kb, de fácil interpretación y que se pueden considerar mapas de macrorrestricción del genoma de la cepa.

Para la preparación de los bloques necesarios para realizar el campo pulsante, se resuspendió cada cepa, previamente sembrada en medio LA, en 2 ml de tampón CSB (1 ml de Tris-HCL 1M pH8, 200 µl EDTA 0,5M pH8, enrasado a 100 ml con H2O destilada). A continuación se midió la absorbancia de la suspensión en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm y en función del valor obtenido la absorbancia obtenida para cada cepa se calcula el volumen inicial de suspensión necesario para cada cepa y se completa hasta 400 µl con CSB. Se desea 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 H_2O destilada) y se mantuvo en un baño a 70ºC. Se añadieron 20 µl de proteinasa K a cada suspensión de células bacterianas y se incubaron durante 15 minutos a 37ºC. A continuación se mezclaron 200 µl de suspensión celular con 200 µl de agarosa y se distribuyó en moldes, que se dejaron a 4ºC durante 15 minutos para su solidificación.

Una vez enfriados los bloques, se sumergieron en tampón de lisis. 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 55ºC.

A continuación se realizaron 5 lavados a 50ºC en agitación durante 15 min, el primero de ellos con agua destilada, siguiéndole otros 4 con TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). La lisis de las células incluidas en bloques de agarosa, asegura la liberación del DNA intacto.

Una vez preparados, los bloques se estabilizaron con el tampón de la enzima que se utilizará en la digestión, manteniéndolos durante 30 min a temperatura ambiente y se procedió con la digestión enzimática.

Para la 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 4ºC. 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 37ºC. 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 4ºC.

Para la preparación del gel de agarosa se utilizaron 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 ¼ 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 deslizasen al verter la agarosa. Por último se vertió en el molde la agarosa fundida por ebullición y enfriada a 60ºC, y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Para la separación de los fragmentos se realizó una electroforesis en una cubeta 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 14ºC, con un ángulo de orientación de 120º que determina lo que deben girar los fragmentos cada vez que se cambia la orientación del campo. Una vez terminada la electoforesis se tiñó el gel y se visuaizó de modo similar a una PCR.

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 subtipificaión molecular de patógenos transmitidos por alimentos, para normalizar y comparar perfiles PFGE.

Resultados y Discusión

AISLAMIENTO DE *SALMONELLA ENTERICA*

Los 41 aislamientos de *S. enterica* estudiados a lo largo de este proyecto se obtuvieron a partir de muestras clínicas (heces) y alimentos durante los años 2010, 2011, 2012 y 2013.

Todos los aislamientos fueron cultivados en medio EMB, previamente a la realización de otros estudios, mediante la técnica de siembra por agotamiento y posteriormente se incubaron a 37ºC.

Como resultado se obtuvieron colonias transparentes en todos los casos, aspecto característico del género *Salmonella*, al no fermentar lactosa en dicho medio diferencial (Figura 21).

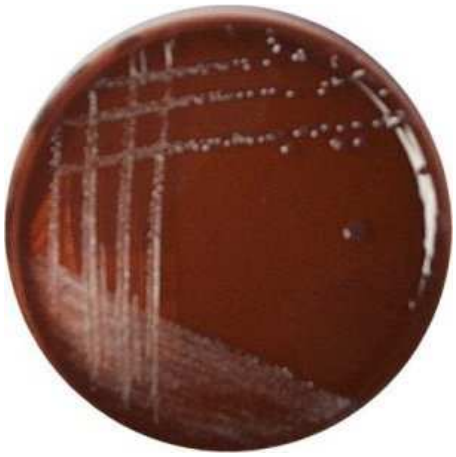

Figura 21. Crecimiento característico de *Salmonella enterica* en medio EMB.

ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

En primer lugar se valoró la sensibilidad/resistencia de los aislamientos objeto de estudio frente a un panel de 9 antimicrobianos mediante la técnica de difusión en agar (antibiograma). Los antimicrobianos utilizados así como su mecanismo de actuación se resumen en la Tabla 7 y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8. De un total de nueve brotes analizados, sólo en dos de ellos, causados por *S. enterica* subsp. *salamae* (BS-1/10) y por el serotipo Enteritidis de *S. enterica* subsp. *enterica* (BE-3/11), los aislamientos implicados fueron susceptibles a todos los antimicrobianos ensayados. Otros aislamientos responsables de brotes fueron resistentes a un único antimicrobiano, en concreto ácido nalidixico (BE-1/10 y BE-2/10, causados por Enteritidis) o

estreptomicina (BPJ-1/10 y BPJ-2/12, de Paratyphi B variedad Java y BI-1/12 de Infantis). Por el contario, los aislamientos de la variante monofásica de Typhimurium (BTm-1/13) fueron resistentes a cuatro antimicrobianos no relacionados: ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y trimetoprim, pudiendo considerarse multi-resistentes.

Tabla 7. Antimicrobianos utilizados, grupo y mecanismo de acción.

Antimicrobiano	Grupo	Mecanismo de actuación
Ampicilina	Penicilinas (β-lactámicos)	Interfieren con la biosíntesis del peptidoglicano, componente esencial de la pared celular bacteriana y activan autolisinas bacterianas.
Estreptomicina Gentamicina	Aminoglucosidos	Se unen 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.
Sufonamidas	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, el cual 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.
Ácido nalidixíco Ciprofloxacina	Quinolonas Fluoroquinolonas	Bloquean a los enzimas topoisomerasa II (DNA girasa) y topoisomerasa IV, que intervienen en los procesos de replicación, partición y transcripción del DNA.

Tabla 8. Susceptibilidad/Resistencia a antimicrobianos de aislamientos de *Salmonella enterica* causantes de brotes en el Principado de Asturias.

Brote	Aislamiento	Antimicrobiano								
		AMP	CIP	CHL	GM	NAL	STR	SUL	TET	W
Salmonella enterica* subespecie *enterica										
BE-1/10	LSP 40/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 41/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 42/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 43/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
BE-2/10	LSP 139/10	0	0	0		R	0	0	0	0
	LSP 140/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 141/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 142/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 177/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 178/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 189/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 190/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 191/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 192/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 193/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 194/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
	LSP 195/10	0	0	0	0	R	0	0	0	0
BE-3/11	LSP 243/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	LSP 250/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BPJ-1/10	LSP 97/10	0	0	0	0	0	R	0	0	0
	LSP 98/10	0	0	0	0	0	R	0	0	0
BPJ-2/12	LSP 223/12	0	0	0	0	0	R	0	0	0
	LSP 249/12	0	0	0	0	0	R	0	0	0

Brote Serotipo	Aislamiento	Antimicrobiano								
		AMP	CIP	CHL	GM	NAL	STR	SUL	TET	TMP
BI-1/12	LSP 75/12	0	0	0	0	0	R	0	0	0
	LSP 76/12	0	0	0	0	0	R	0	0	0
	LSP 77/12	0	0	0	0	0	R	0	0	0
	LSP 78/12	0	0	0	0	0	R	0	0	0
	LSP 79/12	0	0	0	0	0	R	0	0	0
	LSP 100/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BTm-1/13	LSP 254/13	R	0	0	0	0	R	R	R	0
	LSP 255/13	R	0	0	0	0	R	R	R	0
	LSP 256/13	R	0	0	0	0	R	R	R	0
	LSP 257/13	R	0	0	0	0	R	R	R	0
	LSP 262/13	R	0	0	0	0	R	R	R	0
	LSP 263/13	R	0	0	0	0	R	R	R	0
	LSP 264/13	R	0	0	0	0	R	R	R	0
	LSP 277/13	R	0	0	0	0	R	R	R	0
Salmonella enterica* subespecie *salamae										
BS-1/10	LSP 216/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	LSP 228/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	LSP 230/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	LSP 232/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

B, brote; E, Enteritidis; PJ, Paratyphi variante Java; I, Infantis; Tm, variante monofásica de Typhimurium, S, Salamae.
AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CHL: cloranfenicol; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; STR: estreptomicina; SUL: sulfonamidas; TET: tetraciclinas; TMP: trimetoprim. O, susceptibilidad; R, resistencia

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Los aislamientos estudiados resistentes a algún antimicrobiano (Tabla 8) fueron analizados mediante PCR para identificar los genes responsables de dichas resistencias.

En los 8 aislamientos resistentes a ampicilina (BTm-1/13) se investigó la presencia de los genes $bla_{\text{TEM-1}}$, $bla_{\text{OXA-1}}$ y $bla_{\text{PSE-1}}$ que codifican β-lactamasas que hidrolizan el anillo β-lactámico de las penicilinas. En todos los casos se detectó el gen $bla_{\text{TEM-1}}$.

En los 8 asilamientos resistentes a sulfonamidas (BTm-1/13) se estudió la presencia de los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* que codifican enzimas dihidropteroato sintetasas alternativas resistentes (DHPS-I, DHPS-II y DHPS III, respectivamente). En todos ellos se demostró la presencia de los genes *sul2* y *sul3*.

En los 8 aislamientos resistentes a tetraciclina (BTm-1/13) se analizó 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. Todos fueron positivos para el gen *tet*(B).

En los 16 aislamientos resistentes a estreptomicina y en los 2 aislamientos con fenotipo intermedio se investigó la presencia de los genes *strA*, *strB* y *aadA*. Los genes *strA* (*aph(6)-Ia*) y *strB* (*aph(6)-Id*) fosforilan un grupo amino de la estreptomicina en posición 6 mediando únicamente resistencia a estreptomicina, mientras que el gen *aadA* [*ant(2”)*] adenila un grupo hidroxilo del antibiótico en la posición 3’ confiriendo resistencia a estreptomicina y espectinomicina. En los aislamientos de los brotes BI-1/12 (75/12, 76/12, 77/12, 78/12, 79/12), BPJ-1/10 (97/10, 98/10), BPJ-2/12 (223/12, 249/12), se detectó la presencia del gen *strB*; mientras que para los aislamientos pertenecientes al brote BTm-1/13 (254/13, 255/13, 256/13, 257/13, 262/13, 263/13, 264/13, 277/13) se demostró la presencia de los genes *strA* y *strB* que suelen ir juntos y precedidos en muchos casos por el gen *sul2*.

En conjunto, los aislamientos del brote BTm-1/13 fueron positivos para los genes $bla_{\text{TEM-1}}$-*strA*-*strB*-*sul2*-*sul3*-*tet*(B) que justifican la tetrarresistencia a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina. A excepción del gen *sul3*, este perfil de resistencia coincide con el característico del denominado clon europeo de la variante monofásica 4,[5],12:i:- de Typhimurium. Esta variante se encuentra ampliamente

distribuida en numerosos países europeos, incluida España. La región responsable de esta tetrarresistencia ha sido secuenciada a partir de un aislamiento clínico de Italia (Lucarelli *et al.,* 2012), identificándose dos regiones de resistencia localizadas en el cromosoma. Una de ellas aporta los genes $bla_{\text{TEM-1}}$, *strA-strB* y *sul2* y la otra el gen *tet*(B). Ya se han descrito varios brotes causados por esta variante en Europa, a los que se suma el analizado en el presente trabajo (Mossong *et al.,* 2007; Raguenaud *et al.,* 2012; Agasan *et al.,* 2002).

La resistencia a ácido nalidíxico se debe a mutaciones en los genes *gyr* y *par* que codifican las enzimas topoisomerasa II (DNA girasa) o topoisomerasa IV, las cuales constan de dos subunidades denominadas A y B. Las mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la DNA girasa, son la causa más común de resistencia a quinolonas. Por este motivo se amplificó dicho gen en todos los aislamientos resistentes, (brotes BE-1/10 y BE-2/10), y se secuenciaron los fragmentos resultantes de la amplificación. Todos los aislamientos resistentes a ácido nalidíxico presentaron una mutación que cambió el codón "GAC" correspondiente al Aspártico (Asp) de la posición 87 por el codón "TAC" de Tirosina (Tyr).

El serotipo Enteritidis, mayoritario en infecciones humanas y causante de los brotes BE-1/10, BE-2/10 y BE-3/11, presenta generalmente una baja resistencia a antimicrobianos. La resistencia a ácido nalidíxico, presentada por los aislamientos de dos de los tres brotes analizados en este trabajo, constituye una excepción. Esta resistencia se asocia al uso de quinolonas (principalmente enrofloxacina en aves de corral), como promotoras del crecimiento de animales destinados al consumo humano. La utilización de antimicrobianos como promotores del crecimiento se practicó de forma generalizada durante muchos años, aunque en la actualidad está prohibida en la Unión Europea.

DETECCIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES (EGMS)

A continuación se investigó la presencia/ausencia de elementos genéticos móviles asociados a los genes de resistencia identificados. Estos elementos genéticos fueron los transposones Tn*3* y Tn*10*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9.

El gen de resistencia a ampicilina *bla*$_{TEM-1}$ se localiza frecuentemente en el transposón Tn*3*. Para investigar la posible asociación entre ambos se realizó una amplificación del gen *tnpA* que codifica la transposasa específica de ese transposón, en todos los aislamientos resistentes a ampicilina. Sin embargo, ninguno de ellos fue positivo.

El gen de resistencia a tetraciclina *tet*(B) se encuentra normalmente insertado en el transposón Tn*10*, junto con los genes *tetR*, *tetC* y *tetD*. Para determinar la presencia de este transposón en todos los aislamientos portadores del gen, se realizó una amplificación de estos genes y de la secuencia de inserción IS*10* que flanquea a Tn*10*, siendo positivos para *tetR* y *tetD* pero no para *tetC* e IS*10*. Esto sugiere la presencia de un transposón Tn*10* defectivo y concuerda con lo observado para la región de resistencia secuenciada por Lucarelli *et al*. (2012).

Tabla 9. Resultados.

Brote	Aislamiento	Fenotipo	Genotipo	EGMs
Salmonella enterica* subespecie *enterica				
BE-1/10	LSP 40/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 41/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 42/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 43/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
BE-2/10	LSP 139/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 140/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 141/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 142/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 177/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 178/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 189/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 190/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 191/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 192/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 193/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 194/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
	LSP 195/10	NAL	*gyrA*(Asp$_{87}$/Tyr)	
BE-3/11	LSP 243/11	Sensible		
	LSP 250/11	Sensible		
BPJ-1/10	LSP 97/10	STR	*strB*	
	LSP 98/10	STR	*strB*	

BPJ-2/12	LSP 223/12	STR	*strB*	
	LSP 249/12	STR	*strB*	
BI-1/12	LSP 75/12	STR	*strB*	
	LSP 76/12	STR	*strB*	
	LSP 77/12	STR	*strB*	
	LSP 78/12	STR	*strB*	
	LSP 79/12	STR	*strB*	
	LSP 100/12	Sensible		
BTm-1/13	LSP 254/13	AMP-STR-SUL-TET	bla_{TEM-1}-*strA-strB-sul2-sul3-tet*(B)	Tn*10*
	LSP 255/13	AMP-STR-SUL-TET	bla_{TEM-1}-*strA-strB-sul2-sul3-tet*(B)	Tn*10*
	LSP 256/13	AMP- STR-SUL-TET	bla_{TEM-1}-*strA-strB-sul2-sul3-tet*(B)	Tn*10*
	LSP 257/13	AMP-STR-SUL-TET	bla_{TEM-1}-*strA-strB-sul2-sul3-tet*(B)	Tn*10*
	LSP 262/13	AMP-STR-SUL-TET	bla_{TEM-1}-*strA-strB-sul2-sul3-tet*(B)	Tn*10*
	LSP 263/13	AMP-STR-SUL-TET	bla_{TEM-1}-*strA-strB-sul2-sul3-tet*(B)	Tn*10*
	LSP 264/13	AMP-STR-SUL-TET	bla_{TEM-1}-*strA-strB-sul2-sul3-tet*(B)	Tn*10*
	LSP 277/13	AMP-STR-SUL-TET	bla_{TEM-1}-*strA-strB-sul2-sul3-tet*(B)	Tn*10*
Salmonella enterica* subespecie *salamae				
BS-1/13	LSP 216/10	Sensible		
	LSP 228/10	Sensible		
	LSP 230/10	Sensible		
	LSP 232/10	Sensible		

AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CHL: cloranfenicol; GEN: gentamicina; NAL: ácido nalidíxico; STR: estreptomicina; SUL: sulfonamidas; TET: tetraciclinas; TMP: trimetoprim.

DETECCIÓN DE PLÁSMIDOS

El análisis plasmídico de los 19 aislamientos de *S.* Enteritidis (Figuras 22 y 23) reveló la presencia en todos ellos de pSEV de 60 kb, que es el plásmido de virulencia característico de este serotipo. De acuerdo con esto, a partir de todos ellos se obtuvo el amplicón esperado para el gen de virulencia *spvC* que pertenece al operón *spv* común a todos los plásmidos de *Salmonella* específicos de serotipo. Este operón aumenta considerablemente la capacidad de *Salmonella* de proliferar dentro de las células del retículo endotelial durante la fase extraintestinal de la enfermedad, siendo necesario para que serotipos no tifoideos provoquen infecciones sistémicas, y ha sido asociado con infecciones invasivas severas en seres humanos. Los aislamientos de otros serotipos fueron negativos. Además, cuatro de los cinco aislamientos de Enteritidis (LSP 41/10,

LSP 42/10, LSP 43/10 y LSP 44/10), presentaron un plásmido adicional de pequeño tamaño.

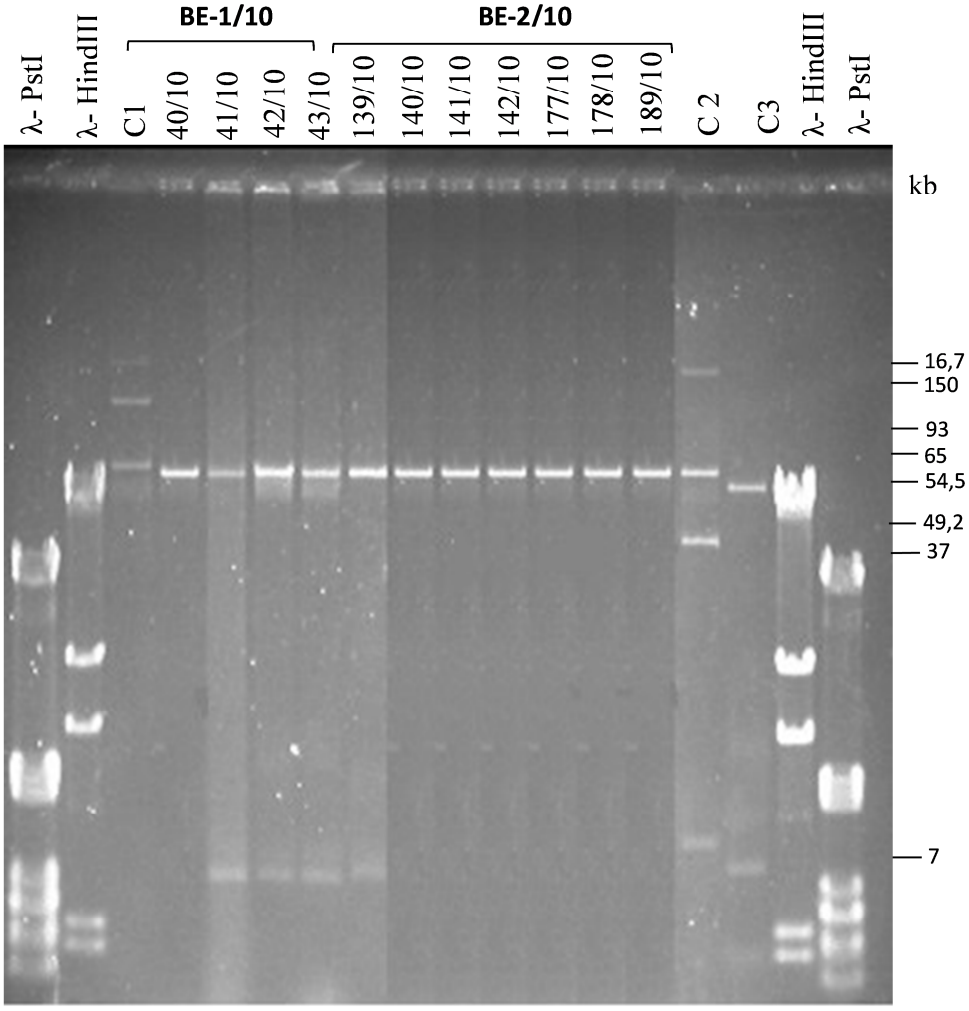

Figura 22. Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Enteritidis implicados en los brotes BE-1/10 y BE-2/10. Calles 1 y 18, DNA del fago λ digerido con PstI; 2 y 17, DNA del fago lamba digerido con HindIII 4-14, perfiles plasmídicos de los aislamientos analizados; C1, plásmidos de *E. coli* 39R861; C2, plásmidos de *E. coli* R1 más RP4 y R27; C3, Plásmidos de *E.coli* V517; Los plásmidos de las calles C1, C2 y C3 se incluyeron como controles de tamaño de plásmidos intactos; kb, kilobases.

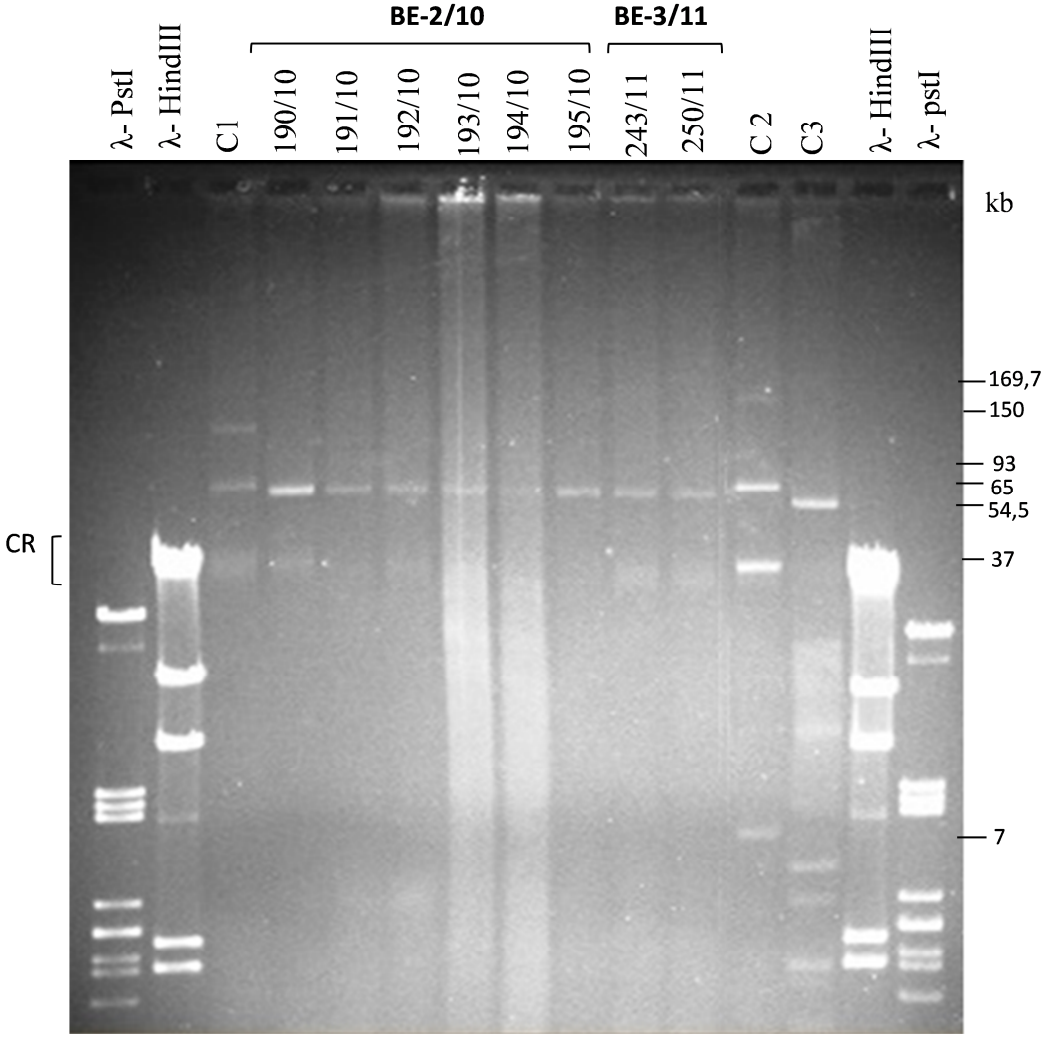

Figura 23. Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Enteritidis responsables de los brotes BE-2/10 y BE-3/11. Calles 1 y 15, DNA del fago λ digerido con PstI; 2 y 14, DNA del fago lamba digerido con HindIII; 4-11, perfiles plasmídicos de los aislamientos analizados; C1, plásmidos de *E. coli* 39R861; C2, plásmidos de *E. coli* R1 más RP4 y R27; C3, Plásmidos de *E.coli* V517; Los plásmidos de las calles C1, C2 y C3 se incluyeron como controles de tamaño de plásmidos intactos; kb, kilobases. CR, DNA cromosómico.

A diferencia de Enteritidis no se encontraron plásmidos en los aislamientos de Paratyphi B variedad Java (Brotes BPJ-1/10 y BPJ-2/12), en los aislamientos de Infantis (BI-1/12), ni en los aislamientos de *S. enterica* subsp. *salamae* (Figuras 24 y 25). Finalmente, en los 8 aislamientos de la variante monofásica de Typhimurium se detectó

un plásmido de pequeño tamaño, pero fueron negativos para el plásmido de virulencia específico de Typhimurium (Figura 25).

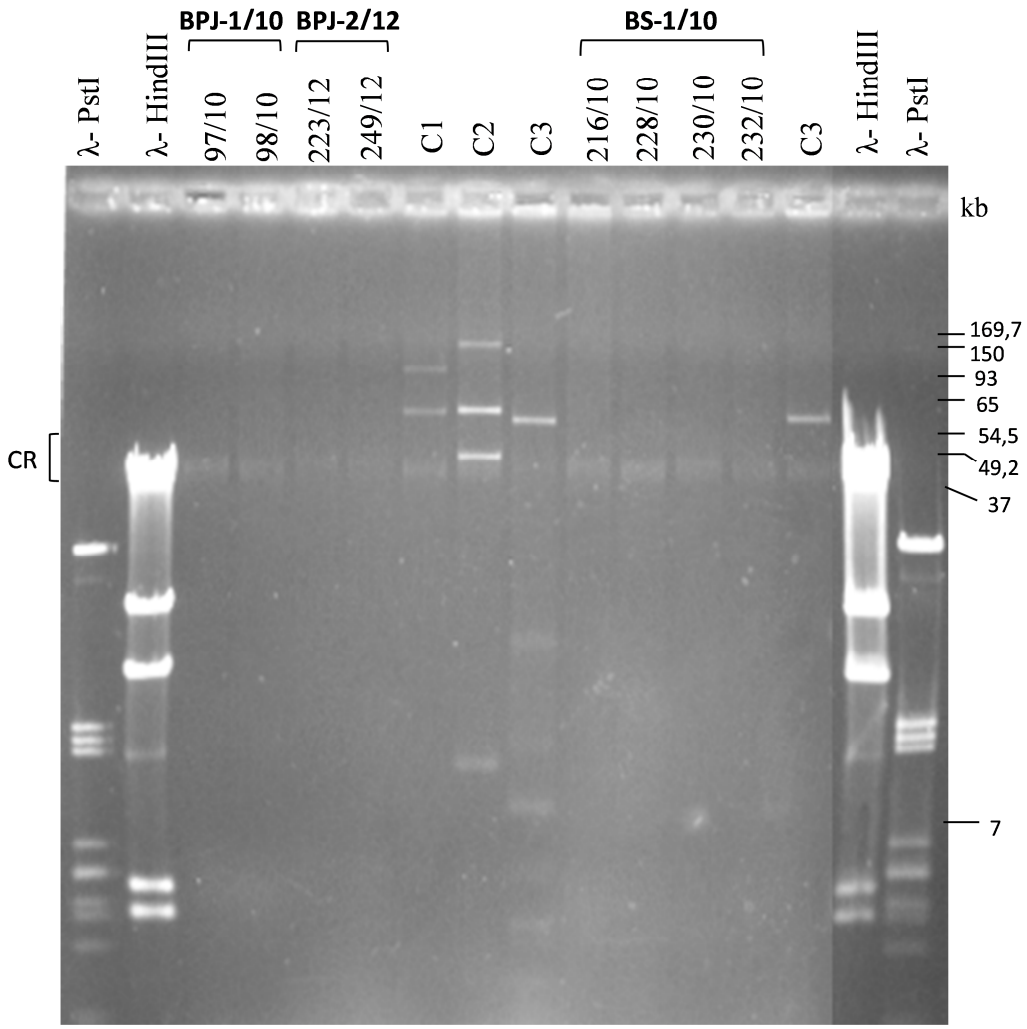

Figura 24. Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Paratyphi B variedad Java (BPJ-1/10 y BPJ-2/12) y *S. enterica* subespecie *salamae* (BS-1/10). Calles 1 y 16, DNA del fago λ digerido con PstI; 2 y 15, DNA del fago lamba digerido con HindIII 3-6 y 10-13perfiles plasmídicos de los aislamientos analizados C1, plásmidos de *E. coli* 39R861; C2, plásmidos de *E. coli* R1 más RP4 y R27; C3, Plásmidos de *E.coli* V517; Los plásmidos de las calles C1, C2 y C3 se incluyeron como controles de tamaño de plásmidos intactos; pb, pares de bases. CR, DNA cromosómico.

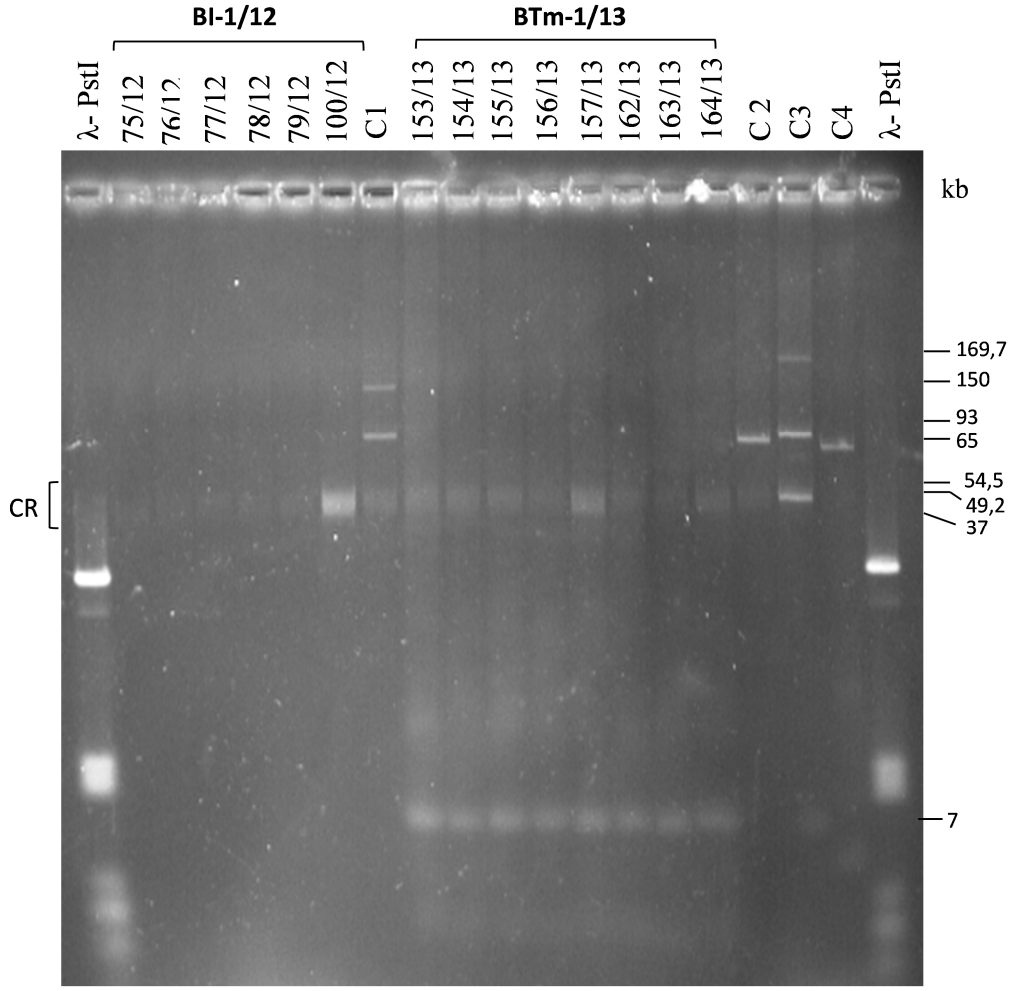

Figura 25. Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipos Infantis (BI-1/12) y de la variante monofásica de Typhimurium (BTm-1/13). Calles 1 y 20, DNA del fago λ digerido con PstI; 2-7 y 9-17, perfiles plasmídicos de los aislamientos analizados C1, plásmidos de *E. coli* 39R861; C2, plásmidos de *E. coli* R1 más RP4 y R27; C3, Plásmidos de *E.coli* V517; C4, plásmidos de LSP 191/10 incluido como control. Los plásmidos de las calles C1, C2 y C3 se incluyeron como controles de tamaño de plásmidos intactos; pb, pares de bases. CR, DNA cromosómico.

TIPIFICACIÓN MEDIANTE MACRORRESTRICCIÓN-ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE

Para la tipificación mediante PFGE se utilizó la endonucleasa XbaI, tal y como se comentó en el apartado de materiales y métodos. El análisis de los aislamientos reveló 6 perfiles, designados P1 a P6 (Figuras 26, 27 y 28). Estos perfiles incluyeron de 10 a 23 fragmentos con tamaños comprendidos entre unas pocas pares de bases y 1.100 kb.

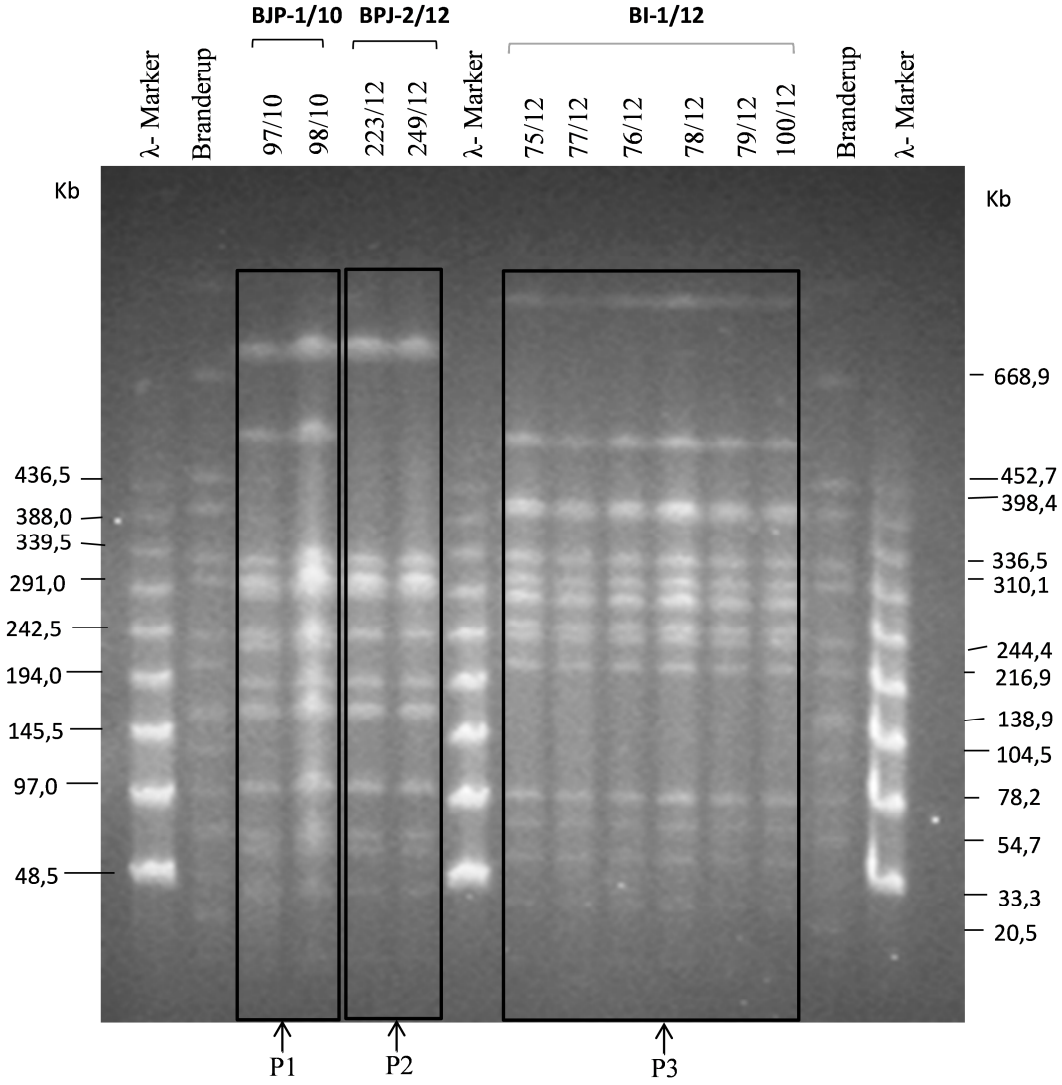

Figura 26. Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de *S. enterica* causantes de los brotes BJP-1/10, BPJ-2/12 y BI-1/12. Calles 1, 7 y 15, λ ladder PFGE marker; 2 y 14 DNA *de S, enterica* serovar Branderup H9812 digerido con XbaI; 3-4, perfiles de los aislamientos de Paratiphy B variedad Java causantes del brote BJP-1/10; 5-6, perfiles de los aislamientos de Paratiphy B variedad Java causantes del brote BJP-2/12; y 8-13, perfiles de los aislamientos de Infantis causantes del brote BI-1/12.

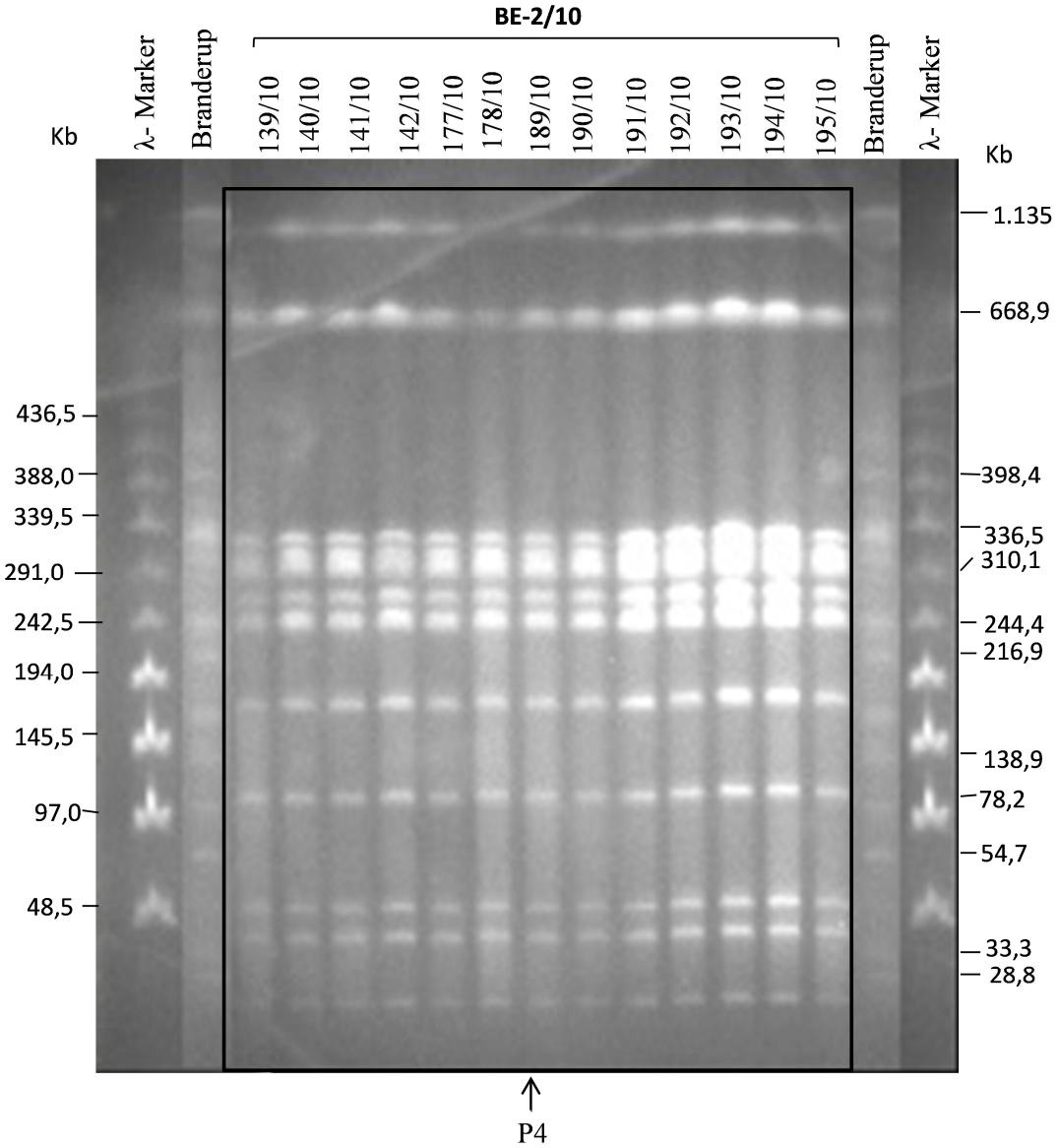

Figura 27. Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de Enteritidis causante del brote BE-2/10. Calles 1 y 17, λ ladder PFGE marker; 2 y 16, 14 DNA *de S, enterica* serovar Branderup H9812 digerido con XbaI; 3-15, perfiles de los aislamientos indicados.

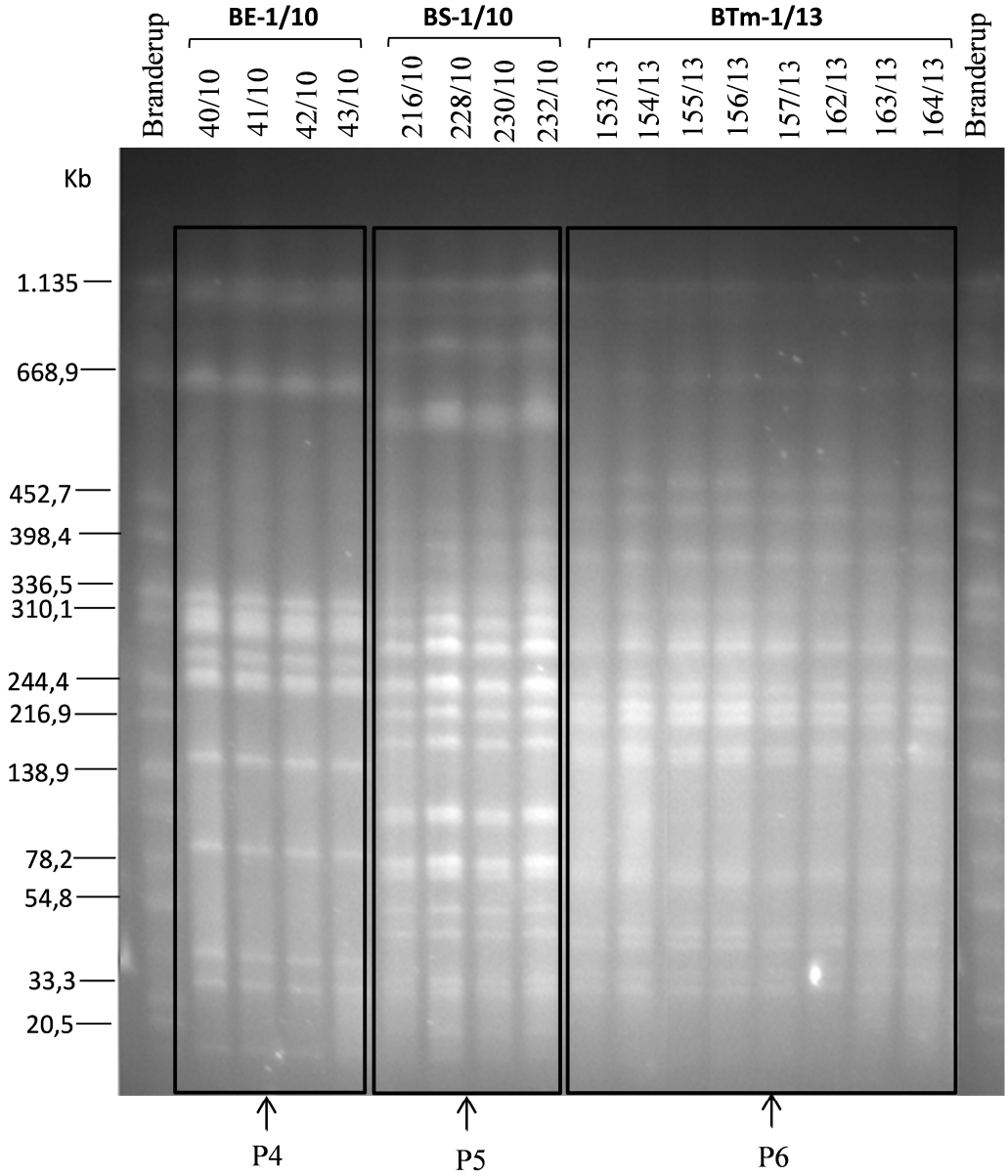

Figura 28. Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de *S. enterica*. Calles 1 y 18, DNA de *S. enterica* serovar Branderup H9812 digerido con XbaI; 2-5, perfiles de los aislamientos de *S.* Enteritidis causantes del brote BE-1/10; 6-9, perfiles de los aislamientos de *S. enterica subsp. salamae* causantes del brote BS-1/10; 10-17, perfiles de los aislamientos de la variante monofásica de Typhimurium causantes del brote BTm-1/13.

Los aislamientos de *S.* Paratyphi variante Java BPJ-1/10 y BPJ-2/12 se agruparon en dos perfiles, P1 y P2, incluyendo cada uno de ellos los dos aislamientos causantes de cada uno de ellos. Los asilamientos de *S.* Infantis (brote BI-1/12) y de la variante monofásica de *S.* Typhimurium (brote BTm-1/13), compartieron los perfiles P3 y P6

respectivamente. Los aislamientos causantes de los tres brotes de *S.* Enteritidis, BE-1/10, BE-2/10 y B-3/11 (resultados no mostrados), presentaron el mismo perfil P4.

Como era esperable, los aislamientos asociados a un mismo brote mostraron perfiles idénticos. Los causados por Paratyphi B variedad Java pueden atribuirse a dos cepas diferentes, con perfiles P1 y P2 y los de Enteritidis a tres cepas que no pudieron distinguirse con esa técnica pero si en cuanto a perfil de resistencia o plasmídico.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se caracterizaron 8 brotes de transmisión alimentaria (3 familiares, 4 comunitarios y uno desconocido) que ocurrieron en el Principado de Asturias durante el periodo 2010-2013. 7 fueron causados por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (serotipos Enteritidis, Paratyphi B variedad Java, Infantis, y variante monofásica de Typhimurium) y uno por S. *enterica* subespecie *salamae*.

2. Los aislamientos de la subespecie *salamae* y los Enteritidis implicados en uno de los tres brotes asociados con este serotipo fueron sensibles a 9 antimicrobianos ensayados. Los aislamientos de Enteritidis causantes de los otros dos brotes fueron resistentes a ácido nalidíxico debido a una mutación en el gen que codifica la subunidad A del enzima DNA girasa. Los aislamientos de Paratyphi B variedad Java, Infantis fueron resistentes a estreptomicina asociada al gen *strB*

3. Los aislamientos de la variante monofásica de Typhimurium presentaron resistencia a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina, debido a los genes $bla_{\text{TEM-1}}$, *strA-strB*, *sul2*, *sul3* y *tet*(B), localizado este último en un transposón Tn*10* defectivo. A excepción del gen *sul3* estas características coinciden con las del clon europeo de dicha variante, ampliamente distribuido en numerosos países.

4. Los aislamientos de Enteritidis implicados en los tres brotes contienen el plásmido de virulencia pSEV (60 kb) específico de dicho serotipo, acompañado por otro de pequeño tamaño (7 kb) en un brotes.

5. El análisis de los aislamientos por macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante reveló 6 perfiles. Cinco de ellos se asociaron a un único brote mientras que el sexto fue compartido por los aislamientos de Enteritidis causantes de los tres brotes.

6. Los dos brotes de Paratyphi B variedad Java y los tres brotes de Enteritidis fueron originados por diferentes cepas.

Abreviaturas

AMP	Ampicilina.
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
B	Brote.
CG	Casetes Génicas.
CHL	Cloranfenicol.
CIP	Ciprofloxacina.
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute.
CNE	Centro Nacional de Epidemiología.
CNM	Centro Nacional de Microbiología.
CR	DNA cromosómico.
dDNTPs	Desoxirribonucleótidos.
E	Enteritidis
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
EGM	Elementos Genéticos Móviles.
EMB	Eosin Methylene Blue Agar.
GEN	Gentamicina.
I	Infantis.
IT	Resistencia Intermedia.
LA	Agar Luria-Bertani.
LB	Caldo Luria-Bertani.
LSP	Laboratorio de Salud Pública.
MH	Mueller-Hinton.

N	Número de aislamientos.
NAL	Ácido nalidíxico.
O	Susceptibilidad.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORFs	Pautas de lectura abiertas.
Pb	Pares de bases.
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de a Polimerasa).
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Gel de Electroforesis de Campo Pulsado).
PJ	Paratyphi B variante Java.
R	Resistencia.
S	*Salamae*.
STR	Estreptomicina.
SUL	Sulfonamida.
TET	Tetraciclina.
Tm	Variante monofásica de Typhimurium.
TMP	Trimetropin.
Tn	Transposón.
UE	Unión Europea.

Bibliografía

Agasan, A., J. Kornblum, G. Williams, C.C. Pratt, P. Fleckenstein, M. Wong, A. Ramon. 2002. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4, 5, 12:i:- strains causing foodborne infections in New York City. Journal of Clinical Microbiology, **40**. 1924-1929.

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., S.B. Levy. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**: 1037-1050.

Arlet, G. and A. Philippon. 1991. "Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB)." FEMS Microbiol Lett **66**(1): 19-25.

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. 2004. From pieces to paterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. Nat. Rev. Microbiol. **2**: 510-8**.**

Baquero, F., C. Álvarez-Ortega, J.L. Martínez. 2009. Ecology and evolution of antibiotic resistance. Environ Microbiol Rep **1**: 469-476.

Bennett, P.M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br J Pharmacol **153**: 347-357.

Brenner, F. W., R. G. Villar, *et al*. 2000. "*Salmonella* nomenclature." J Clin Microbiol **38**(7): 2465-2467.

Buckley, M. 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem. 1-32. American Academy of Microbiology. Ed Washington DC, USA.

Cantón, R., TM. Coque, F. Baquero. 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.

Carattoli, 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.

Chiu, C. H. and J. T. Ou 1996. "Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *inv*A and *spv*C, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay." J Clin Microbiol **34**(10): 2619-2622.

Chu, C., C. H. Chiu, *et al.* 2001. "Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis." Antimicrob Agents Chemother **45**(8): 2299-2303.

Corral, J.L. y E.J. Perea. 1992. *Salmonella*. En: Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica. E. J. Perea (ed.). Ed. Dogma, Barcelona. Pp. 647-61.

Crump, J.A., E.D. Mintz. 2010. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. Clin Infect Dis **50**(2):241-6.

Finlay, B. B. and S. Falkow 1989. "Common themes in microbial pathogenicity." Microbiol Rev **53**(2): 210-230.

García, P., B. Guerra, *et al*. 2011. "IncA/C plasmids mediate antimicrobial resistance linked to virulence genes in the Spanish clone of the emerging *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i." J Antimicrob Chemother **66**(3): 543-549.

Garrity, G.M., J.A. Bell y T.G. Lilburn. 2004. Taxonomic outline of Prokariotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2ª edición. Releae 5.0., Springer-Verlag, New York. pp: 79-122.

Gledel, J. 1995. En: Microbiologia Alimentaria. C. M. Bourgeois, J. F. Mescle y J. Zucca (eds). Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 53-66.

Guerra, B., S. Soto, *et al*. 2000. "Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes." Antimicrob Agents Chemother **44**(8): 2166-2169.

Guerra, B., S. Soto, *et al*. 2001. "Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]." Antimicrob Agents Chemother **45**(4): 1305-1308.

Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth, y M. C. Mendoza. 2004. Characterization and localization of drug resistance determinats in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. Microb Drug Resist **10**:83-91.

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.

Fluit, A.C., FJ. Schmitz. 2004. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect. **10**:272-288.

Herrera-Leon, S., J. R. McQuiston, *et al*. 2004. "Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp." J Clin Microbiol **42**(6): 2581-2586.

Herrero, A., M. R. Rodicio, *et al*. 2008. "*Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): a new multidrug-resistant group endemic in Spain." Int J Med Microbiol **298**(3-4): 253-261.

Jackson, R. W., B. Vinatzer, D. L. Arnold, S. Dorus, y J. Murillo. 2011. The influence of the accessory genome. Mobile Genetic Elements **1**:55-65.

Kado, C.I., S. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol. **145**:1365-1373.

Liebert, C. A., R. M. Hall, y A. O. Summers. 1999. Transposon Tn*21*, flagship of the floating genome. Microb Mol Biol Rev **63**:507-522.

Livermore, D. M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin. Infect. Dis. **36**: S11-23.

Lucarelli, C., A. M. Dionisi, E. Filetici, S. Owczarek, I. Luzzi, y L. Villa. 2012. Nucleotide sequence of the chromosomal region conferring multidrug resistance (R-type ASSuT) in *Salmonella* Typhimurium and monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. J. Antimicrob Chemother **67**:111-114.

Madigan, M. T., M. J. Martinko y M. John. 1998- En: Brock. Biología de los Microorganismos. 8ª edición Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. Págs: 807.

Madsen, A., C. Westphal, *et al*. 2000. "Characterization of a novel plasmid-encoded HsdS subunit, S.LlaW12I, from *Lactococcus lactis* W12." Plasmid **44**(2): 196-200.

Martínez, N., M.C. Mendoza, B. Guerra, M.A. González-Hevia, M.R. Rodicio. 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, N., M. C. Mendoza, I. Rodriguez, S. Soto, M. Bances, y M. R. Rodicio. 2007. Detailed structure of integrons and transposons carrieda by arge conjugative plasmids responsable for multidrug resistance in diverse genomic types of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg. J. Antimicrob Chemother **60**:1227-1234.

Martínez-Martínez, L., Ruiz de Alegría, C. 2009. *Escherichia coli* resistente a gentamicina y sensible a amikacina. Atlas del Antibiograma. 141-143. Biomérieux University.

Mazel, D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol **4**:608-620.

McClelland, M., K. E. Sanderson, *et al*. 2001. "Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2." Nature **413**: 852-856.

Meltzer, E., y E. Schwart. 2010. Enteric fever: a travel medicine oriented view. Current opinion in infectious diseases **23**:432-437.

Miller, S.l. y D.A. Pegues. 2000. *Salmonella* species, including *Salmonella Typhi*. En: Principles and Practice of infectious diseases. Mandell, Douglas y Bennett. 5º edición. Ed. Churchill Livingstone, Filadelfia. pp. 2345-62.

Miriagou, V., A. Carattoli, *et al*. 2006. "Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids." Microbes Infect **8**(7): 1923-1930.

Morsczeck, C., D. Langendorfer, *et al*. 2004. "A quantitative real-time PCR assay for the detection of *tet*R of Tn*10* in *Escherichia coli* using SYBR Green and the Opticon." J Biochem Biophys Methods **59**(3): 217-227.

Mossel, D.A., B. Moreno, C. B. Struijk. 2002. Microbiología de los alimentos. 2ª edición. Ed. Acribia, Zaragoza.

Mossong, J., P. Marques, C. Ragimbeau, P. Huberty-krau, S. Losch, G. Meyer, G. Moris, C. Strottner, W. Rabsch, F. Schneider. 2007. Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:- in Luxembourg, 2006. Euro surveill. 2007; **12**(6):pii=719.

Mulvey, M. R., D. A. Boyd, *et al*. 2006. "The genetics of *Salmonella* genomic island 1." Microbes Infect **8**(7): 1915-1922.

Ng, L. K., M. R. Mulvey, *et al*. 1999. "Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104." Antimicrob Agents Chemother **43**(12): 3018-3021.

Nugent, R., E. Back, A. Beith. 2010. The race against drug resistance. A report of the Center for Global Development´s Drug Resistance Working Group.

Orden Gutiérrez, J. A. y R. de la Fuente López. 2001. Repercusiones en salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. Rev Esp Salud Pública; **75**(4): 313-320

Partridge, S.R., Tsafnat, G., E. Coiera, J.R. Iredell. 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.

Perreten, V. and P. Boerlin 2003. "A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland." Antimicrob Agents Chemother **47**(3): 1169-1172.

Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, *et al*. 2004. "Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme." Res Microbiol **155**(7): 568-570.

Raffatellu, M., D. Chessa, R.P. Wilson, C. Tukel, M. Akcelik, A.J. Baümler. 2006. Capsule mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. Infect Immun **74**: 19-27.

Raguenaud ME, S. Le Hello, S. Salah, FX. Weill, A. Brisabois, G. Delmas, P. Germonneau. 2012. Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic Salmonella Typhimurium 4,5,12:i:- in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010. Euro Surveill. 2012;**17**(40):pii=20289.

Recchia, G. D. y R. M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology **141**: 3015-3027.

Roberts, A.P., M. Chandler, P. Courvalin, G. Guédon, P. Mullany, T. Pembroke, J.I. Rood, C.J. Smith, A.O. Summers, M. Tsuda, D.E. Berg. 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. Plasmid **60**: 167-173.

Rodríguez, I., M. R. Rodicio, *et al*. 2006. "Large conjugative plasmids from clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non-integron-associated drug resistance determinants." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1603-1607.

Sambrock, J. y D. W. Russel. 2001. Molecular clonning: A Laboratory Manual. 3ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sandvang, D., F. M. Aarestrup, *et al*. 1997. "Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104." FEMS Microbiol Lett **157**(1): 177-181.

Stokes, H.W., R.M. Hall. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol **3**: 1669-1683.

Threlfall, E. **J**. 2000. Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone. J Antimicrob Chemother **46**:7-10.

Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., Euzeby, J.P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol. **55**:521-524.

Wagner, A. 2006. Cooperation in fleeting in the world of transposable elements.PLoS Comput Biol2, 162.

Walker, R. A., E. Lindsay, M. J. Woodward, L. R. Ward, y E. J. Threlfall. 2001. Variation in clonality and antibiotic resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage-type U302 (MR U302) from humans, animals, and foods. Microb Drug Resist **7:**13-21.

Yamamoto, S. **y K. Kutsukake.** 2006. FlijA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagelar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. **188**:958-67.

http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf (1/04/2014).