

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Tipificación molecular de aislamientos
de *Salmonella enterica* serotipo Derby
obtenidos de muestras clínicas y de alimentos
en el Principado de Asturias durante los años
2013-2014. Comparación con años anteriores”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

Rocío Granda Díaz

Julio, 2015



AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

En primer lugar quisiera agradecerle a la Dra. M^a del Rosario Rodicio Rodicio la oportunidad que me ha dado, por aceptarme en su laboratorio y ayudarme en todo lo que he necesitado en todo momentos para llevar a cabo este proyecto.

Gracias a Raquel y Vane por vuestra gran ayuda e infinita paciencia. Por segundo año consecutivo, he tenido la suerte de estar aprendiendo con vosotras.

A las dos personas más importantes en mi vida, mi madre y mi novio, gracias por tirar de mí cuando más lo necesito, por creer en mí y apoyarme siempre en todo lo que hago.

A Eli y Julio, porque para mí sois como mis segundos padres.

A Tati y Natalia, gracias por esos grandes fines de semana que pasamos riéndonos hasta las tantas y arreglando el mundo.

A Vero y Ana, gracias por escucharme y ayudarme a desconectar cuando más lo necesito.

Y a mis compañeros del máster, ha sido un año duro, pero gracias a vosotros ha sido mucho más ameno y llevadero. Gracias por las risas y los buenos momentos a la hora del café.

Gracias a la vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	V
INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Derby	3
Objetivos.....	5
CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	6
El género <i>Salmonella</i>	6
Patogenicidad.....	9
Cuadros clínicos.....	9
Resistencia a antimicrobianos.....	11
Elementos genéticos móviles.....	13
Métodos de tipificación.....	16
MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	20
Datos de procedencia de los aislamientos.....	20

Medios de cultivo.....	20
Siembra de bacterias y conservación.....	21
Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos.....	22
Reacción en cadena de la polimerasa.....	24
Análisis plasmídico.....	28
Macrorrestricción – Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
Determinación de la sensibilidad/resistencia frente a antimicrobianos.....	33
Detección de genes de resistencia.....	36
Detección de elementos genéticos móviles.....	38
Detección de plásmidos.....	40
Macrorrestricción y electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	42
Comparación de los aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby del periodo 2013 - 2014 con los aislamientos del mismo serotipo correspondientes a los años 2008 – 2012.....	43
Comparación de los aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby procedentes de derivados cárnicos.....	44
Comparación de los aislamientos clínicos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby.....	46
CONCLUSIONES.....	49

BIBLIOGRAFÍA..... 50

RESUMEN

La importancia de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Derby (*S.* Derby) radica en el hecho de que es uno de los serotipos predominantes en el ganado porcino. Por ello puede transmitirse fácilmente a los seres humanos a través de la cadena alimentaria, debido al frecuente consumo de derivados cárnicos procedentes del cerdo.

En este contexto, el presente trabajo se ha centrado en la tipificación molecular y búsqueda de resistencias frente a diferentes antimicrobianos (ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim) en 7 aislamientos de *Salmonella* Derby obtenidos de muestras clínicas en diferentes hospitales de Asturias, así como de diferentes derivados cárnicos, durante los años 2013 y 2014.

Los 7 aislamientos se analizaron por macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante, utilizando la endonucleasa XbaI. Todos ellos compartieron el mismo perfil, que ya se había detectado en estudios previos en nuestro laboratorio para el mismo serotipo. Los 7 aislamientos presentaron resistencia a estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclinas, codificadas por los genes *aadA1*, *sul1* y *tet(A)*, respectivamente. Los resultados obtenidos apoyan la asociación del gen *tet(A)* con el transposón Tn1721 y la localización de los genes *aadA* y *sul1* en integrones de clase 1. El análisis plasmídico reveló 3 perfiles diferentes que incluyen plásmidos de pequeño tamaño (entre 2 y 6 pb aproximadamente). Aislamientos con idénticas o similares características se encontraron previamente en canales de cerdo y derivados cárnicos, apoyando la transmisión de *S.* Derby a lo largo de la cadena alimentaria.

ABSTRACT

Relevance of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Derby (*S. Derby*) lies in the fact that it is one of the predominant serotypes in pigs. Therefore it can be easily transmitted to humans through the food chain due to the frequent consumption of meat products from pork.

In this context, this project has been focused on the molecular characterization and the search for resistance against different antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, nalidixic acid, streptomycin, sulfonamides, tetracycline and trimethoprim) in 7 Derby *Salmonella* isolates obtained from clinical specimens from different hospitals of Asturias, as well as various meat products, from 2013 to 2014.

Seven isolates were analyzed by macrorestriction-electrophoresis in pulsed-field electrophoresis by using XbaI endonuclease. It was found the same profile for all of them, which matches with previous studies carried out by our laboratory with the same serotype. The 7 isolates were resistant to streptomycin, sulphonamides and tetracyclines, encoded by genes *aadA1*, *sull* y *tet(A)*, respectively. The results support the association of the *tet(A)* gene with the transposon Tn1721 and the location of the *aadA* and *sull* genes in class 1 integrons. Plasmid analysis revealed 3 different profiles including small size plasmids (2 to 6 kb approximately). Isolates with identical or similar features previously found on pig carcasses and meat products, supporting the transmission of *S. Derby* along the food chain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales alimentos implicados en la distribución de <i>Salmonella</i> en el hombre	1
Figura 2. Evolución de Salmonelosis en España desde 1993 hasta 2011	2
Figura 3. Morfología de <i>Salmonella</i>	6
Figura 4. Antígenos presentes en el género <i>Salmonella</i>	8
Figura 5. Pared celular de una bacteria Gram negativa con el antígeno O.....	8
Figura 6. Esquema de la invasión de la mucosa intestinal por <i>Salmonella</i>	11
Figura 7. Principales mecanismos de adquisición de resistencia a antimicrobianos.....	12
Figura 8. Representación de un transposón simple y de uno compuesto.....	14
Figura 9. Organización general de un integrón y mecanismo de recombinación de las casetes génicas (GC).....	16
Figura 10. Esquema de análisis mediante la técnica de MLST	19
Figura 11. Esquema de siembra por agotamiento.....	22
Figura 12. Placa de Mueller Hinton inoculada con una bacteria sobre la cual se colocaron discos de antimicrobianos.....	23
Figura 13. Termociclador Gene Amp PCR system.....	27
Figura 14. Fases de la reacción de amplificación por PCR.....	31

Figura 15. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante.....	31
Figura 16. Esquema del procedimiento de macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante.....	32
Figura 17. Amplificación del gen <i>tet(A)</i>	36
Figura 18. Amplificación del gen <i>sul</i>	37
Figura 19. Amplificación del gen <i>aadA</i>	37
Figura 20. Amplificación del gen de la transposasa de Tn1721.....	39
Figura 21. Amplificación del gen <i>Int1</i>	39
Figura 22. Contenido plasmídico de los aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby...	41
Figura 23. Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby.....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de Salmonella Typhimurium y Salmonella Derby en la UE en 2008.....	4
Tabla 2. Principales métodos para la extracción de plásmidos y sus aplicaciones.....	18
Tabla 3. Aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby utilizados en este estudio.....	20
Tabla 4. Criterios empleados para la interpretación de los resultados del antibiograma.....	24
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la identificación de genes de resistencia en los aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby.....	25
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la detección de integrones de clase 1 y de los transposones Tn10 y Tn1721 en los aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby.....	26
Tabla 7. Componentes de las mezclas de la reacción de PCR.....	26
Tabla 8. Antimicrobianos empleados en el estudio.....	33
Tabla 9. Perfiles de resistencia de 7 aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby procedentes de heces y productos cárnicos.....	35
Tabla 10. Aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby procedentes de productos cárnicos del periodo comprendido entre 2008 y 2014.....	45
Tabla 11. Aislamientos de <i>S. enterica</i> serotipo Derby procedentes de muestras clínicas del periodo comprendido entre 2008 y 2014.....	48

INTRODUCCIÓN

Entre los patógenos más ubicuos que nos podemos encontrar en la naturaleza se encuentran los serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*.

Generan un cuadro clínico denominado salmonelosis. Dichos serotipos se hallan por detrás únicamente de *Campylobacter*, en cuanto a los patógenos zoonóticos más importantes distribuidos a nivel mundial y cuyo origen se asocia a los alimentos que ingerimos.

Los serotipos de *Salmonella* se encuentran en múltiples carnes procedentes de ave, ganado vacuno y porcino, derivados cárnicos (chorizos, salchichas, hamburguesas, etc.), así como otros alimentos de origen animal como son los huevos, leche y sus derivados. (Figura 1). Puesto que se encuentran en alimentos tan básicos, no es de extrañar que se produzcan gran cantidad de casos si no se llevan a cabo unas mínimas condiciones de higiene, a la hora de la preparación de estos productos. Los casos de salmonelosis encontrados suelen ir asociados a fallos a nivel industrial, como son: introducción de la bacteria en las zonas de preparación del alimento, inadecuadas temperaturas de almacenamiento, cocción inadecuada o contaminación cruzada.

Sin embargo, también se puede transmitir por contacto directo con animales o humanos infectados o con materiales contaminados con heces.

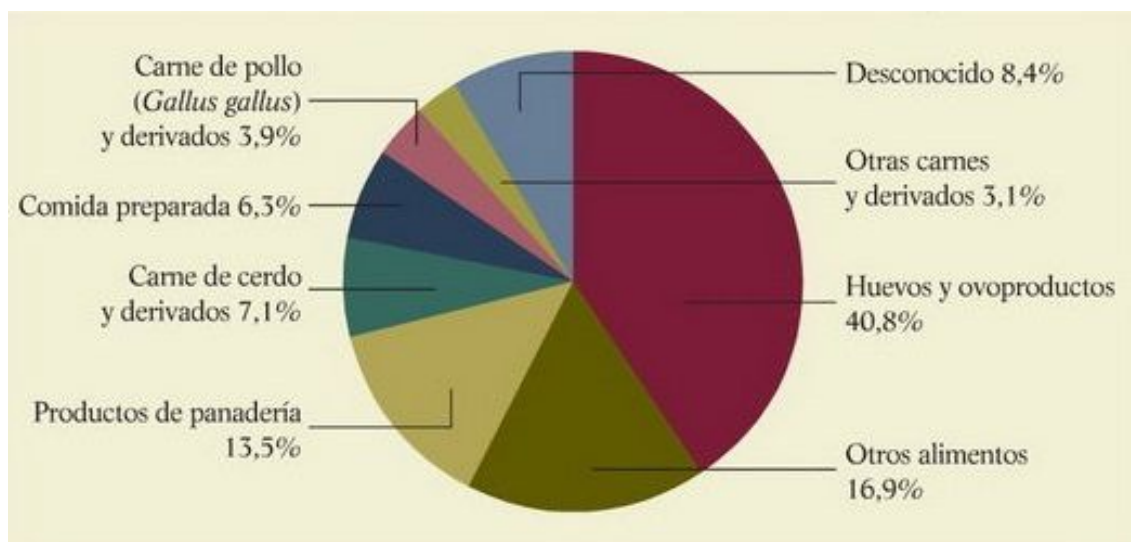


Figura 1. Principales alimentos implicados en la distribución de *Salmonella* en el hombre.

Según datos aportados por EFSA (European Food Safety Authority) en el año 2011 se comunicaron 97.897 casos de salmonelosis humana, constituyendo el 19,3% de las gastroenteritis detectadas en la UE en 2013 (EFSA, 2015).

No obstante, cabe destacar que los casos de salmonelosis se encuentran en continuo descenso debido a las estrictas políticas de control llevadas a cabo por la UE en los últimos años. Así pues, en diciembre del 2000 se publicó el Libro blanco sobre seguridad alimentaria, que fue la base de una serie de mejoras legislativas organizativas y de coordinación entre Estados Miembros. Se publicó la Directiva 2003/99/CE de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis, y el Reglamento (CE) 2160/2003 sobre el control de *Salmonella* y otros agentes zoonóticos transmitidos por alimentos. En España, el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) coordina el informe anual de fuentes y tendencias de zoonosis y agentes zoonóticos que se utiliza para elaborar el informe europeo que publica la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC). Al igual que ocurre en la Unión Europea, *Salmonella* es el segundo agente más común implicado en brotes de origen alimentario y causante de infecciones gastrointestinales en nuestro país, cuya disminución se ha ido observando desde 2003 (Figura 2).

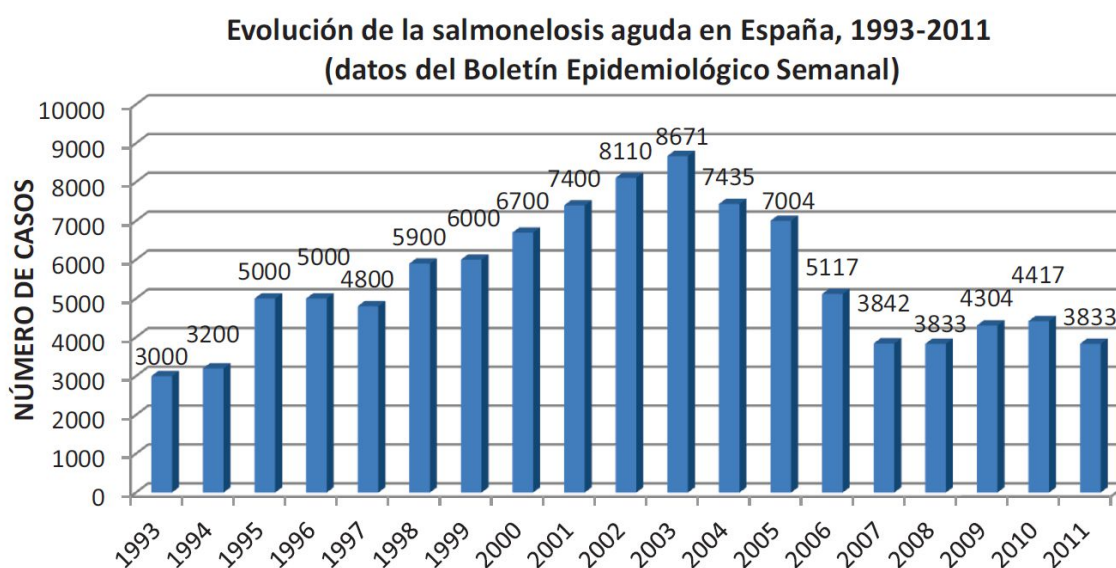


Figura 2. Evolución de Salmonelosis en España desde 1993 hasta 2011.

***Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Derby**

S. enterica subsp. *enterica* serotipo Derby (*S. Derby*), cuya fórmula antigénica es 1,4,[5],12:f,g:[1,2], es uno de los serotipos predominantes en ganado porcino. En cerdos, la infección por *S. Derby* es a menudo subclínica, aunque en algunos casos puede mostrar una amplia gama de signos clínicos que van desde diarrea leve hasta septicemia aguda y muerte. La bacteria se encuentra localizada normalmente en la faringe, los ganglios linfáticos, el intestino y las heces de estos animales, y se puede transmitir a la carne durante el sacrificio y evisceración. Por lo tanto, además de su repercusión en la ganadería porcina, la importancia de la infección por *S. Derby* en cerdos radica en su potencial de transmisión a seres humanos a través de la cadena alimentaria.

Con el fin de limitar la incidencia de la salmonelosis humana la legislación de la Unión Europea estableció una serie de objetivos de reducción de *Salmonella* en poblaciones de cerdos de abasto. Para sustentar tal objetivo se llevó a cabo un estudio de la prevalencia de cerdos infectados por *Salmonella*. El estudio fue realizado en 2008, periodo en el que se analizaron al azar tanto cerdos destinados a reproducción como a consumo, en cada uno de los estados miembros participantes. Para ello se recogieron muestras fecales, procediendo a su serotipado. Se encontraron 54 y 88 serotipos en cerdos destinados a reproducción y a producción, respectivamente. En ambos casos, *S. Typhimurium* y *S. Derby* fueron los más comunes (EFSA, 2009). (Tabla 1)

S. Derby fue el quinto serovar más común en 2013, con 818 casos reportados en humanos por los países de la UE. En cuanto a las resistencias halladas, las más comunes resultaron ser a sulfonamidas y tetraciclinas (52,3% y 46,6%, respectivamente). La resistencia a nuevos antimicrobianos, como es por ejemplo a cefotaxima (cefalosporina de tercera generación) fue alta, con el 5,4% en comparación con un 1,4% para *Salmonella* spp. Sin embargo, esto se basó en un pequeño número de aislamientos (EFSA 2015).

Tabla 1. Prevalencia de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y *Salmonella enterica* serotipo Derby en la UE en 2008.

Member State	N ^(a)	<i>Salmonella</i>		<i>S. Typhimurium</i>		<i>S. Derby</i>		<i>Salmonella</i> other than <i>S. Typhimurium</i> and/or <i>S. Derby</i> ^(d)	
		% prev.	95%CI ^(a)	% prev.	95%CI	% prev.	95%CI	% prev.	95%CI
Austria	173	5.8	3.2-10.3	0	0.0-2.1	0.6	0.1-3.2	5.2	2.8-9.6
Belgium	209	36.4	30.5-43.1	11.0	7.6-15.9	10.0	6.8-14.8	21.5	16.7-27.6
Bulgaria	25	0	0.0-13.5	0	0.0-13.5	0	0.0-13.5	0	0.0-13.5
Cyprus	60	18.3	13.8-26.4	0	0.0-4.6	8.3	5.7-14.9	8.3	5.7-14.9
Czech Republic	161	15.5	10.9-21.9	2.5	1.0-6.1	3.7	1.8-7.8	11.2	7.4-17.0
Denmark	198	41.4	35.2-48.4	12.6	8.9-17.9	14.6	10.6-20.2	18.7	14.1-24.7
Estonia	28	3.6	3.6-3.6	0	0.0-0.0	0	0.0-0.0	0	0.0-0.0
Finland	157	0	0.0-2.1	0	0.0-2.1	0	0.0-2.1	0	0.0-2.1
France	186	38.7	32.2-46.0	3.2	1.5-6.9	20.4	15.4-26.9	19.9	14.9-26.3
Germany	155	20.6	15.2-27.8	3.2	1.4-7.3	8.4	5.0-13.9	9.0	5.5-14.7
Hungary	141	27.7	22.1-34.6	1.4	0.6-4.5	12.8	8.9-18.6	14.2	10.1-20.2
Ireland	149	47.7	42.3-53.8	17.4	13.8-22.6	13.4	10.2-18.4	26.2	21.6-32.1
Italy	171	43.9	36.9-51.5	5.8	3.3-10.4	12.3	8.3-18.1	11.7	7.8-17.4
Latvia	28	28.6	20.5-41.0	0	0.0-7.7	3.6	2.6-12.8	25.0	17.9-38.5
Lithuania	72	8.3	7.1-12.9	0	0.0-2.4	0	0.0-2.4	8.3	7.1-12.9
Luxembourg	41	22.0	22.0-22.0	2.4	2.4-2.4	17.1	17.1-17.1	7.3	7.3-7.3
Netherlands	212	55.7	49.4-62.2	8.0	5.2-12.4	17.0	12.8-22.5	42.5	36.4-49.2
Poland	178	9.6	6.1-14.8	1.7	0.6-4.8	2.8	1.2-6.4	5.1	2.7-9.4
Portugal	134	43.3	35.6-52.0	13.4	8.8-20.3	5.2	2.6-10.4	29.9	23.0-38.2
Slovakia	96	18.8	12.6-27.7	3.1	1.2-8.7	4.2	1.8-10.1	13.5	8.3-21.8
Slovenia	87	10.3	5.7-18.7	0	0.0-4.1	1.1	0.3-6.2	10.3	5.7-18.7
Spain	209	53.1	46.6-60.0	12.4	8.7-17.7	6.7	4.1-10.9	42.6	36.3-49.5
Sweden	150	0	0.0-2.4	0	0.0-2.4	0	0.0-2.4	0	0.0-2.4
United Kingdom	191	44.0	37.8-50.9	9.9	6.7-14.8	11.0	7.5-16.0	31.9	26.3-38.7
European Union	3,050 ^(f)	33.3	30.9-35.7	6.6	5.3-7.9	9.0	7.6-10.5	21.6	19.5-23.6
Norway	143	0	0.0-2.5	0	0.0-2.5	0	0.0-2.5	0	0.0-2.5
Switzerland	154	11.7	7.9-17.3	1.9	0.7-5.2	1.9	0.7-5.2	7.8	4.9-12.8

Objetivos de estudio

Teniendo en cuenta la importancia de *S. Derby* como patógeno de seres humanos y de animales, el presente trabajo fin de Máster se centró en la caracterización de aislamientos de este serotipo procedentes de muestras clínicas y productos cárnicos, obtenidos en Asturias durante el periodo 2013-2014.

Los objetivos abordados fueron los siguientes:

1. Estudiar la susceptibilidad o resistencia a diferentes agentes antimicrobianos e identificar los genes responsables mediante amplificación por PCR.
2. Rastrear y caracterizar elementos génicos móviles que pudieran contribuir a dicha resistencia, como es el caso de los plásmidos, transposones e integrones.
3. Tipificar los aislamientos de *S. Derby* mediante digestión del genoma con el enzima de restricción XbaI seguida de electroforesis de campo pulsante (PFGE).
4. Comparar los aislamientos clínicos de *S. Derby* con aislamientos del mismo serotipo procedentes de muestras clínicas, canales de cerdo y de alimentos cárnicos, previamente caracterizados en nuestro laboratorio y procedentes de estudios anteriores.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

El Género *Salmonella*

Los miembros del género *Salmonella* (Figura 3) causan una serie de enfermedades muy bien caracterizadas en la actualidad, que van desde procesos asintomáticos a fiebres tifoideas graves. En los países desarrollados, las infecciones por este microorganismo se asocian al consumo de alimentos contaminados y comúnmente producen gastroenteritis o enterocolitis. Sin embargo, en ocasiones se producen casos de fiebres tifoideas, paratifoideas y entéricas (Dekker & Frank, 2015).



Figura 3. Morfología de *Salmonella* (Foto obtenida de <http://newsucluze.hol.es/salmonella/salmonella.html>)

El género *Salmonella* pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales* y Clase γ -*Proteobacteria*. Son bacilos Gram negativos de flagelación peritrica que no forman endosporas. Estas células quimiorganotrofas tienen normalmente un tamaño que oscila entre las 0,7-1,5 μm x 2,0-5,0 μm y una temperatura óptima de crecimiento de 37°C (mesófilos), aunque pueden crecer en temperaturas de 7-48°C. Su pH óptimo se encuentra entre 6,5 y 7,5. En lo referente a su actividad hídrica, su máximo crecimiento se obtiene cuando se sitúa en valores próximos a 0,995 (Ellermeier & Slauch, 2006).

Se caracterizan además, por ser anaerobias facultativas, presentando tanto metabolismo respiratorio como fermentativo. Los miembros de este género, tienen la capacidad de fermentar glucosa dando lugar a gas en el proceso, pero no otros

carbohidratos como lactosa (con alguna excepción) o sacarosa, por lo que se incluyen en el grupo de no coliformes.

Son microorganismos citocromo c oxidasa negativos y producen enzima catalasa, descarboxilan la lisina y la ornitina, producen sulfuro de hidrógeno, no hidrolizan la urea y son capaces de tolerar niveles elevados de sales biliares.

Actualmente, sigue existiendo controversia en cuanto a la clasificación de este microorganismo siendo la opción más aceptada aquella que divide el género *Salmonella* en dos especies; *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* se divide en seis subespecies; *S. enterica* (subsp. I), *salamae* (subsp. II) *arizonae* (subsp. IIIa), *diarizonae* (subsp. IIIb), *houtenae* (subsp. IV), e *indica* (subsp. VI). Por otro lado, *S. bongori* incluye únicamente la subespecie V. Se considera que *S. enterica* subsp. I es responsable del 99% de las infecciones en seres humanos (Ellermeier & Schlauch, 2006; Grimont & Weill, 2007).

La presencia de *Salmonella* es muy común como comensal en el tracto digestivo de animales de sangre caliente, siendo el lugar donde se encuentra *S. enterica* subsp. *enterica*. Sin embargo, también puede darse en animales de sangre fría, siendo en este caso más frecuente la presencia de *S. bongori* y las demás subespecies de *S. enterica*.

El análisis de la estructura antigénica de *Salmonella* nos permite llevar a cabo el serotipado, lo que da lugar a la clasificación en serogrupos y serotipos. En la actualidad se han establecido 67 serogrupos y más de 2600 serotipos. Para ello se estudian tres antígenos presentes en *Salmonella* (Figura 4): el antígeno somático O, el antígeno flagelar H y el antígeno capsular Vi. Este estudio debe realizarse una vez que el microorganismo ha sido clasificado como perteneciente al género, ya que si no, debido a las posibles reacciones cruzadas de los anticuerpos empleados en el proceso, puede arrojar resultados erróneos (Widdel et al., 2006).

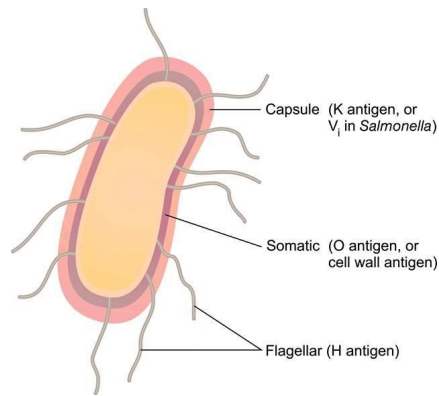


Figura 4. Antígenos presentes en el género *Salmonella*.

- (Figura 5) corresponde al lipopolisacárido (LPS) que forma parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Esta estructura juega un papel fundamental en la interacción microorganismo-huésped durante el proceso infeccioso.

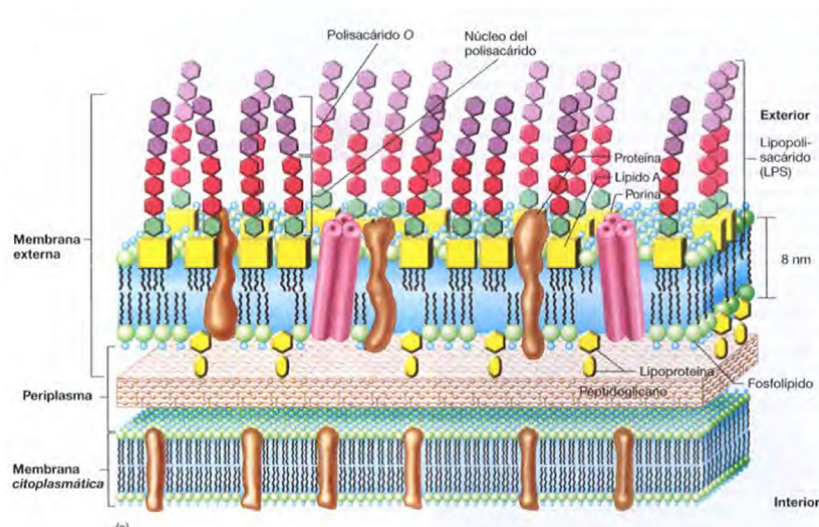


Figura 5. Pared celular de una bacteria Gram negativa con el antígeno O.

- El antígeno H se encuentra en los flagelos y corresponde a la proteína denominada flagelina que los conforma. Aunque funcionalmente sean iguales, la variedad en la estructura de la flagelina es el origen de la distinta antigenicidad, pudiendo haber células que expresen uno, dos (monofásica y bifásicas respectivamente) o hasta tres tipos diferentes.
- El antígeno Vi se puede encontrar en unos pocos miembros del género, como es el caso de Typhi y Paratyphi C entre otros. Se corresponde con la cápsula de naturaleza polisacáridica que envuelve la célula y que la protege del sistema inmune u otras amenazas.

Patogenicidad

La entrada del microorganismo en el hospedador tiene lugar a través de la ingesta de alimentos o aguas contaminadas. Existe una gran diversidad de cuadros clínicos que se desarrollan a partir de una infección por *Salmonella*, que pueden ir desde cuadros asintomáticos, gastroenteritis y enterocolitis hasta fiebres entéricas (Coburn, Grassl, & Finlay, 2007). El cuadro que se desarrolla dependerá de la sensibilidad del hospedador y de la variedad de *Salmonella* (Coburn et al., 2007).

Desde el punto de vista médico, los serotipos de *S. enterica* pueden ser clasificados en tifoideos y no tifoideos, que varían en cuanto a su adaptación a una o más especies hospedadoras (Kingsley & Bäumler, 2000). Los serotipos tifoideos (como *S. Typhi*) están restringidos a seres humanos. Los no tifoideos tienen una mayor variedad de potenciales hospedadores pudiendo afectar tanto a seres humanos como animales, aunque causando distintos síntomas (Coburn et al., 2007). Como excepción, algunos serotipos no tifoideos como *S. Gallinarum* (aves), *S. Dublin* (vacas), *S. Typhimurium* (hombre y animales) y *S. Choleraesuis* (cerdos) presentan un hospedador preferente.

Cuadros clínicos

Fiebres entéricas

Las fiebres entéricas (tifoidea y paratifoidea) son infecciones invasivas causadas por los serotipos Typhi y Paratyphi en humanos.

La infección comienza normalmente con la ingesta de alimentos o aguas contaminadas, aunque también puede deberse al contacto con personas infectadas o portadores asintomáticos. En primer lugar, es necesario que el microorganismo sobreviva a diversas líneas defensivas del hospedador, tales como el pH gástrico, las sales biliares, la microbiota normal y el peristaltismo intestinal. A continuación, *Salmonella* coloniza e invade el epitelio intestinal para dirigirse al sistema linfático, donde se multiplicarán hasta alcanzar el torrente sanguíneo. Su diseminación le permite alcanzar órganos como el bazo, el hígado o la médula ósea. La causa de muerte más común debido a los serotipos *tifoideos* se debe a la necrosis intestinal que da lugar a ulceración, peritonitis y septicemia.

Enteritis y enterocolitis

El resultado de la infección por los serotipos no tifoideos dependerá de factores tales como el propio serotipo, la vía de transmisión, la dosis infectiva y el estado del sistema inmune del hospedador.

La inflamación intestinal es, sin duda, el cuadro más común producido por los serotipos no tifoideos. El origen de estas infecciones se debe al consumo de productos alimenticios contaminados siendo los más habituales aquellos de origen animal: huevos y derivados, leche y sus derivados, carnes de aves y mamíferos contaminadas durante la evisceración y en general cualquier producto manipulado por personal portador.

Los serotipos más comunes en este tipo de dolencia son Enteritidis y Typhimurium, que causan un cuadro generalmente autolimitado de inflamación intestinal tanto a nivel de intestino delgado (enteritis) como de intestino grueso (enterocolitis).

Una vez que la bacteria ha superado las barreras físico-químicas explicadas anteriormente, alcanza el epitelio intestinal y se adhiere a su superficie gracias a sus fimbrias y adhesinas (Figura 6). El desarrollo de la respuesta inmune del hospedador desencadena una reacción inflamatoria localizada.

Una vez superadas estas barreras, la infección por *Salmonella* puede dividirse en dos fases; colonización del epitelio intestinal que suele remitir sin complicaciones y, en algunas ocasiones, una fase sistémica. A través de las fimbrias, la bacteria es capaz de adherirse a las células epiteliales de la mucosa intestinal para, a continuación, llevar a cabo la invasión de dichas células gracias a sus mecanismos de patogenicidad basados en un sistema de secreción de tipo III. La reorganización del citoesqueleto de actina permite la entrada del microorganismo al interior de la célula. Las alteraciones subsecuentes en la célula serán las responsables de la consiguiente diarrea del hospedador.

La fase sistémica puede iniciarse una vez que la bacteria alcanza la lámina propia y es fagocitada por los macrófagos, ya que ha desarrollado mecanismos para sobrevivir y multiplicarse en el interior de dichas células. En este punto, los efectos nocivos dependen en gran medida del estado del sistema inmune del hospedador, pudiendo alcanzar órganos tales como el hígado o el bazo y, aunque con menor frecuencia, incluso el corazón o los pulmones. Esto ocurre principalmente en personas inmunocomprometidas o en los extremos de edad (Barrow 1999).

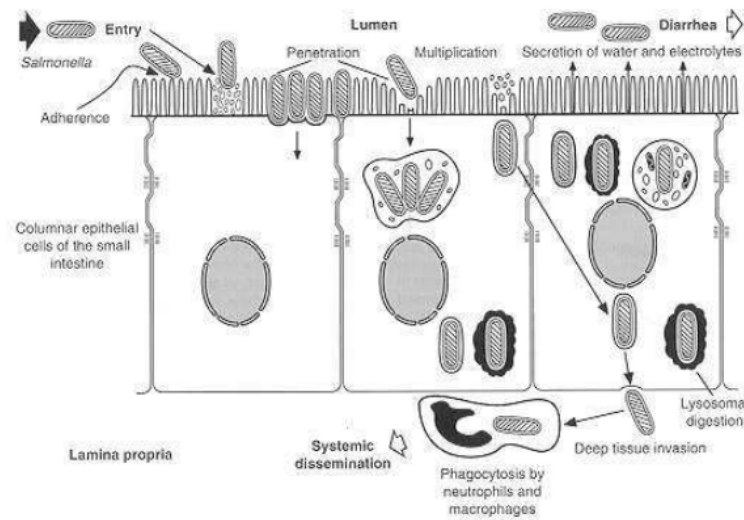


Figura 6. Esquema de la invasión de la mucosa intestinal por *Salmonella*

Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a antimicrobianos es un problema emergente tanto en lo referente a la salud humana como a la salud animal. Las bacterias debido a su gran capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia tanto a los antibióticos, los cuales son sustancias naturales generadas por los microorganismos con un fin defensivo frente a otros, como a agentes antimicrobianos obtenidos por síntesis química.

El uso abusivo de estas sustancias tanto en la medicina humana como en explotaciones animales ha dado lugar a una gran presión selectiva sobre los microorganismos, lo que ha conducido a la selección de un número cada vez mayor de resistencias a antimicrobianos.

Los mecanismos de resistencia se pueden catalogar en dos grupos en función de su origen (Figura 7). Por un lado existe una resistencia natural o intrínseca que depende de las características físico-químicas o estructurales de ciertos microorganismos. Este es el caso de la resistencia de *Escherichia coli* a vancomicina debido a que el tamaño del antibiótico es muy grande para atravesar las porinas de la bacteria. Por otro lado encontramos la resistencia adquirida, que es aquella debida a la modificación de la información genética de la bacteria. Esta modificación puede tener diversos orígenes tales como una mutación espontánea o por mecanismos de transferencia horizontal.

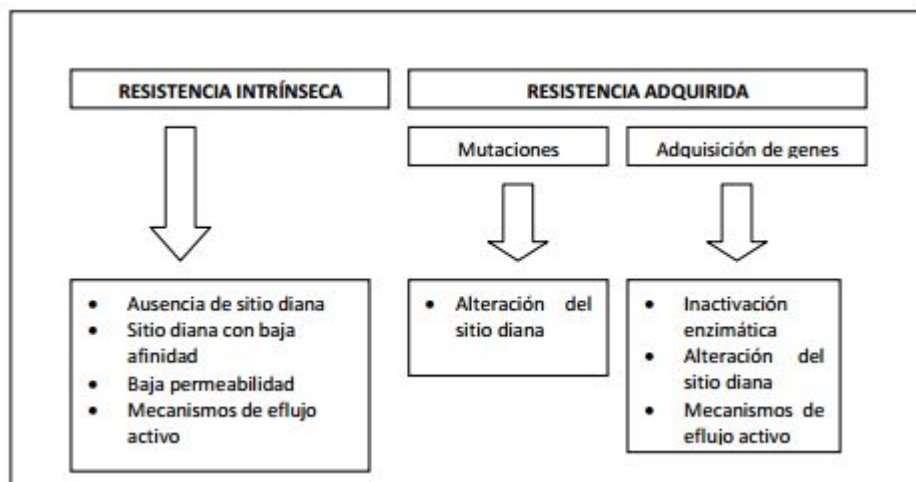


Figura 7. Principales mecanismos de adquisición de resistencia a antimicrobianos

La resistencia transmisible está mediada por plásmidos, que son elementos genéticos móviles y no esenciales, muchos de los cuales pueden pasar de una bacteria a otra gracias a los procesos de conjugación y movilización. Otros elementos genéticos móviles, como el sistema integrón-caseta génica y los transposones, contribuyen también a la dispersión de la resistencia (Davies, 1994).

A pesar de que la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural, se convierte en un problema significativo para la salud pública cuando se ve exacerbado por el abuso y el mal empleo de los antimicrobianos en el tratamiento de las enfermedades humanas, así como su uso indiscriminado en la ganadería o la agricultura. Por este motivo, la existencia de aislamientos de *Salmonella* resistentes ha aumentado considerablemente en las últimas décadas.

Elementos genéticos móviles

En la transferencia de la resistencia a antimicrobianos participan tres elementos denominados plásmidos, transposones e integrones. Los microorganismos tienen la capacidad de transmitir dichos elementos tanto de manera vertical como de manera horizontal dentro de la misma especie, a especies relacionadas o a otras radicalmente distintas (Sefton, 2002).

Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, de doble cadena, generalmente circulares, que tienen capacidad de replicación y transcripción de manera independiente del ADN cromosómico. Con un tamaño que varía generalmente entre las 2 y más de 300 kilobases (Kb) se encuentran en la gran mayoría de las bacterias.

Otra de sus principales características radica en el hecho de que la información genética que portan es prescindible, pues el microorganismo podría sobrevivir sin el plásmido. Sin embargo, suele contener información beneficiosa en determinadas circunstancias, como puede ser la resistencia a antimicrobianos.

Los plásmidos están constituidos por una región constante que incluye determinantes genéticos para sus funciones esenciales (replicación, mantenimiento y transferencia) y una región variable de ADN heterólogo (ej., genes de resistencia). La relación epidemiológica entre distintos plásmidos se realiza en función de su región constante. La caracterización del ADN heterólogo es útil para determinar la ecología y la epidemiología de los mismos en respuesta a distintas presiones selectivas, en el caso de los determinantes de resistencia a la utilización de antimicrobianos.

Transposones

Los transposones (Tn) son secuencias de material genético móviles de entre 1 y 60 Kb que pueden desplazarse dentro de una molécula de ADN o entre moléculas, necesitando de la participación de vectores como plásmidos o ADN cromosómico. A

diferencia de lo que ocurría con los plásmidos, no tienen la capacidad de replicarse de manera independiente. Podemos distinguir diferentes tipos de transposones:

- **Secuencias de inserción (IS) o transposones simples** (figura 8): son los transposones de menor tamaño y contienen una región central con información para la transposición (enzima transposasa) y su regulación, flanqueada por secuencias repetidas en orden inverso (IRs).

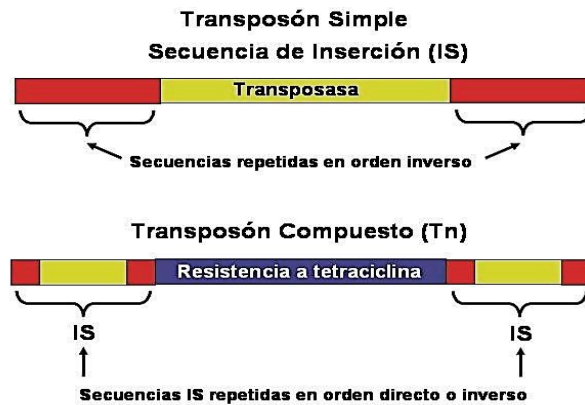


Figura 8. Representación de un transposón simple y de uno compuesto

- **Transposones compuestos:** contienen en ambos extremos copias de la misma secuencia de inserción (IS), que aportan la información requerida para que tenga lugar la transposición y flanquean una región central que codifica funciones de otro tipo, generalmente de resistencia a antibióticos.
- **Transposones complejos:** al igual que las secuencias de inserción se encuentran delimitados por IRs (de longitud variable: 35 a 40 pb). Contienen genes que codifican los enzimas transposasa (*tnpA*) y resolvasa (*tnpR*), así como una secuencia *res*, que intervienen en el proceso de transposición, junto con genes accesorios que pueden codificar resistencias a antibióticos.

Integrones

Los integrones son elementos genéticos que se pueden encontrar en plásmidos, transposones o integrados en el cromosoma bacteriano.

Por medio de un mecanismo de recombinación sitio-específica, acumula una combinación de genes estructurales organizados como un operón que se expresa a partir

de una región promotora aportada por el propio integrón; por ello son sistemas naturales de clonación y expresión. Los genes estructurales (exógenos) que se incorporan a los integrones presentan una estructura particular y se denominan casetes génicas.

Los integrones están formados por dos elementos principales: un gen que codifica una integrasa (*intI*) que media un proceso de recombinación específica entre el sitio *attI* del propio integrón y el sitio *attC* de la casete (Figura 9).

Los integrones se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- **Integrones cromosómicos (CIs)**, que albergan entre 20 y 200 casetes génicas, la mayoría de ellas de función metabólica desconocida (Rowe-Magnus et al., 2001).
- **Integrones móviles o integrones de multirresistencia**, los cuales incluyen genes de resistencia a diversos antimicrobianos. Dentro de este grupo se han descrito cinco clases de integrones: clase 1 (*intI1*), clase 2 (*intI2*), clase 3 (*intI3*), clase 4 (*intI9*) y de clase 5 (*intIHS*).

Los más comunes son los de tipo 1.

Los integrones de clase 1 típicos se caracterizan por presentar dos segmentos conservados (5'CS-3'CS) que flanquean una región central variable donde pueden encontrarse una o varias casetes génicas. El segmento 5'CS se caracteriza por tener uno o dos promotores, el gen de la integrasa *intI1* y *attI1*. En el segmento 3'-CS hay una secuencia promotora *Pc* a partir de la cual se transcriben los casetes de resistencia integrados, ya que estos genes carecen de promotor. Sin embargo, estos casetes presentan una secuencia específica denominada *attC*, la cual es reconocida por la integrasa que se une, por recombinación, a la secuencia *attI* del integrón en la orientación adecuada para su expresión. En dicho extremo 3'-CS, se hallan generalmente genes que dotan a la bacteria de resistencia a sulfonamidas (*sulI*) y a compuestos derivados del amonio cuaternario, detrás de los cuales aparece una *orf5* de función desconocida (Recchia y Hall, 1997).

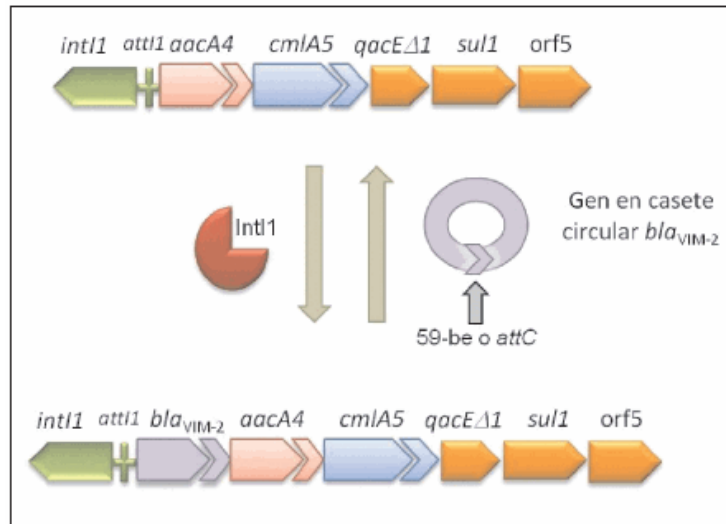


Figura 9. Organización general de un integrón y mecanismo de recombinação de las casetes génicas (GC). (Foto obtenida de <http://www.lookfordiagnosis.com>).

Métodos de tipificación:

Los sistemas de tipificación molecular constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. Estos sistemas comprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. De este modo, se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común (Coll et al., 2005).

Los marcadores moleculares se han aplicado a diferentes campos y su disponibilidad ha mejorado nuestro conocimiento sobre:

- patogénesis e historia natural de ciertas infecciones
- detección de brotes y epidemias, identificación de reservorios y de mecanismos de transmisión de patógenos
- diseño de medidas de control de propagación de la infección
- evolución genética de poblaciones microbianas.

En *Salmonella* la serotipificación es el método primario y universalmente aceptado, pero es necesaria la aplicación de métodos adicionales para subdividir los serotipos.

Métodos de tipificación fenotípicos:

- Fagotipificación

Permite clasificar determinados serotipos de *Salmonella* en función de la sensibilidad a la lisis por una colección de bacteriófagos. Los lotes de fagos no suelen estar disponibles o comercializados, por lo que solo se puede acceder a la fagotipificación a través en laboratorios de referencia. Al igual que el serotipado, el fagotipado se emplea habitualmente para realizar estudios epidemiológicos, ya que se ha establecido una correlación entre el fagotipo y el origen epidémico (Rabsch et al., 2002).

- Perfil de resistencia a antimicrobianos

Consiste en determinar el patrón de resistencia/sensibilidad de los aislamientos de estudio frente a diferentes antimicrobianos.

Métodos de tipificación genotípicos:

- Análisis plasmídico

El análisis de plásmidos tiene como objetivo detectar su presencia/ausencia en una colección de aislamientos. Para ello es necesario partir de un cultivo bacteriano adecuado, centrifugar el cultivo, aplicar un método de extracción y purificar el ADN plasmídico obtenido. Posteriormente podremos determinar el tamaño de los plásmidos y establecer las relaciones epidemiológicas. Se puede llevar a cabo por diferentes métodos (Tabla 2).

Tabla 2. Principales métodos para la extracción de plásmidos y sus aplicaciones

Método	Microorganismos	Tamaño (kbp)	Purificación posterior	DNA para digestión	Aplicaciones/Observaciones
<u>Kado y Liu</u>	Gramnegativos: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> Grampositivos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i>	2-150	NO	SI**	Su aplicación principal es la determinación del tamaño molecular **El ADN obtenido puede utilizarse para digestión aunque normalmente se evita debido a que la contaminación con fenol puede inhibir la digestión enzimática
<i>Barton</i>	Grampositivos, Gramnegativos, levaduras	>150	NO	NO	Su única aplicación es la determinación del tamaño molecular
<i>Birnboim y Doly</i>	Gramnegativos: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> Grampositivos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i>	< 60	Variable	SI	Método de elección para minipreps y para midi/maxipreps si se aplica un paso de purificación posterior. Se debe recurrir a otro método si los plásmidos son >100-150kbp
<i>Holmes y Quigley</i> ("boiling")	Gramnegativos: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> Grampositivos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus</i>	< 50	NO	SI	Solamente utilizable para plásmidos multicopia. El ADN obtenido es de inferior calidad al conseguido por otros métodos pero permite evaluar un gran número en un corto espacio de tiempo
<i>Chassy</i>	Grampositivos: estreptococos, actinomicetos, rodococos o nocardias	2- 50	NO	SI	
<i>Woodford</i>	<i>Enterococcus</i> spp	< 50	NO	SI	Utilizado frecuentemente por muchos autores. Ampliamente aceptado para este género aunque otros métodos aquí mencionados dan excelentes resultados
<i>Townsend</i>	<i>S. aureus</i>	< 50	NO	SI	Utilizado para el análisis de plásmidos en un gran número de muestras de esta especie
<i>Anderson y McKay</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>Streptococcus</i>	> 50 kbp	NO	SI	
<i>Currier and Nester</i>	Gramnegativos Grampositivos: <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (modificación del original en ref 3)	>100	SI	SI	Uno de los métodos de elección para la obtención de plásmidos de elevado Pm en cantidades del orden de decenas de microgramos-mg
<i>Portnoy</i>	Gramnegativos: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Legionella</i> Grampositivos: <i>Enterococcus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp, <i>Staphylococcus</i> spp	>100-530	SI	SI	Es el método de elección para la obtención de plásmidos de elevado Pm (rendimiento:decenas de microgramos-mg)

Reacción en cadena de la polimerasa

Consiste en la amplificación o replicación enzimática "in vitro" de uno o más fragmentos de ADN. En general existen diversas variantes de la tipificación por PCR:

1) Aquellas en las que utilizando cebadores arbitrarios o con cierta especificidad, se amplifican regiones del genoma localizadas entre dos cebadores adyacentes separados por una distancia no superior a la que la Taq polimerasa puede amplificar (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA). 2) Aquellas que amplifican regiones internas de ciertos genes y posterior secuenciación. Como es el caso del MLST (MultiLocus Sequence Typing; Figura 10).

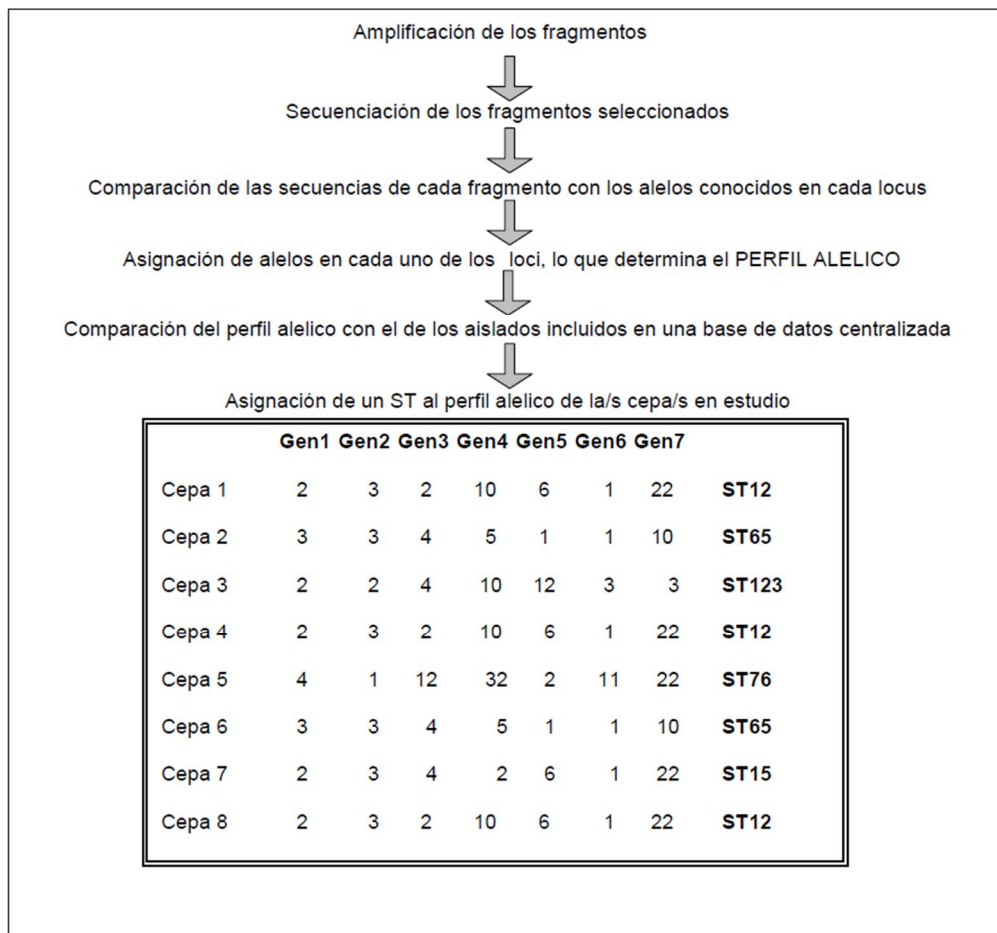


Figura 10. Esquema de análisis mediante la técnica de MLST.

Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Esta técnica explora todo el cromosoma detectando la variabilidad existente en los lugares de restricción del enzima utilizado para la digestión del ADN o la inserción o deleción de grandes fragmentos entre dos lugares de restricción. En función de estos factores se observará un polimorfismo en los tamaños de los fragmentos obtenidos en la digestión. En general el PFGE es muy discriminativo ya que es muy sensible a la microvariación existente en una colección de cepas.

La mayoría de los marcadores moleculares se basan en separaciones electroforéticas que dan lugar a un patrón de bandas. El análisis de los resultados se basará en el cálculo de los coeficientes de similitud de estos patrones hallados en los aislamientos. Estos resultados se expresan en una matriz de similitud que puede representarse gráficamente como un dendrograma de homología.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Datos de procedencia de los aislamientos

Los 7 aislamientos de *S. Derby* utilizados para la elaboración de este trabajo han sido cedidos por el Laboratorio de Salud Pública (LSP) del Principado de Asturias, proceden de muestras fecales de portadores de diferente edad y sexo, y fueron recogidos en diferentes hospitales de la región, así como de productos cárnicos. (Tabla 3).

Tabla 3. Aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby utilizados en este estudio

Aislamiento	Procedencia	Origen
LSP 39/13	HUCA	Heces
LSP 231/13	Hospital Valle del Nalón	Heces
LSP 270/13	HUCA	Heces
LSP 65/14	LSP	Producto cárnico
LSP 110/14	HUCA	Heces
LSP 395/14	LSP	Producto cárnico
LSP 396/14	LSP	Producto cárnico

LSP, Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias

HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias

Medios de cultivo

Se han empleado diferentes medios para la elaboración de este trabajo, que se mencionarán a continuación.

LB (Caldo Luria-Bertani): medio permisivo utilizado para el crecimiento bacteriano en medio líquido. Composición: extracto de levadura, peptona de caseína, NaCl y agua.

Agar EMB (Eosin Methylene Blue Agar; Oxoid): medio selectivo y diferencial, empleado para el crecimiento de los aislamientos en medio sólido. Permite el desarrollo de todos los géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Composición: peptona, sales biliares, tiosulfato, lactosa, carbonato de calcio, eosina, azul de metileno y agar. El azul de metileno inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas, mientras que la eosina permite diferenciar a las fermentadoras de lactosa (colonias rojo oscuro) de las no fermentadoras como *Salmonella* (colonias transparentes).

Mueller-Hinton (MH; Oxoid): medio empleado universalmente para la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos mediante el método de difusión en agar. Composición: caseína ácida hidrolizada, extracto de carne bovina y almidón.

Todos estos medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Siembra de bacterias y conservación

La siembra de los aislamientos de *S. Derby* se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar.

El proceso varía dependiendo del empleo de medios sólidos o líquidos. En el caso de que se trate de medios sólidos se puede llevar a cabo por 2 procedimientos:

1. Siembra por agotamiento o en estría: se añade el inóculo en una zona cercana al borde de la placa y se extiende dibujando una serie de estrías; a continuación se esteriliza el asa introduciéndola en la llama de un mechero y se realiza otra serie de estrías partiendo de las anteriores; el proceso se repite otras dos veces hasta completar la placa. Este método es utilizado para obtener colonias aisladas del microorganismo, y el medio empleado en este trabajo ha sido el Agar EMB. (Figura 11).
2. Siembra en sábana: se añaden 100 µl de un cultivo líquido en el centro de una placa de medio sólido y se reparte de forma homogénea por toda la superficie, ayudados de un asa de Digralsky o, en su defecto, con un hisopo de algodón estéril. Este procedimiento se empleó para el crecimiento de los aislamientos en el medio MH, para determinar la sensibilidad existente frente antimicrobianos.

En el caso de cultivos líquidos se utilizaron entre 2 y 4 ml de medio LB repartido en tubos de ensayo, que se inocularon bien a partir de colonias aisladas en medio sólido o de un pre-cultivo en medio líquido.

La incubación se realizó en estufa (medios sólidos) o en incubadores con agitación (medios líquidos) a 37°C. Los aislamientos se conservaron a 4°C en placas de EMB.

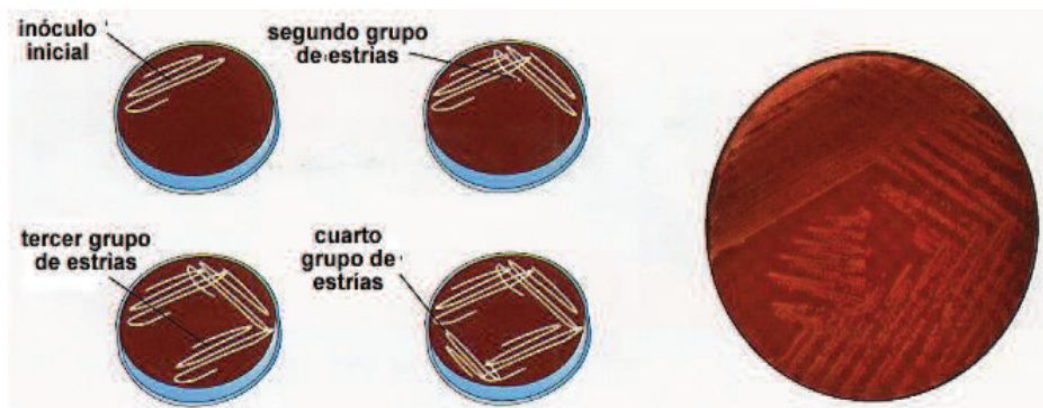


Figura 11. Esquema de siembra por agotamiento

Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos

Se estudió la sensibilidad de los aislamientos de *S. Derby* a siete antimicrobianos: estreptomicina (STR), sulfonamidas (SUL), tetraciclina (TET), ampicilina (AMP), trimetoprim (TMP), cloranfenicol (CHL) y ácido nalidíxico (NAL). Para ello se utilizó la técnica de difusión disco-placa o antibiograma, gracias a la cual se puede conocer la actividad de los antimicrobianos frente a cualquier microorganismo (Figura 12).

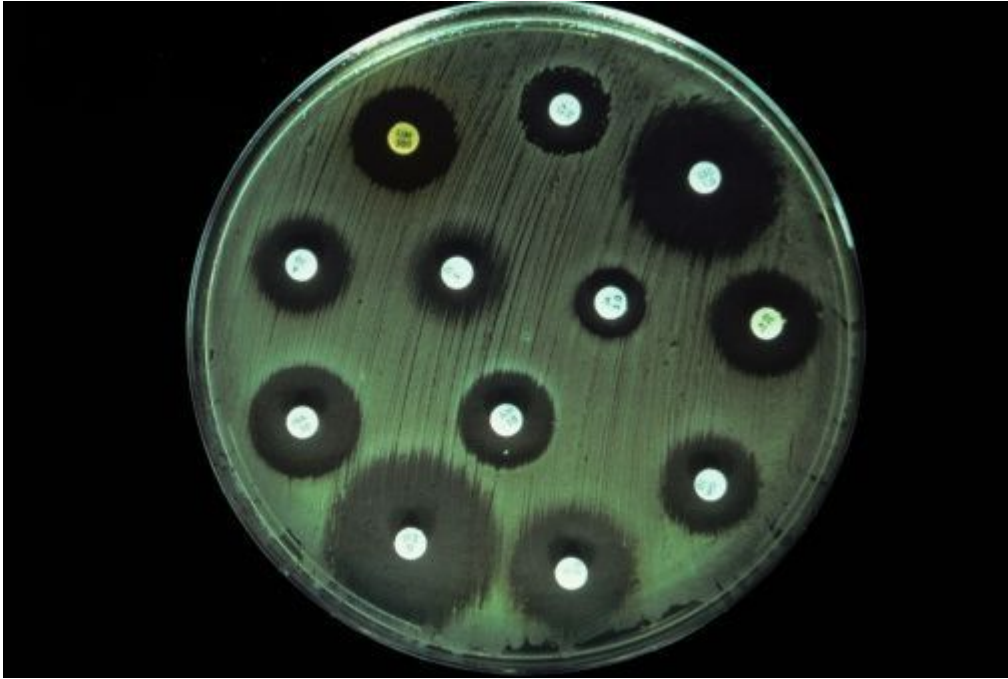


Figura 12. Placa de Mueller Hinton inoculada con una bacteria sobre la cual se colocaron discos de antimicrobianos. La sensibilidad o resistencia se deduce en función del diámetro de los halos obtenidos.

Para llevarlo a cabo se añadió a 2,5 ml de medio LB inóculo procedente de una colonia de cada aislamiento y se dejó incubar en agitación durante una noche a 37°C. A continuación se diluyeron 10 µl del cultivo en 1 ml de LB, para después añadir 100 µl de la dilución sobre la superficie de una placa de MH, extendiéndolos bien mediante el procedimiento de siembra en sábana.

Posteriormente se colocaron los discos impregnados de una determinada cantidad de antimicrobiano dejando una cierta distancia entre ellos, para finalmente incubar las placas en una estufa a 37°C durante toda una noche. Al día siguiente se midieron los diámetros de los halos de inhibición observados, y se interpretaron los resultados de acuerdo con los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009; Tabla 4).

Tabla 4. Criterios empleados para la interpretación de los resultados del antibiograma

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

Reacción en cadena de la polimerasa

Una vez realizada la prueba de sensibilidad a los distintos antimicrobianos y por ello conocido ya el fenotipo correspondiente a cada aislamiento de *S. Derby*, se llevó a cabo la identificación de los genes responsables de las resistencias detectadas, y la búsqueda de posibles elementos génicos móviles presentes (integrones, transposones y plásmidos).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica *in vitro*, utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones cuya secuencia se conoce.

Para llevarla a cabo, se realiza una mezcla de reactivos que contiene, además del ADN molde, oligonucleótidos específicos que actúan como iniciadores directo y reverso en la reacción de síntesis (Tabla 3 y 4), dNTPs (desoxirribonucleótidos), tampón, agua y el enzima ADN polimerasa que actuará de catalizador (Tabla 7).

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la identificación de genes de resistencia en los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby

Gen	Secuencia 5'-3' Directo/Reverso	T_m	Amplicón (pb)	Referencia
<i>bla</i> _{TEM-1}	TTGGGTGCACGAGTGGGT TAATTGTTGCCGGAAGC	55	503	Arlet y Phillippon, 1991
<i>bla</i> _{OXA}	AGCAGCGCCAGTGCATCA ATTCGACCCCAAGTTTCC	60	708	Guerra <i>et al.</i> , 2000
<i>bla</i> _{PSE}	CGCTTCCCGTTAACAAGTAC CTGGTTCATTTAGATAGCG	65	419	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
<i>tet</i> (A)	GCTACATCCTGCTTGCCT CATAGATTCGCCGTGAAGA	55	210	Guerra <i>et al.</i> , 2004
<i>tet</i> (B)	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAATACCG	55	659	Guerra <i>et al.</i> , 2004
<i>tet</i> (G)	GCTCGGTGGTATCTCTGC AGCAACAGAATCGGGAAC	55	500	Guerra <i>et al.</i> , 2004
<i>AadA</i>	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC ATTGCCAGTCGGCAGCG	70	526	Guerra <i>et al.</i> , 2004
<i>StrA</i>	AAAATCGCACCTGCTTCCC CCAATCGCAGATAGAAGGC	60	669	Guerra <i>et al.</i> , 2004
<i>strB</i>	ATCGTCAAGGGATTGAAACC GGATCGTAGAACATATTGGC	60	509	Guerra <i>et al.</i> , 2004
<i>sul1</i>	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	65	436	Guerra <i>et al.</i> , 2004
<i>sul2</i>	TCAACATAACCTCGGACAGT GATGAAGTCAGCTCCACCT	55	707	Guerra <i>et al.</i> , 2004
<i>sul3</i>	GAGCAAGATTTTTGGAATCG TGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	50	700	Perreten y Boerlin, 2003

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para la detección de integrones de clase I y de los transposones Tn10 y Tn1721 en los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby.

Gen o región	Secuencia 5' – 3' Directo/Reverso	Tm	Amplicón (pb)	Referencia
Región variable (integrón de clase I)	GGCATCCAAGCAGCAAG/ AAGCAGACTTGACCTGA	55	Variable	Guerra et al, 2004
<i>intI1</i> (integrón de clase I)	TGCGGGTCTAAAGGATGTCTGTGATT/ CAAGCACATGCGTAGTAAGAT	55	491	White et al, 2001
IS10 (Tn10)	CTACCGAGTAACACCACACCGCTC/ AGCATCAGGGCGATTAGCAGC	60	536	Martínez et al, 2007
<i>tnpA</i> (Tn1721)	AGCTCTGCCTGCTGCGCTAC/ ATGTGTTCCAGCATGTGCCG	60	520	Martínez et al, 2007

Tabla 7. Componentes de las mezclas de la reacción de PCR

Volumen final	DNA molde	H ₂ O	Oligo Directo 10 µM	Oligo Reverso 10 µM	Buffer 10x	dNTPs 2mM	Taq polimerasa 5 U/µl
15	1,5	7,42 5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,075
25	2,5	12,3 7	2,5	2,5	2,5	2,5	0,125
50	5	24,5	5	5	5	5	0,5

* Las cantidades se indican en µl.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR system (Perkin Elmer) o Minicycler™ (MJ Research INC) (Figura 13). Esta técnica consiste en ciclos repetitivos que constan de tres pasos (Figura 14):

- Desnaturalización del ADN a temperatura elevada, a fin de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario: 5 segundos a 94-95°C.
- Anillamiento: unión o hibridación de dos oligonucleótidos (directo y reverso), utilizados como cebadores, al ADN diana. Se efectúa a una temperatura inferior,

generalmente, entre 55 y 65°C. La temperatura adecuada depende de los oligonucleótidos empleados y se pueden calcular con la siguiente fórmula:

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

- Extensión, esto es, elongación de la cadena de ADN por adición de nucleótidos (dNTPs) a partir de los cebadores utilizando ADN polimerasa como catalizador, en presencia de iones Mg^{2+} .



Figura 13. Termociclador Gene Amp PCR system

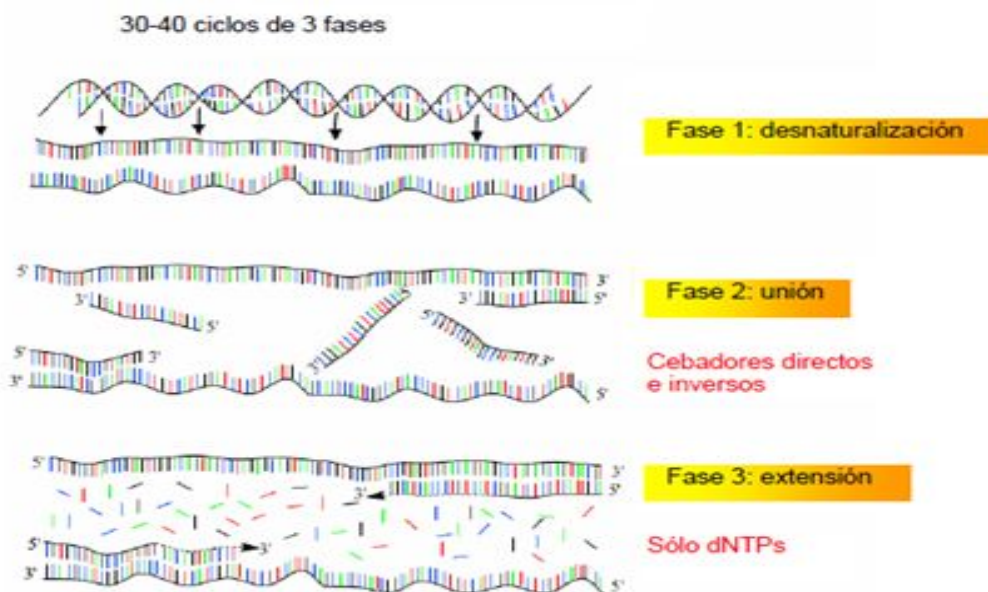


Figura 14. Fases de la reacción de amplificación por PCR

El ADN molde empleado (ADN total de la bacteria, tanto cromosómico como plasmídico) se libera por ebullición.

Una vez realizada la PCR los fragmentos obtenidos se visualizan por electroforesis en geles de agarosa cuya concentración oscila entre el 0,8 % y el 2%. Como marcador para conocer el tamaño de los amplicones, se empleó ADN del fago λ previamente digerido con PstI. Posteriormente se tiñe en una solución diluida de bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$), durante 5-20 minutos.

Análisis plasmídico

Con el objeto de estudiar los plásmidos presentes, se recurrió a un método basado en una lisis alcalina, el cual se sirve de las diferencias existentes entre el ADN plasmídico respecto al cromosómico. La técnica empleada fue la propuesta por Kado y Liu (Kado y Liu, 1981), que permite la obtención de plásmidos de pequeño y de gran tamaño. Combina tratamiento a elevado pH con una elevada temperatura (55°C) lo cual tiene el efecto de reducir la obtención de ADN cromosómico en la preparación final. Las proteínas residuales obtenidas en el proceso se eliminan por extracción con fenol cloroformo lo cual puede inhibir la digestión posterior con enzimas de restricción.

Se inocularon 2,5 ml de LB a partir de una colonia aislada de los aislamientos a analizar, y se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se añadió 1,5 ml de ese cultivo a un tubo eppendorf, y se centrifugó con el fin recoger el sedimento que contiene las bacterias. A éste se añadieron 20 μl de la solución KD-I (5 ml de Tris-HCl 1 M pH 8, 200 μl de EDTA 0,5 M y agua destilada hasta un volumen de 100 ml), resuspendiéndolo con el fin de obtener una mezcla homogénea. El siguiente paso fue añadir 100 μl de la solución KD-II o mezcla de lisis (0,60 g de Tris, 3 g de SDS, 4,1 ml de NaOH y enrasar hasta 100 ml con agua destilada; pH 12,5).

Después las muestras se incubaron a 55°C durante media hora, se añadieron 50 μl de fenol ácido y 50 μl de cloroformo-isoamil alcohol (1:1), tras lo cual se centrifugó para separar las dos fases. Finalmente se recogieron aproximadamente unos 90 μl de la fase superior acuosa, donde se encuentra el ADN plasmídico, intentando no arrastrar la interfase que contiene restos celulares. La fase acuosa se puede almacenar a -20°C.

En cuanto a su visualización, se usó un gel de agarosa al 0,6%, y se dejó corriendo a 120 V durante unas 3 horas; posteriormente se tiñó con bromuro de etidio como se indicó anteriormente.

Los controles usados para esta técnica han sido ADN plasmídico sin digerir procedente de *E. coli* 92 (*E. coli* 39R861 NCTC 50192) que presenta cuatro plásmidos con un tamaño de 150 Kb, 54,5 Kb, 37 Kb y 7 Kb; *E. coli* 93 (*E. coli* V517 NCTC 50193) que contiene plásmidos con un tamaño de 49,2 Kb, 5,3 y 2,6 Kb; *E. coli* V517 que contiene los plásmidos R27 y R1 de 169,7 Kb y 93,93 Kb, respectivamente y *S. Enteritidis* ATCC 13076 que contiene un plásmido de 60 Kb.

Macrorrestricción-Electroforesis en campo pulsante (PFGE):

Para poder llevar a cabo la tipificación de los aislamientos de *S. Derby*, se llevó a cabo mediante la digestión del ADN total con una endonucleasa de restricción de baja frecuencia de corte (*Xba*I), para posteriormente realizar una electroforesis de campo pulsante (PFGE). Esta técnica permite la separación de fragmentos de gran tamaño (entre 20 y más de 1000 Kb), que no pueden separarse mediante electroforesis convencional. Como resultados se obtienen las “huellas genómicas” de las bacterias en cuestión.

El proceso implica la inclusión de las bacterias en bloques de agarosa, con el fin de mantener al ADN genómico lo más intacto posible, en los cuales se produce la lisis de las bacterias y la digestión “in situ”. Los pasos a seguir se comentan a continuación (Figura 16):

1. Preparación de los bloques: a partir de cada bacteria crecida primero en medio EMB y posteriormente en LA, se obtuvo una suspensión en tampón CSB (1 ml de Tris-HCl 1M pH 8, 200 µl EDTA 0,5 M pH 8 enrasado a 100 ml con agua destilada), hasta conseguir una absorbancia de 0,6 a 610 nm. A continuación se preparó una agarosa especial para bloques, al 1,2% en una solución de SDS (1%) en tampón TBE 0,5 X (5 ml de TBE 5X (54 g/L de Tris hidroximetil aminometano, 27,5 g/L ácido bórico, 20 ml EDTA 0,5M pH 8, enrasado a 100 ml con agua destilada) que, una vez fundida, se

mantiene en un baño a 55°C hasta su utilización. A cada suspensión de células bacterianas se añaden 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml), y se deja incubar durante 15 minutos a 37°C. A continuación se mezclan 200 µl de esta suspensión con 200 µl de la agarosa fundida. La mezcla se reparte en moldes y se deja enfriar durante 15 minutos a 4°C, para su correcta solidificación, obteniéndose así los bloques de agarosa con las bacterias en su interior.

2. Lisis bacteriana: los bloques de células bacterianas incluidas en agarosa se pasan a 2 ml de una solución de tampón de lisis (5 ml de Tris-HCl, 10 ml de sarcosina 10%, 10 ml de EDTA 0,5 M a pH 8, enrasado a 100 ml con agua destilada; al que se añaden 10 µl de proteinasa K). Se deja incubar durante 2 horas en un baño a 55°C con agitación.

3. Lavado de los bloques: los bloques que contienen las bacterias lisadas se lavan 2 veces con 5 ml de agua destilada estéril durante 15 minutos y 4 veces con 5 ml de tampón TE estéril durante 15 minutos. El objetivo de los lavados es arrastrar fuera del bloque de agarosa restos celulares procedentes de la lisis, así como eliminar componentes que puedan inhibir la restricción posterior (proteinasa K, detergente o EDTA). La pureza de la agarosa de los bloques permite el paso de las soluciones a su través, consiguiendo purificar el ADN contenido en ellos y protegiéndolo de la fragmentación. Los bloques se conservan en 1 ml de TE a 4°C hasta su utilización.

4. Digestión: para cada aislamiento se utiliza una cuarta parte de bloque al que se añade el enzima de restricción: XbaI (5'-TCTAGA-3') (Takara Bio Inc.) en un tampón adecuado. La incubación se realiza a 37°C durante 3-4 horas.

5. Preparación del gel de agarosa y electroforesis: Tras la digestión, los bloques se adhieren al peine, y posteriormente se prepara el gel de electroforesis. La electroforesis se realiza en un equipo CHEF DR-III (clamped homogeneous electric field electrophoresis). Sus mayores ventajas son la facilidad de manejo y la capacidad de separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos, que hacen mucho más fácil la comparación entre ellos. Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente y fijos a un contorno hexagonal (Figura 15), y se utiliza con las condiciones consenso para *Salmonella*: pulso inicial de 2 s, pulso final de 64 s,

tiempo de corrido de 20 horas, temperatura de 14°C, 200 V con un ángulo de 120°, que determina lo que deben girar los fragmentos cada vez que se cambia de orientación del campo eléctrico.

Como control de peso molecular se utilizó λ ladder (New England BioLabs), y el ADN de *S. Branderup* H9812 digerido con XbaI. La tinción y visualización del gel se realiza como en las electroforesis convencionales.

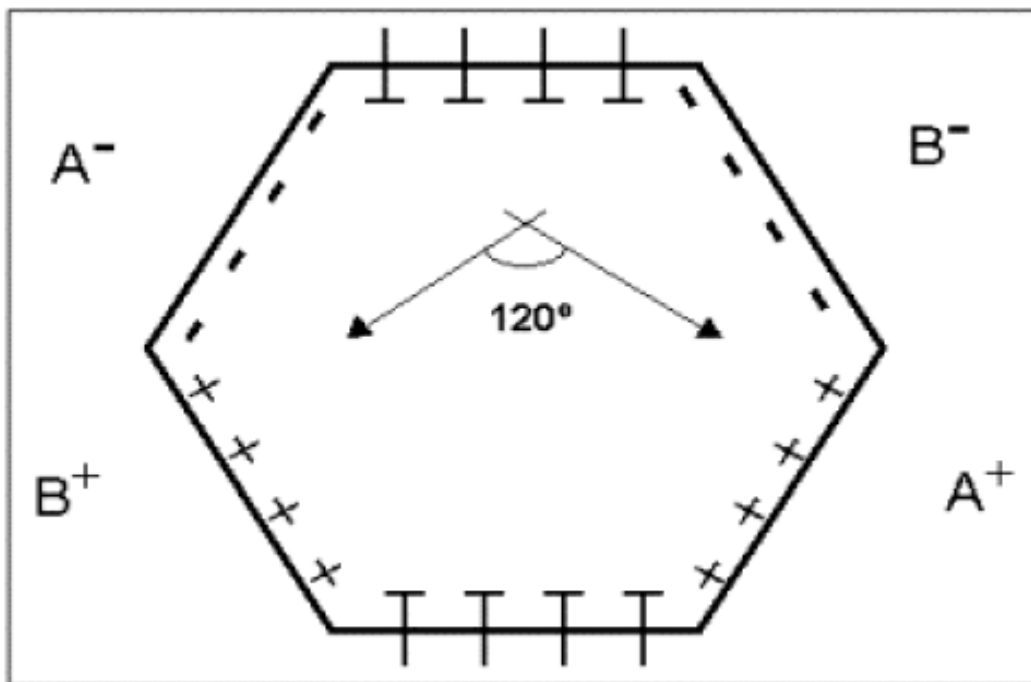


Figura 15. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B.

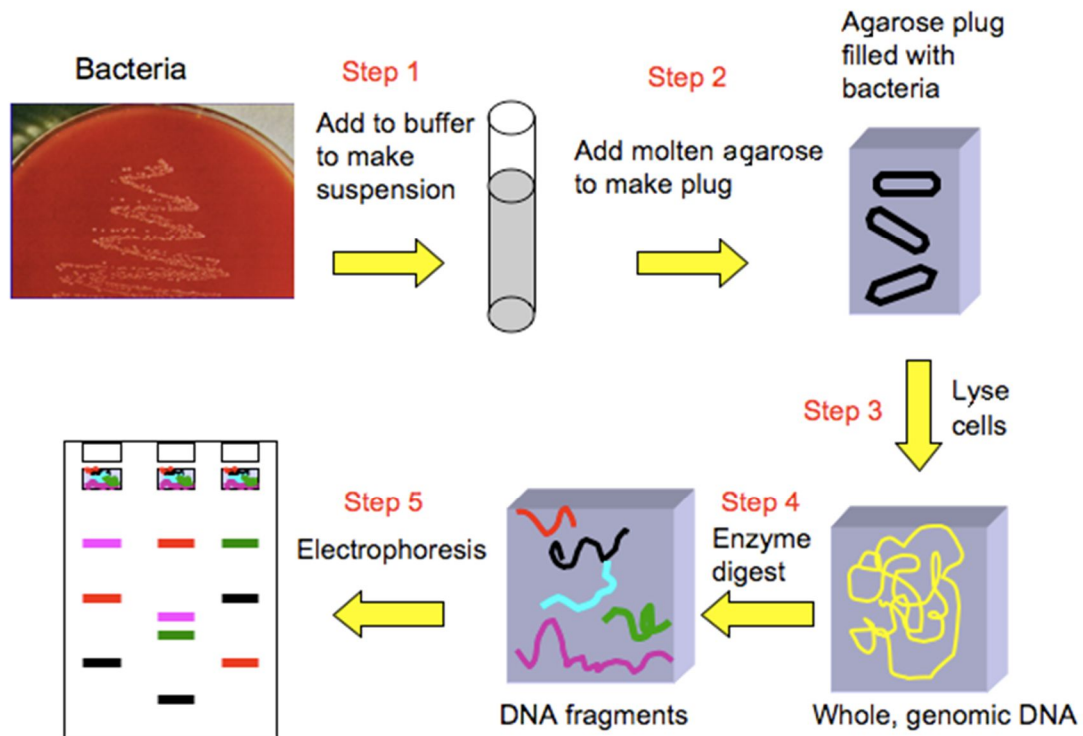


Figura 16. Esquema del procedimiento de macrorrestricción-electroforesis en campo pulsante.

Los resultados del gel son procesados con el programa informático BioNumerics (Applied Maths), para construir dendogramas de similitud basados en el coeficiente de similitud de Dice (S), el cual compara los perfiles dos a dos considerando el número de fragmentos comunes sin tener en cuenta el tamaño de los mismos. Sin embargo, dado que en este caso todos los aislamientos presentaron el mismo perfil no fue necesario realizarlo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 7 aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby objeto del presente estudio, proceden de muestras fecales de diferentes individuos con enterocolitis, recuperadas durante los años 2013 y 2014 en Hospitales de Asturias, así como de diferentes productos cárnicos (Tabla 3).

En primer lugar se procedió a cultivar en medio EMB cada uno de dichos aislamientos, incubando las placas a 37°C. Las colonias visualizadas al cabo de 24 horas fueron transparentes, resultado esperado en el caso del género *Salmonella*, debido a su incapacidad de fermentar la lactosa.

Determinación de la sensibilidad/resistencia frente a antimicrobianos

Con el fin de determinar los fenotipos de resistencia de cada aislamiento, se utilizó la técnica del antibiograma incluyendo discos de siete agentes antimicrobianos: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas, trimetoprim y ácido nalidíxico. El grupo al que pertenecen así como el mecanismo de acción de estos compuestos se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Antimicrobianos empleados en el estudio

Antimicrobiano	Grupo y Mecanismo de actuación
Ampicilina (AMP)	β -lactámicos (Penicilinas) Interfieren con la síntesis de la pared bacteriana, impidiendo la formación de enlaces cruzados entre cadenas de peptidoglicano (reacción de transpeptidación), lo que genera el debilitamiento de la pared celular y la consiguiente lisis. Además, la unión entre el β -lactámico y las transpeptidasas induce la autólisis.
Estreptomycin (STR)	Aminoglucósidos Inhibe la síntesis proteica bacteriana actuando a nivel de la subunidad ribosomal 30S bloqueando la iniciación de la síntesis de proteínas.
Tetraciclina (TET)	Tetraciclinas Inhibe la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bloqueando la elongación de la cadena peptídica.

Antimicrobiano	Grupo y Mecanismo de actuación
Cloranfenicol (CHL)	Fenicoles Inhibe la síntesis proteica al unirse irreversiblemente a la subunidad ribosomal 50S bloqueando la actuación del enzima peptidil transferasa.
Sulfonamidas (SUL)	Sulfanilamidas Análogo estructural del ácido p-amino benzoico (PABA). Impiden la utilización de este compuesto para la síntesis de ácido fólico (este a su vez actúa en la síntesis de timina y purina). Inhiben de forma competitiva al enzima dihidropteorato sintetasa, responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico.
Trimetopim (TMP)	Diaminopirimidina Es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa, enzima que participa en la conversión del ácido dihidrofólico a su forma funcional, el ácido tetrahidfólico. Impidiendo por tanto la formación de ácido fólico y por ello la división celular.
Ácido nalidíxico (NAL)	Quinolona. Bloquea a los enzimas topoisomerasa II (DNA girasa; (formada por dos subunidades, GyrA y GyrB) y a la topoisomerasa IV (formada por dos subunidades, ParE y ParC) que intervienen en los procesos de replicación, partición y transcripción del ADN.

Todos los aislamientos fueron resistentes a estreptomcina, sulfonamidas y tetraciclina y dos de ellos lo fueron también a ácido nalidíxico (Tabla 9),

Tabla 9. Perfiles de resistencia de 7 aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby procedentes de heces y productos cárnicos.

Perfil-R	Fenotipo	Genotipo	EGM	Aislamientos LSP	Perfil-P
R1	STR-SUL-TET	<i>aadA-sulI-tet(A)</i>	In1, Tn1721	39/13	P1
				231/13	P2
				270/13	P2
				65/14	P3
				396/14	P1
R2	NAL-STR-SUL-TET	ND- <i>aadA-sulI-tet(A)</i>	In1, Tn1721	110/14	P1
				395/14	P1

R, Resistencia; LSP, Laboratorio de Salud Pública; EGM, Elemento genético móvil; P, Perfil Plasmídico; X; NAL, Ácido nalidíxico; TET, Tetraciclina; SUL, Sulfonamidas, STR, Estreptomina; ND, No determinado; In1, Integrón de clase 1; Tn, transposón.

Detección de genes de resistencia

Una vez conocido el fenotipo de resistencia se llevaron a cabo reacciones de amplificación por PCRs para identificar los genes responsables (Tabla 7). Existe un gran número de genes *tet*; solamente en Gram negativos se han descrito 11, denominados *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(Y)*, *tet(30)* y *tet(31)* (Roberts, 1996). En los siete aislamientos de *S. Derby* resistentes a tetraciclina solo se investigó la presencia de los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)*, al ser los más frecuentemente encontrados en *S. enterica*. Estos genes codifican proteínas de membrana que actúan como bombas de expulsión del antimicrobiano. En todos los aislamientos de *S. Derby* se detectó el gen *tet(A)* (Figura 17).

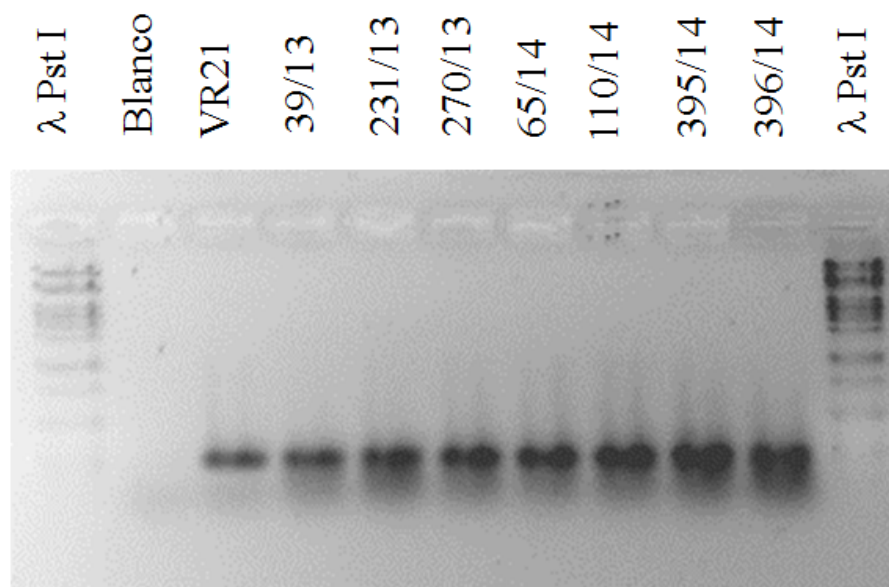


Figura 17. Amplificación del gen *tet(A)*, cuyo amplicón presenta un tamaño de 210 pb. Calles 1 y 11: DNA del fago λ digerido con PstI, empleado como marcador molecular; Calle 2: Control negativo; Calle 3: VR21, control positivo; Calles 4 a 10: Aislamientos analizados.

En lo referente a la resistencia a sulfonamidas se investigó la presencia de los genes *sul1*, *sul2* y *sul3*, que codifican enzimas dihidropeptorato sintetisas (DHPS) resistentes a la acción del antimicrobiano, debido a que tienen una afinidad 10.000 veces menor que la enzima normal. El gen hallado en todas ellas fue *sul1* (Figura 18).

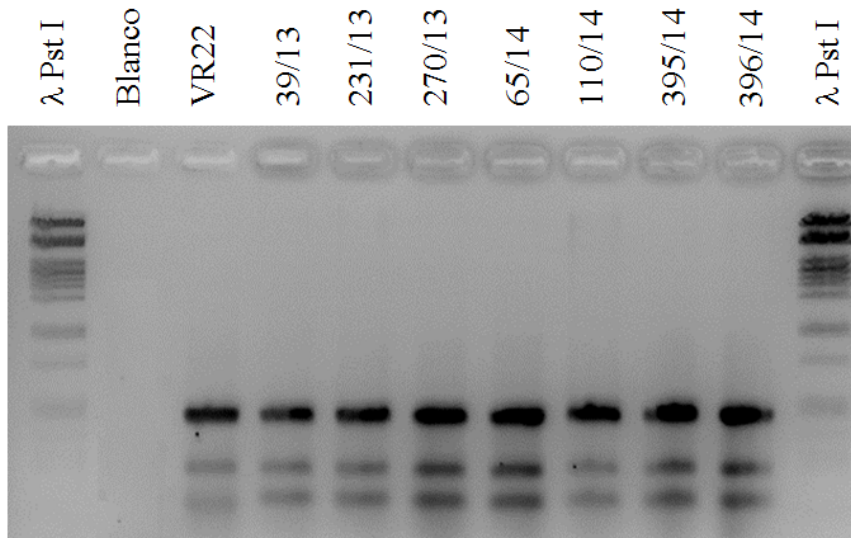


Figura 18. Amplificación del gen *sulI*, cuyo amplicón presenta un tamaño de 436 pb. Calles 1 y 11: DNA del fago λ digerido con PstI, empleado como marcador molecular; Calle 2: Control negativo; Calle 3: VR22, control positivo; Calles 4 a 10: Aislamientos analizados.

En los siete aislamientos resistentes a estreptomicina los genes rastreados fueron *aadA*, *strA* y *strB*. Se halló el gen *aadA*, que codifica para una O-nucleotidiltransferasa, la cual cataliza una reacción de adenilación de un grupo hidroxilo de la estreptomicina, generando resistencia (Figura 19).

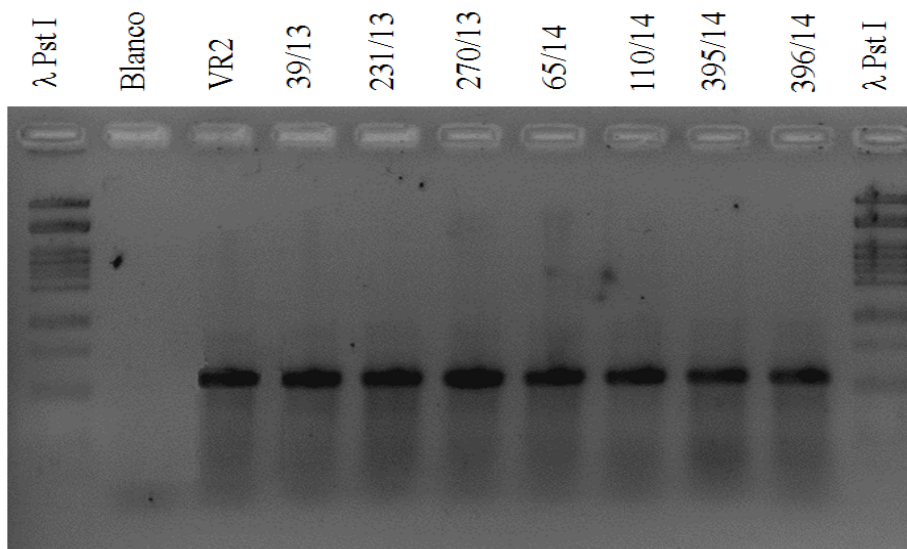


Figura 19. Amplificación del gen *aadA*, cuyo amplicón presenta un tamaño de 526 pb. Calles 1 y 11: DNA del fago λ digerido con PstI, empleado como marcador molecular; Calle 2: Control negativo; Calle 3: VR2, control positivo; Calles 4 a 10: Aislamientos analizados.

En *S. enterica*, la causa más común de resistencia a quinolonas son mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A del enzima ADN girasa (tabla 6). En este caso dos aislamientos mostraron resistencia: 110/14 y 395/14, pero el gen *gyrA* no pudo ser secuenciado por falta de tiempo. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, la secuenciación del gen *gyrA* de aislamientos de *S. Derby* previamente caracterizados, reveló la misma mutación. Esta mutación afecta al codón correspondiente al Aspártico de la posición 87 (Asp87) que se cambia por Asparagina (Asn). Es posible que dicha mutación este también presente en los dos aislamientos del presente trabajo, cuya determinación quedará para estudios futuros.

Detección de elementos genéticos móviles

El siguiente paso fue la detección de integrones y transposones, previamente descritos en asociación con los genes de resistencia identificados. En concreto, se estudió la posible presencia de integrones de clase 1 y del transposón Tn1721, mediante amplificación por PCR de genes o regiones específicas de cada uno de ellos.

El gen *tet(A)* se encuentra normalmente en el transposón Tn1721. De hecho, este transposón se detectó en todos los aislamientos resistentes a tetraciclina que eran portadores de *tet(A)*, a partir de los cuales se amplificó el gen *tnpA* que codifica la transposasa de Tn1721 (Figura 20).

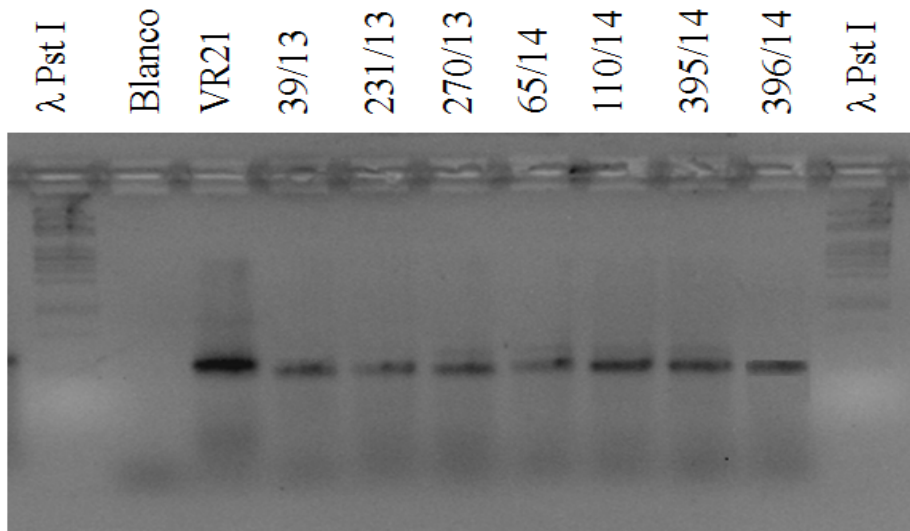


Figura 20. Amplificación del gen de la transposasa de *Tn1721*, cuyo amplicón presenta un tamaño de 510 pb. Calles 1 y 11: DNA del fago λ digerido con PstI, empleado como marcador molecular; Calle 2: Control negativo; Calle 3: VR21, control positivo; Calles 4 a 10: Aislamientos analizados.

Se estudió la presencia de integrones de clase 1 en los aislamientos positivos para *sull*, ya que este gen forma parte de su segmento 3'CS. Todos ellos fueron positivos para el gen *int1*, que codifica el enzima integrasa de clase 1 (Figura 21).

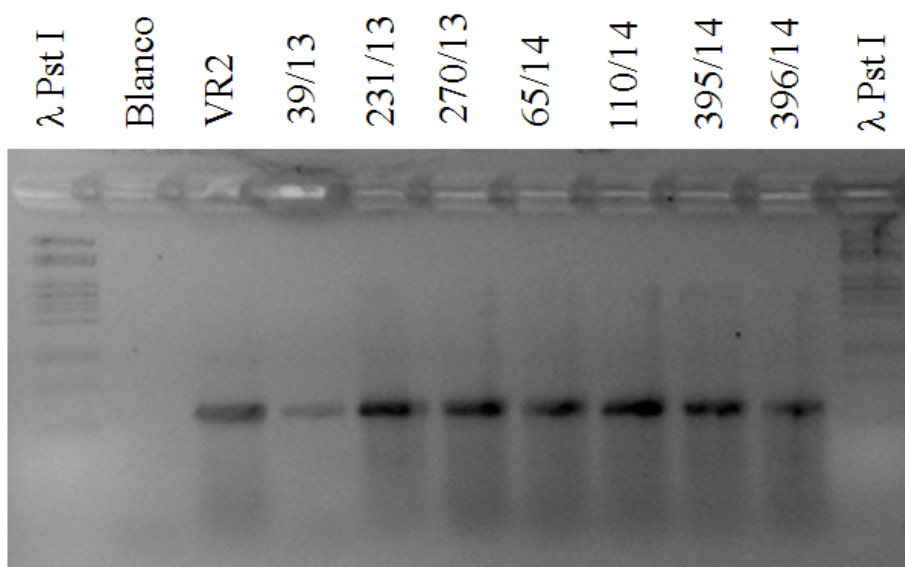


Figura 21. Amplificación del gen *Int1*, cuyo amplicón presenta un tamaño de 558 pb. Calles 1 y 11: DNA del fago λ digerido con PstI, empleado como marcador molecular; Calle 2: Control negativo; Calle 3: VR2, control positivo; Calles 4 a 10: Aislamientos analizados.

Detección de plásmidos

Algunos plásmidos tienen un papel clave en la adaptación y en la evolución bacteriana. Ciertas características fenotípicas se asocian a ellos, como es la producción de toxinas, producción de bacteriocinas o la resistencia a determinados agentes antimicrobianos, etc.

El estudio de los plásmidos se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina Kado y Liu (Figura 22).

Se hallaron plásmidos de pequeño tamaño, entre 6 y 2 Kb, en todos los aislamientos estudiados. El análisis plasmídico reveló la presencia de ADN cromosómico en cada uno de los aislamientos analizados. En total se encontraron 3 perfiles diferentes designados con una P seguida de un número. Tanto los perfiles P1 como P3 (con uno y cuatro plásmidos, respectivamente) fueron compartidos por más de un aislamiento, en concreto cuatro (39/13, 110/14, 395/14 y 396/14) en el caso de P1, y por dos (231/13 y 270/13) en el caso de P2. El perfil P3 (que incluye dos plásmidos, uno común a todos los aislamientos y el otro común con P2) resultó ser exclusivo del aislamiento 65/14.

La relevancia de los plásmidos hallados para *S. Derby* será analizada en el futuro.

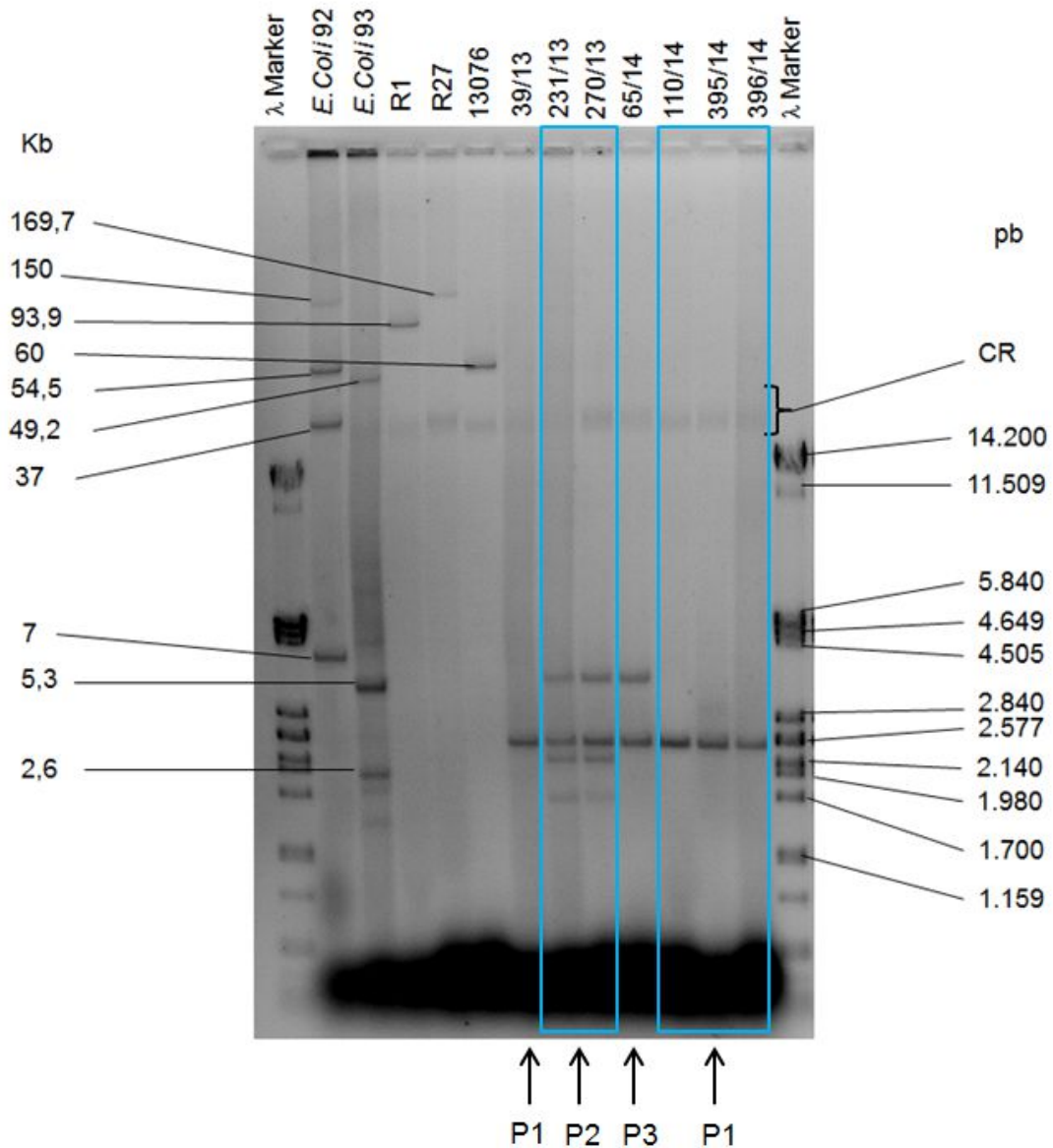


Figura 22. Contenido plasmídico de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby. Calles 1 y 14, DNA del fago λ digerido con PstI; 2, 3, 4, 5 y 6: Plásmidos extraídos a partir de: *E. coli* 92, *E. coli* 93, *E. coli* V517 (R1 y R27) y *S. enterica* serotipo Enteritidis (pSEV), todos ellos utilizados como control de ADN plasmídico intacto; 7-13: Perfiles plasmídicos P1 a P3 de los aislamientos analizados; CR, ADN cromosómico.

Macrorrestricción y electroforesis en campo pulsante (PFGE)

Como se comentó anteriormente, se realizó esta técnica para poder obtener la “huella genómica” de las bacterias estudiadas, con el fin de establecer el grado de relación existente entre ellas. El análisis de los aislamientos de *S. Derby* por digestión con XbaI (endonucleasa recomendada en el caso de *Salmonella*), seguida de la separación de los fragmentos por PFGE reveló el mismo perfil para todos ellos. Este perfil incluye 14 fragmentos con tamaños comprendidos desde 50 Kb hasta 1000 Kb, aproximadamente (Figura 23).

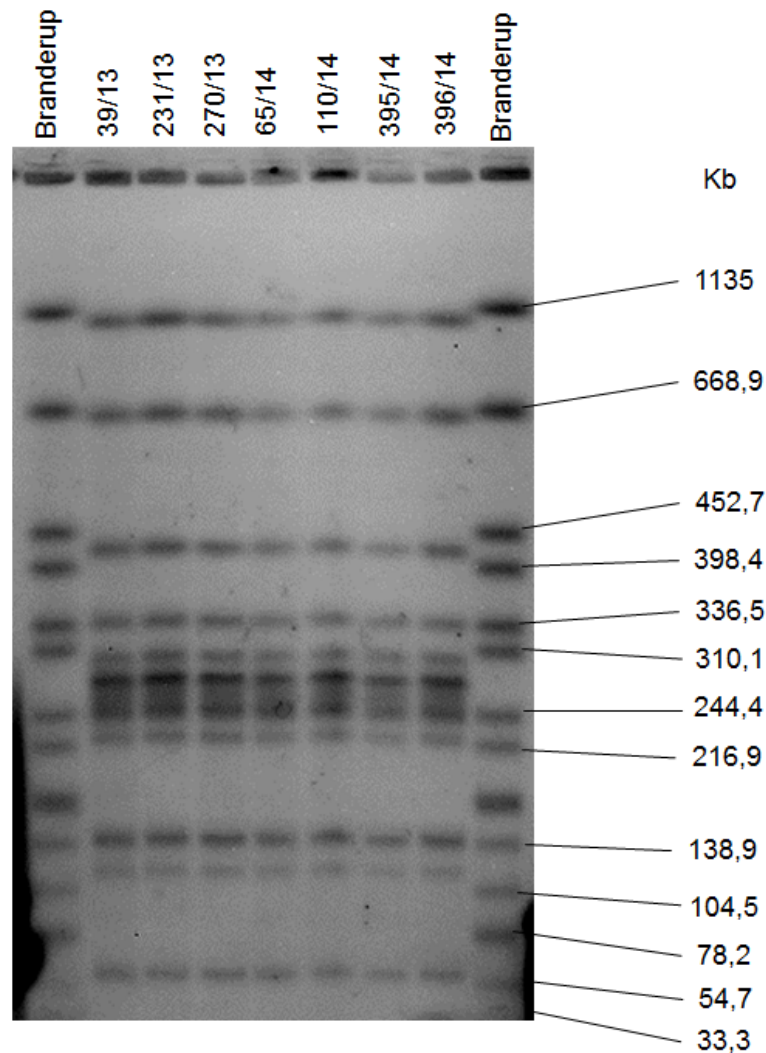


Figura 23. Perfiles XbaI-PFGE de aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby 1 y 9, ADN de *Salmonella enterica* serovar Branderup H9812 digerido con XbaI, utilizado como control de tamaños; calles 2 a 8: perfil X1 de los aislamientos analizados.

Comparación de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby del periodo 2013 - 2014 con los aislamientos del mismo serotipo correspondientes a los años 2008 – 2012

Con el fin de evaluar la tendencia de *S. Derby* en el Principado de Asturias, identificar las variantes presentes en nuestra región, establecer la relación existente entre ellas y determinar las resistencias a antimicrobianos con mayor prevalencia en este serotipo, se ha llevado a cabo la comparación de los aislamientos caracterizados en este trabajo y en dos estudios previos realizados en nuestro laboratorio.

En el primero de ellos se analizaron aislamientos obtenidos de canales de cerdo y derivados cárnicos durante el periodo 2008-2012. Fue realizado por Cristina Cuervo (2013), como Trabajo Fin de Master:: “Tipificación molecular y resistencia a antimicrobianos en *Salmonella enterica* serotipo Derby procedente de canales de cerdo y alimentos cárnicos”

El segundo se centró en aislamientos clínicos recogidos en distintos hospitales de Asturias durante el periodo 2008-2012. Fue realizado por mí como Tesina. : “Perfiles de resistencia a antimicrobianos y tipificación de aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* serotipo Derby procedentes de hospitales de Asturias” (Granda, R., 2014).

La comparación de los resultados obtenidos en esos trabajos y en el actual se muestra en las Tablas 10 y 11

Comparación de los aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby procedentes de derivados cárnicos

De acuerdo con la amplia utilización de ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclina y quinolonas en medicina, veterinaria, agricultura y/o como promotores del crecimiento animal, las resistencias a estos antimicrobianos fueron detectadas y parecen ser relativamente frecuentes en *S. Derby*.

Los genes responsables más comunes hallados son: *tet(A)* en el caso de las tetraciclinas, *aadA1* y *aadA2* para estreptomicina, *sul1* y en menor medida *sul2* en el caso de las sulfonamidas, y *bla_{TEM-1}* en ampicilina. En cuanto a los elementos genéticos implicados se hallaron los transposones *Tn1721*, *Tn10* y *Tn3*, siendo el primero el más frecuente. Aunque las bases genéticas de la resistencia a ácido nalidíxico no se establecieron en el presente trabajo, los 4 aislamientos resistentes a este antimicrobiano, caracterizados en el estudio anterior, presentaron la misma mutación en el gen *gyrA* que cambia Asp₈₇ por Asn.

En cuanto a la tipificación de los aislamientos procedentes de productos cárnicos mediante XbaI-PFGE, se observó que el perfil X6 fue compartido por cinco aislamientos (19/11, 20/11, 21/11, 22/11 y 23/11); seguido del perfil X10, mostrado por los tres aislamientos del presente estudio (65/14, 395/14 y 396/14). El resto de los perfiles detectados fueron distintos.

Tabla 10. Aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby procedentes de productos cárnicos del periodo comprendido entre 2008 y 2014.

Aislamiento	Origen	Fenotipo	Genotipo	EGM	Perfil – P	Perfil – X
LSP 14/08	Chorizo criollo	NAL-STR-SUL-TET	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn) - <i>aadA2-sul1-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P1	X1
LSP 293/08	Canal porcino	STR-SUL-TET	<i>aadA2-sul1-sul2-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P2	X2
LSP 63/09	Canal porcino	STR-SUL-TET	<i>aadA2-sul1-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P3	X3
LSP 4/11	Picadillo de cerdo	TET	<i>tet(B)</i>	Tn10	P4	X4
LSP 6/11	Chorizo criollo	Sensible			P5	X5
LSP 19/11	Picadillo de cerdo	NAL	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn)		P6	X6
LSP 20/11	Picadillo de cerdo	NAL	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn)		P6	X6
LSP 21/11	Picadillo de cerdo	NAL	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn)		P6	X6
LSP 22/11	Picadillo de cerdo	NAL	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn)		P6	X6
LSP 23/11	Picadillo de cerdo	NAL	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn)		P6	X6
LSP 73/12	Canal porcino	AMP-STR-SUL-TET	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>aadA2-sul2-tet(A)</i>	Tn3	P7	X7
LSP 216/12	Derivado cárnico	AMP-NAL-TET	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>gyrA</i> _(Asp87/Asn) - <i>tet(A)</i>		P8	X8
LSP 217/12	Derivado cárnico	NAL-TET	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn) -ND		P9	X9
LSP 65/14	Derivado cárnico	STR-SUL-TET	<i>aadA-sul1-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P10	X3
LSP 395/14	Derivado cárnico	NAL-STR-SUL-TET	<i>ND-aadA-sul1-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P4	X3
LSP 396/14	Derivado cárnico	STR-SUL-TET	<i>aadA-sul1-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P4	X3

LSP, Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; P, perfil plasmídico; X, perfil XbaI-PFGE.

ND, no determinado; Los aislamientos caracterizados en el presente trabajo se muestran en azul.

Comparación de los aislamientos clínicos de *S. enterica* serotipo Derby

Al comparar los 15 aislamientos procedentes de muestras clínicas (heces) se observan 7 perfiles de resistencia diferentes, siendo el mayoritario: *aadA-sull-tet(A)*, compartido por 7 aislamientos (70/08, 138/08, 20/10, 39/13, 231/13, 270/13 y 110/14), entre los que se encuentran los cuatro aislamientos clínicos del presente trabajo. Destacar que 6 de ellos comparten el mismo perfil XbaI-PFGE, denominado X2.

Además, los 7 aislamientos comparten los mismos elementos genéticos móviles: Integrón de clase 1 con el gen *aadA1* en su región variable y el gen *sull* en el segmento 3'CS y el transposón Tn1721. Aunque el número de aislamientos analizados en conjunto, fue reducido, podríamos estar ante el perfil de *S. Derby* más común en el Principado de Asturias. Este perfil también se encontró en aislamientos derivados de productos cárnicos, apoyando que la carne de cerdo es un importante vehículo de transmisión de este serotipo a los seres humanos. En el caso del aislamiento 70/08 el resultado fue negativo, lo cual podría explicarse porque Tn1721 podría haberse delecionado o porque el gen *tet(A)* tuviera una localización distinta.

Sin embargo, el perfil plásmidico que presentan es distinto, encontrándose desde plásmidos de mas de 100 Kb en algunos de ellos hasta otros de tamaño más pequeño (entre 2 y 6 pb), que se distribuyen en 11 perfiles diferentes. Como se indicó anteriormente, la importancia de estos plásmidos para la bacteria tendría que ser determinada en estudios posteriores, siendo de particular interés los de gran tamaño.

Aunque las bases genéticas de la resistencia a ácido nalidíxico no se establecieron en el presente trabajo, los 4 aislamientos resistentes a este antimicrobiano, caracterizados en el estudio anterior, presentaron la misma mutación en el gen *gyrA* que cambia Asp₈₇ por Asn.

También se halló en este grupo de aislamientos la mutación en el gen *gyrA* que justifica la resistencia a ácido nalidíxico (Asp₈₇ por Asn).

Al comparar ambos estudios se ha visto que existe coincidencia de perfiles XbaI-PFGE. Se encontró el mismo perfil X2 en aislamientos derivados de productos cárnicos

(dicho perfil es denominado como X3 en la tabla correspondiente a dichos aislamientos).

Tabla 11. Aislamientos de *S. enterica* serotipo Derby procedentes de muestras clínicas del periodo comprendido entre 2008 y 2014.

Aislamiento	Procedencia	Fenotipo	Genotipo	EGM	Perfil - P	Perfil - X
LSP 70/08	Hospital de Jove	STR-SUL-TET	<i>aadA-sull-tet(A)</i>	In1	P1	X1
LSP 138/08	Hospital de Cabueñes	STR-SUL-TET	<i>aadA-sull-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P1	X2
LSP 217/09	HUCA	NAL-STR-TET	ND-ND- <i>tet(B)</i>	Tn10	P2	X3
LSP 20/10	HUCA	STR-SUL-TET	<i>aadA-sull-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P3	X2
LSP 66/10	Hospital de Jarrío	Sensible			P4	X4
LSP 176/10	HUCA	AMP-NAL	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>gyrA</i> _(Asp87/Asn)		P5	X5
LSP 199/10	Hospital de Jarrío	AMP-NAL-STR-TET	<i>bla</i> _{TEM-1} - <i>gyrA</i> _(Asp87/Asn) -ND- <i>tet(A)</i>		P5	X5
LSP 48/11	Hospital de Cabueñes	Sensible			P6	X6
LSP 185/11	Hospital Monte Naranco	NAL-TET	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn) -ND		P7	X7
LSP 224/12	HUCA	STR-TET	ND-ND		P8	X8
LSP 232/12	Hospital de Cabueñes	NAL-TET	<i>gyrA</i> _(Asp87/Asn) -ND		P9	X9
LSP 39/13	HUCA	STR-SUL-TET	<i>aadA-sull-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P10	X2
LSP 231/13	Hospital Valle del Nalón	STR-SUL-TET	<i>aadA-sull-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P11	X2
LSP 270/13	HUCA	STR-SUL-TET	<i>aadA-sull-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P11	X2
LSP 110/14	HUCA	NAL-STR-SUL-TET	ND- <i>aadA-sull-tet(A)</i>	In1, Tn1721	P10	X2

LSP, Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; P, perfil plasmídico; X, perfil XbaI-PFGE.

ND, no determinado; Los aislamientos caracterizados en el presente trabajo se muestran en azul.

CONCLUSIONES

1. El análisis de la susceptibilidad/resistencia de aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* serotipo Derby frente a los 7 antimicrobianos, junto con la identificación de los genes responsables, reveló 2 perfiles diferentes.
2. Las resistencias frente a estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclinas, codificadas por los genes *aadA*, *sulI* y *tet(A)* son las más frecuentes en aislamientos de *S. Derby*, tanto de muestras clínicas como de derivados cárnicos. El amplio uso de estos antimicrobianos en medicina, ganadería y/o agricultura explica la selección de las resistencias encontradas.
3. Tanto en aislamientos clínicos como de alimentos de *S. Derby*, el integrón de clase 1 *aadA/sulI* y el transposón Tn1721 [*tet(A)*] están ampliamente distribuidos, desempeñando un importante papel como vehículos de genes de resistencia.
4. El análisis plasmídico de los aislamientos clínicos de *S. Derby* mostró 3 perfiles distintos, observándose numerosos plásmidos de pequeño tamaño, comprendidos entre 2 y 6 Kb. Una mayor diversidad de plásmidos se había encontrado en estudios anteriores.
5. El perfil XbaI-PFGE compartido por todos los aislamientos caracterizados en el presente trabajo ya había sido detectado en anteriores, lo que indica su persistencia temporal.
6. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de aislamientos con características idénticas o similares en muestras clínicas y de alimentos, confirmando a la carne de cerdo como vehículo de transmisión de *S. Derby* a seres humanos.

BIBLIOGRAFÍA

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

Barrow P.A. (1999). Virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. En: Saeed A.M. (Ed.) *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals, Iowa State University Press, Ames, USA, pp. 173-181.

Coll, P., Coque, M.T. Domínguez, M.A., Vazquez, J. y Vila, J. 2005. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos en microbiología*.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. M100-S19 vol. 29 N°3.

Cuervo, C. 2013. Tipificación molecular y resistencia a antimicrobianos en *Salmonella enterica* serotipo Derby procedente de canales de cerdo y alimentos cárnicos. Proyecto Fin de Máster, Máster en Biotecnología y Seguridad Alimentaria. Universidad de Oviedo.

Davies, J. (1994). Origin, acquisition and dissemination of resistance genes. *Science*. 264: 375- 382.

De Toro, M. 2013. Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en *Salmonella enterica*. Mecanismos moleculares y elementos de movilización génica. Tesis Doctoral, Universidad de la Rioja.

Ellermeier C. D and Slauch J. M. 2006. The genus *Salmonella*. pp. 123-158. In: *The Prokaryotes*. 3rd Ed. Dworkin. M., Falcow. E., Rosenberg. E., Schleifer. K. H. y Stackebrandt. E. (eds). Springer.

European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal* 7(12):1377.

European Food Safety Authority (EFSA). 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* 13(2):4036

Garcia, P. 2013. Bases moleculares de la resistencia y la virulencia en la variante monofásica 4,[5],12:i:- de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo.

Granda, R., 2014. Perfiles de resistencia a antimicrobianos y tipificación de aislamientos clínicos de *Salmonella enterica* serotipo Derby procedentes de hospitales de Asturias. Tesina. Universidad de Oviedo.

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

Kado, C.I. and Liu, S. 1981. Rapid Procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology.* 145:1365-1373.

Martinez, N. 2007. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo.

Martínez, N., Mendoza M.C., Rodríguez I., Soto S., Bances M., and M. R. Rodicio. 2007. Detailed structure of integrons and transposons carried by large conjugative plasmids responsible for multidrug resistance in diverse genomic types of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg. *J Antimicrob Chemother* 60:1227-1234.

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

Popoff, M. Y. 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Institut Pasteur.

Prescott, L.M, Harley, J.P., and Klein, D.A. 2004. Microbiología 5ª Ed. McGraw-Hill. Interamericana.

Rabsch W., Andrews H.L., Kingsley R.A., Prager R., Tschape H., Adams L.G., Braumler A.J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect. Immun.* 70: 2249-2255.

Recchia G.D., Hall R.M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* 10:389-94.

Roberts, M.C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Letters* 19:1-24.

Rodríguez, I., Martín M. C., Mendoza, M. C. and Rodicio M. R. 2006. Class 1 and class 2 integrons in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica*. Structure and association with transposons and plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58:1124-1132.

Rowe-Magnus, D.A., Mazel, D. 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Our opin Microbiol* 4, 565-569.

Sefton A.M. (2002). Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs.* 62: 557-566.

Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C. and Ploy, M. C. 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* 3:119.

White, P. A., McIver, C. J. and Rawlinson, W. D. 2001. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2658-2661.

Yousef, A. E. and Carlstrom, C. 2006. *Microbiología de los Alimentos: Manual de Laboratorio*, 2006. Acribia SA.