

eman ta zabal zazu

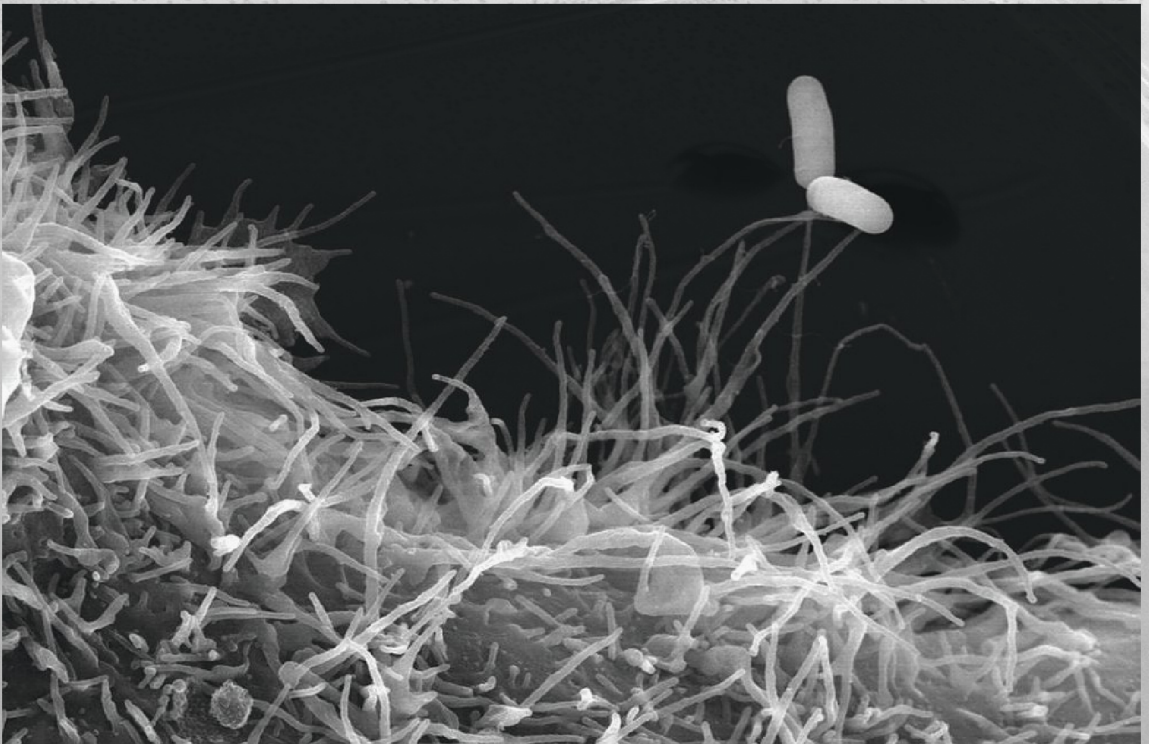


UPV EHU

Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

Inmunología, Mikrobiología eta Parasitología saila

*Salmonella enterica-ren andui monofasikoen  
karakterizazio molekularra eta epidemiologikoa*



Lorena Laorden Muñoz

Zuzendariak:

Javier Garaizar Candina

Silvia Herrera León

Doktorego Tesia

2014ko uztaila

© Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU)  
- *Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Argitalpen Zerbitzua*  
- University of the Basque Country - UPV/EHU Press  
- **ISBN: 978-84-9082-350-7**

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

## DOKTOREGO-TESIA

# ***Salmonella enterica*-ren andui monofasikoen karakterizazio molekularra eta epidemiologikoa**

LORENA LAORDEN MUÑOZ

(lorena.laorden@ehu.eus)

ZUZENDARIAK:

Dr. JAVIER GARAIZAR CANDINA

Dra. SILVIA HERRERA LEÓN

Vitoria-Gasteiz, 2014ko uztaila





Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

**ACTA DE GRADO DE DOCTORA**  
**ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL**

DOCTORANDA DÑA. **LORENA LAORDEN MUÑOZ**

TITULO DE LA TESIS: **“Caracterización molecular y epidemiológica de cepas monofásicas de *Salmonella enterica*”**

El Tribunal designado por la Comisión de Postgrado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por la doctoranda y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por \_\_\_\_\_ la calificación de:  
*unanimidad ó mayoría*

*SOBRESALIENTE / NOTABLE / APROBADO / NO APTO*

Idioma/s de defensa (en caso de más de un idioma, especificar porcentaje defendido en cada idioma): \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: \_\_\_\_\_

Dr/a: \_\_\_\_\_

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: \_\_\_\_\_

Dr/a: \_\_\_\_\_

Dr/a: \_\_\_\_\_

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: \_\_\_\_\_



*Nire familiari*

*Arkaitzi*

*Nire inguruan dauden guztiei*





*Atal honetan esker onak adierazi nahi diet lan hau posible izatea egin duten persona guztiei*

*Hasiera batean nire zuzendariei, Javier Garaizar Candina doktorea, Mikrobiologia irakasle titularra eta Silvia Herrera León doktorea, Mikrobiologia Zentru Nazionaleko Bakteriologia Zerbitzuko Enterobakterien Ataleko arduraduna, proiektu hau egiteko aukera eta eskeinitako jakinduria eta laguntza eskertzeak.*

*Eskertu nahi diet nire ikerketa-taldeko partaideei nigan jarritako konfidantza, euren laguntza eta sostengua urte hauetan zehar. Bereziki, Joseba Bikandi doktoreari, Mikrobiologiako irakasle titularra, eta Ilargi Martínez doktoreari, beren parte-hartzeagatik, niri transmititutako esperentziagatik eta egunero eskainitako laguntzagatik. Baita Aitor Rementería doktoreari, bere aholkuengatik eta gomendioengatik batez ere lan honen atal teknikoenetan. Zuek, bostak, izan zarete doktorego-tesi honen giza-oinarria eta lan-talde ezinhobea osatzen duzue elkar.*

*Une ezberdinetan aholkuak, ekarpenak edo euskarri-emozionala eskaini duten persona guztiei eskerrak eman nahi diet. Haien artean, Zientzia eta Teknologia fakultateko Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia saileko kideak, Maite, Ana, Zuriñe eta Vane, eta sail honetan ere esker beroenak Andoni Ramírez doktoreari bere laguntzagatik bai ikerketan baita une latzetan eskainitako txantxa bereziengatik. Eskerrik asko benetan eremu honetan irakatziz dizkidazun gauza guztiengatik eta gomendioak emateko inbertitutako denboragatik.*

*Azkenik, Aurora Echeita doktoreari eskertu behar diot doktorego-tesi honen hasieratik laguntza eskaintzeaz, baita Mikrobiologia Zentru Nazionaleko Bakteriologia Zerbitzuko Enterobakterien Atalean onartzeagatik eta irakasteagatik ere. Ahaztu gabe nozki laborategiko kideak eta Legionella-ko neskak ere nozki, beti nire egonaldietan zehar hor egoteagatik, laguntzeko prest, pozgarriak eta aholkularitza eskaintzeko prest, baita nire poza partekatzeagatik "banda" bat lortzen nuen aldi bakoitzean. Bereziki Vero eta Sergiori, zuen laguntza eta adiskidetasuna betirako izango ditut nire baitan.*

*Egonaldi hauetan badira hiru neska era berezian lagundu nindutenak, bere etxeetan onartu izanagatik benetan mila esker Sara, María Usera eta azkenik Siloia, azkenengo momentuan kriston ahalegina egin zenuen nigatik.*

*Ikerketa hau ez litzateke arrakastatsua izango nire ikerkuntza-kideen kolaborazio baliotsurik gabe. Solas-aldietan, afarrietan, egin didaten komentarioetan...*

*zientifikoak edo ez, lagundu naute ideiak emanez, animoak, gomendioak edo une berezietan barre egin dugu elkar, denbora luzez egon baikara elkar, bai laborategian zein kongresu-bidaietan, kurtsoetan... Eskerrak Ilargi, Carolina, María, Toño, Andrea, Ceci, Irati, Tere eta Raúl (departamentuko jakituna), han zeuden ni heltzean eta geroago heldu zirenak, Sara, Maialen, Héctor, Blanca eta Ylenia.*

*Era berean bizitza osan zehar elkarrekin izan ditudan neska zoragarrienei eskerrak eman behar dizkiet, nire kuadrilari. Esker onak beti euskarri moduan jokatzegatik, zenbtu ezina da zuengandik jaso dudana laguntza eta hitz gozoak, ez daukat kidetasun hau eskertzeko hitz nahikorik, benetan neskak hoberenak zarete, zuen laguntzarik gabe hau ez litzateke posible izango.*

*Nola ez Arkaitzen lagunengandik jaso ditudan animengatik, mila esker!*

*Eta nola ez niretzat munduko persona garrantzitsuenei, nire familiari, lanetik kanpo ego narren beti zaindu eta lagundu nauzue makina aurrera eramaten, nire osaba-izebei, aiton-amonei, lehengusu-lehengusinei eta nola ez ahaztu gabe nire Unax eta Arkaitzen familia, jadanik nire baitan zaudete ere. Badira niretzat ezinbestekoak diren hiru persona eta doktorego-tesi hau beraietzat da, haiek bait dira hau aurrera egitearen eragile nagusiak, ama, Adri eta bereziki zuri, Arkaitz. Inoiz ez bakarrik usteagatik, positiboagoa izaten laguntzeagatik, naizen moduan izaten laguntzeagatik eta beti hor egoteagatik, nire alboan, eskerrik asko, maite zaituztet.*

*Nire esker onak igortzen diet Tribunaleko jaun-anderei lan hau epaitzea onartu izanagatik.*

*Azkenik, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitateari, esker onak ematen diot Ikerketzaileen prestakuntzarako beka eman izanagatik, lan hau egiteko aukera eman didalako.*

# Laburpena

---

Salmonelosisia, *Salmonella* generoko bakterioak eragindako janari intoxikazio ohikoenetarikoa bat da herrialde garatuetan eta gastroenteritis zorrotza da manifestazio nagusia. *Salmonella enterica* XIX mendetik ezaguna den patogeno bat da, eta gaur egun 2.500 serotipoak baino gehiago deskribatuta daude. Hala ere, guztiak ez dute garrantzi bera izan, eta lagin klinikoetan maiz isolatuak direnak izan dira kontrol eta segimendu epidemiologiko sakonagoa jaso dituztenak. *Salmonella*-ren birulentzia oso konplexua da eta ikaragarri aldatzen da serotipoen eta serotipo beraren barruan dauden anduien artean.

Bariante monofasiko berrien agerpena azken urteen eskusiboa ez izan arren, gaur egun biologia molekularrean eskuragarri dauden erremintak erraztu dute aurrez karakterizatu gabe zeuden barianteen gehiagoren identifikazioa. Doktore-tesi honen lana oinarritu zen gure herrialdean zirkulatzailerak diren Typhimurium serotipoko 4,[5],12:i:- bariante monofasikoaren isolatuen karakterizazio molekularrean, baita azken urteetan garrantzi klinikoko beste isolamendu monofasikoena: 4,5,12:b:- eta 4,12:d:- isolatuena, bere jatorri ebolutibo posiblea identifikatzen saiatuz. Era berean eta bigarren helburu bezala ikerkuntza proiektu honetan zehar diseinatutako eta erabilitako erreminta epidemiologikoak eskaintzea bariante monofasiko berri hauen detekzioa, kontrola eta segimendua hobetzeko.

Lan honetan karakterizatutako barianteen jatorria eta eboluzioa, mutazioen, hautespen-naturalaren eta isolamenduaren ondorioa dira, hain zuzen ere elementu genetiko mugikorren transposizioaz eraginda izan daitezkeela. Elementu genetiko transposagarriak edo transposonak 70. hamarkadan aurkitu ziren eta IS1 izan zen identifikatutako lehenengo insertzio sekeuntzia, *E. coli*-n.

Insertzio-sekuentziak Baketrio Gram-negatiboen kromosomaren edo plasmidoen osagai arruntak bezala agertzen ziren. Normalean IS-ak DNAREN zonalde konkretuekiko preferentzia. Normalean IS-ek lehentasuna erakusten dute DNAko eskualde zehaztuetan txertatzeko, zeinek iradokitzen du IS-en mutur terminalek zenbait itu-sekuentzia ezagutu ditzaketela kromosoman zeharreko txertatze-prozesuan.

Lan honetan 4,[5],12:i:-, 4,5,12:b:- eta 4,12:d:- formula antigenikoekiko lau isolatuten bildumak karakterizatu dira, fagotipifikazioaren, antibitipifikazioaren, PFGE-a, MLVA, PCR-a eta sekuentziazioaren bitartez. Lortutako datuekin 1 eta 2 bildumetako anduiak *Salmonella* Typhimurium-etik datozela ondorioztatu ahal izan da, hala ere haien artean lerro ebolutibo desberdinak bereizten dira.

Lehen bilduma osatzen duen klonak, *Salmonella* Typhimurium U302 fagotipodun andui batetik dator, pU302L plasmidoarekin eta R-ACSuGSTSxT erresistentzia anitzetako profilarekin, bertan pU302L plasmidoko IS26-ren hirugarren kopiak kromosomaren sekuentzia ezagun bat detektatzean bigarren faseko flageloaren delezioa sortuko lukeen toki horretan txertatu ondoren eta gertaera hau gutxienez hiru aldi desberdinetan gertatuko zen baina delezioaren hasiera beti puntu berean izango zen. Antzemandako homogeneotasun altua sailkatzen ditu andui hauek klon bereko kideak bezala, eta beste egile batzuek klon espainiarra bezala izendatu dute. Bigarren bilduman beste bi lerroak bereizten dira, non bildumako lehenengo hiru anduiak oso antzekoak diren Estatu Batuetan deskribatutako anduiekin eta berriz, jatorria edo andui monofasiko amerikarrekiko arbaso komuna seinalatuz, eta gure herriko

gainerako anduietatik diferentziatuz. Bigarren bilduman tamaina txikiagoko delezioekin karakterizatutako gainerako anduek, haien artean bakarrik dute komunean tetraerresistentzia-profila eta IS26 sekuentziaren txertaketaren amaiera-puntua, klon europarraren ezaugarri nagusiak seinalatuz. Hala ere PFGE-ak, MLVA-k eta delezioaren PCR-ak erakutsitako desberdintasunek, adierazten dute ez dutela denbora hurbilean jatorri komuna, baina haien artean badaude hertsikiago erlazionatuta deskribatutako beste bi lerroekin baino. Bilduma honetan hiru isolatu monofasiko detektatu dira eta formula antigenikoan bigarren faseko flageloaren gabezia seinalatzen da, baina PCRren eta sekuentziazioaren bidez egiaztatu da *fljB* genea oraindik mantentzen dutela hainbat IS26 sekuentziaz jarraituta, andui hauek bildumaren barianteek eboluzionatuko luketen arbasoaren antzekoak izan litezke.

*Salmonella enterica*-ko 4,5,12:b:- anduiak lan honen hirugarren bilduman analizatuta, *Salmonella* Paratyphi B dT(+)-ren hirugarren lerro klonaletik datozen bariante monofasikoak dira eta antibiotikoekiko aurkako erresistentziarik gabe. Dena den, salbuespena, tartratoa metabolizatzeko gaitasuna ez duen anduia (dT-) *Salmonella* Paratyphi B dT(-)-tik etorriko litzateke. Delezioa isolatu gehienetan karakterizatu arren, ez dira datu nahikorik lortu delezioan inplikaturako gertaera genetikoa ezagutzeko. Isolatuen gehiengoak *fljB* genearen alboko 27 generen delezioa aurkezten dute. Delezioa transposasa batek eragin ahal izan zuen, baina geroago bere egituraren zati bat galdu zuen 281 bp-eko zati erabilezina utziz. PFGE-ak bariante honetako anduien arteko aniztasun handia erakusten du. Hala ere A pultsotipo barruan, anduek homologia altua aurkeztu dute eta gainera deskribatutako delezioa aurkeztu zutenak dira. Beste lau pultsotipoen artean biltzen dira karakterizatu

gabeko delezioa zuten anduiak. Ondorioztatu genuen beraz, 10 andui hauek lerro ebolutibo desberdinetakoak izan litezkeela eta ondorioz, bigarren faseko flageloaren sintesian inplikaturako generen delezioaren mota desberdinak aurkeztea.

*Salmonella enterica*-ko 4,12:d:- anduiak laugarren bilduma osatzen dutenak *Salmonella* Schwarzengrund-etik datozen bariante monofasikoak dira eta oso homogeneousak direnez, klon bera osatu lezakete. Delezionatu diren hamaika generen artean bigarren faseko flageloaren sintesian inplikaturako geneak aurkitzen dira eta delezioa IS30 batek sortu zuen. Bariante hau homogeneousutasun altua erakutsi du PFGE zein antibiograma-datueta, baita karakterizatutako delezio motan ere. Beste aldetik, IS30-aren txertatzearen amaiera muturra klon europarraren anduietan deskribatutako nukleotido berarekin bat dator.

Azkenik, lan honen konklusio bezala baieztatu dezakegu bigarren faseko flageloaren sintesiaren zonaldea insertzio-sekuentzien edo transposonen txertaketarako puntu beroa dela eta *Salmonella enterica*-ko anduietan bigarren faseko flagelinaren sintesi-ahalmenean eragiten dutela. Hala ere, huts honek ez du desabantaila ebolutiboa ekarri bariante-mota hauetarako.

**AURKIBIDEA**

<b>SARRERA</b>	<b>1</b>
<b>1. Aipamen historikoa</b>	<b>3</b>
<b>2. <i>Salmonella</i> generoaren ezaugarri orokorrak</b>	<b>4</b>
2.1. Fisiologia	4
2.2. Identifikazioa	5
2.3. Filogenia	12
2.4. Taxonomia	15
2.5. Habitata	17
2.6. Epidemiologia	19
2.7. Patogenizitatea	22
2.8. Zeinu-klinikoak, diagnostikoa eta tratamendua	24
2.9. Genomika	26
<b>3. <i>Salmonella</i>-ren karakterizazio epidemiologikoa</b>	<b>27</b>
3.1. Tipifikazio metodo fenotipikoak	28
3.1.1. Serotipifikazioa	28
3.1.2. Profil biokimikoa	30
3.1.3. Fagotipifikazioa	30
3.1.4. Antimikrobianoen erresistentzia profila	31
3.2. Tipifikazio metodo genotipikoak	32
3.2.1. Elektroforesia eremu pulsatuko gelean (PFGE)	32
3.2.2. Errepikapen kopuru aldakorreko tandem multilokus analisia (MLVA)	34
3.2.3. Polimerasaren kate-erreakzioa (PCR)	37

---

3.2.4. Genoma osoaren sekuentziazioa (Hurrengo belaunaldiko sekuentziazioa, NGS)	39
<b>4. Inertzio sekuentziak</b>	<b>41</b>
<b>5. Aztertutako anduien aurrekariak</b>	<b>45</b>
5.1. <i>Salmonella</i> Typhimurium	45
5.1.1. <i>Salmonella enterica</i> 4,5,12:i:-, U302 fagotipoa eta erresistentzia anitzekoa	48
5.1.2. <i>Salmonella enterica</i> 4[5]12:i:-, tetrarresistenteak	50
5.2. <i>Salmonella</i> Paratyphi B	50
5.3. <i>Salmonella</i> Schwarzengrund	54
<b>HELBURUAK</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALAK ETA METODOAK</b>	<b>61</b>
<b><i>Salmonella enterica</i> isolatuak</b>	<b>63</b>
<b>1. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> 4,5,12:i:- bariante monofasikoa U302 fagotipoa. I. bilduma</b>	<b>64</b>
1.1. Elektroforesia eremu pulsatuko gelean (PFGE)	67
1.1.1. Agarosa blokeen prestakuntza	67
1.1.2. Bakterioen lisia agarosa blokeetan	68
1.1.3. DNAREN digestioa	68
1.1.4. Elektroforesia	68
1.1.5. Tindaketa eta irudia lortzea	69
1.1.6. Banda-profilen azterketa	69



---

1.2. Errepikapen kopuru aldakorreko tandem-en multilocus analisi (MLVA)	70
1.3. <i>fljB</i> genearen delezioaren ikerketa	71
1.3.1. DNA erauzketa	71
1.3.2. Polimerasaren kate-erreakzioa (PCR) eta sekuentziak	72
1.4. pU302 plasmidoaren presentziaren azterketa	
IS26 insertzio sekuentziaren zundarekin	75
1.4.1. S1 nukleasaren bidezko liseriketa	75
1.4.2. Lambda fagoaren konkatemeroen markatzea	76
1.4.3. IS26 zundaren prestakuntza	76
1.4.4. Hibridazioa IS26 zundarekin	77
1.4.4.1. PFGE-S1 gelaren tratamendua	77
1.4.4.2. Transferentzia mintzera	77
1.4.4.3. DNAREN finkapena	78
1.4.4.4. Aurrehibridazioa	79
1.4.4.5. Hibridazioa	79
1.4.4.6. Errebelazioa	79
<b>2. Fagotipo ezberdineko <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> 4,[5],12:i:- bariante monofasikoa</b>	
<b>II. bilduma</b>	81
2.1. <i>fljB</i> genearen delezioaren ikerketa	82
2.1.1. Geneen kokapen-mapa	82

---

2.1.2. Polimerasaren kate-erreakzioa tamaina handiko fragmentuak lortzeko ( <i>Long-PCR</i> )	85
2.1.3. Kateaturiko sekuentziazio teknika ( <i>Walking-primer</i> )	87
2.1.4. Genoma osoaren sekuentziazioa	89
<b>3. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> 4,5,12:b:- bariante monofasikoa. III. bilduma</b>	<b>90</b>
3.1. Subespezia determinatzeko PCRa	91
3.2. Java barietatearen determinaziorako PCR espezifikoa	92
3.3. <i>fljB</i> genearen delezioaren ikerketa	93
3.3.1. <i>fljA</i> , <i>fljB</i> , <i>hin</i> , <i>iroB</i> eta <i>iroC</i> geneen detekziorako PCRak	93
3.3.2. Geneen kokapen-mapa	93
3.3.3. Alderantzizko PCRa eta sekuentziazioa	94
3.4. PCR eta sekuentziazioa	98
<b>4. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> 4,5,12:d:- bariante monofasikoa. IV. bilduma</b>	<b>99</b>
4.1. <i>fljB</i> genearen delezioaren ikerketa	100
4.1.1. Geneen kokapen-mapa	100
4.1.2. Alderantzizko PCRa eta sekuentziazioa	101
4.1.3. <i>Long-PCR</i> eta sekuentziazioa	101

<b>EMAITZAK</b>	<b>103</b>
<b>1. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> 4,5,12:i:- bariante monofasikoa U302 fagotipoa. I. bilduma</b>	<b>105</b>
1.1. Elektroforesia eremu pultsatuko gelean (PFGE)	105
1.2. Errepikapen kopuru aldakorreko tandem-en multilocus analisia (MLVA)	105
1.3. <i>fljB</i> genearen delezioaren ikerketa	108
1.4. pU302 plasmidoaren presentziaren azterketa IS26 insertzio sekuentziaren zundarekin	112
<b>2. Fagotipo ezberdineko <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> 4,[5],12:i:- bariante monofasikoa II. bilduma</b>	<b>115</b>
2.1. Elektroforesia eremu pultsatuko gelean (PFGE)	115
2.2. Errepikapen kopuru aldakorreko tandem-en multilocus analisia (MLVA)	116
2.3. <i>fljB</i> genearen delezioaren ikerketa	118
2.3.1. Geneen kokapen-mapa	118
2.3.2. Polimerasaren kate-erreakzioa tamaina handiko fragmentuak lortzeko ( <i>Long-PCR</i> )	119
2.3.3. Genoma osoaren sekuentziazioa (NGS)	131
<b>3. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> 4,5,12:b:- bariante monofasikoa. III. bilduma</b>	<b>134</b>
3.1. Elektroforesia eremu pultsatuko gelean (PFGE)	134
3.2. Subespeziea determinatzeko PCRa	136

---

3.3. Java barietatearen determinaziorako PCR espezifikoa	136
3.4. <i>fljB</i> genearen delezioaren ikerketa	136
3.4.1. <i>fljA</i> , <i>fljB</i> , <i>hin</i> , <i>iroB</i> eta <i>iroC</i> geneen detekziorako PCRak	136
3.4.2. Geneen kokapen-mapa	136
3.4.3. Alderantzizko PCRa eta sekuentziazioa	138
3.5. PCR eta sekuentziazioa	141
<b>4. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> 4,5,12:d:- bariante monofasikoa. IV. bilduma</b>	<b>142</b>
4.1. Elektroforesia eremu pulsatuko gelean (PFGE)	142
4.2. <i>fljB</i> genearen delezioaren ikerketa	143
4.2.1. <i>fljA</i> , <i>fljB</i> , <i>hin</i> , <i>iroB</i> eta <i>iroC</i> geneen detekziorako PCRak	143
4.2.2. Geneen kokapen-mapa	143
4.2.3. Alderantzizko PCRa eta sekuentziazioa	144
4.2.4. <i>Long-PCR</i> eta sekuentziazioa	144
<b>EZTABAIDA</b>	<b>147</b>
<b>KONKLUSIOAK</b>	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>189</b>
<b>ARGITARATUTAKO LANAK</b>	<b>215</b>

## **TAULEN AURKIBIDEA**

- 1. Taula.** *Salmonella* espezie/subespezie bakoitzean identifikatutako serotipo kopurua (Grimont *et al.*, 2007-tik egokitua) **15**
- 2. Taula.** NCBIko datubasean eskuragarri eta guztiz sekuentziazatuta dauden *Salmonella* genomak. Sekuentzia horiek ikerlan honetan erabili dira. **27**
- 3. Taula.** MLVAren zenbaki-patroiak lortzeko eta interpretatzeko irizpideak, Larsson *et al.* (2009) lanetik egokitua. **37**
- 4. Taula:** I. bilduma **64**
- 5. taula.** PCR bidez MLVA-ko errepikapenak detektatzeko erabilitako hasleak **71**
- 6. taula.** Anduien I. bilduman, 2. faseko flageloaren delezioaren PCR bidezko anplifikaziorako diseinatutako hasleak **72**
- 7. taula.** Anduien I. bilduman, 2. faseko flageloaren delezioaren inguruko geneen presentzia/absentzia mapa PCR bidez egiteko diseinatutako hasleak. **73**
- 8. taula.** IS26 zundaren prestakuntzan erabilitako errektiboak. **76**
- 9. taula.** II. bilduma. **81**
- 10. taula.** II. bildumako isolatuen ikerketarako espezifikoki diseinatutako hasleak. **83**
- 11. taula.** Delezio mota bakoitzarentzako diseinatutako hasleak **85**

<b>12. taula.</b> Delezio mota bakoitzean lortutako zatiaren sekuentziaziorako diseinatutako hasleak.	<b>88</b>
<b>13. taula.</b> III. bilduma.	<b>90</b>
<b>14. taula.</b> III. bildumako isolatuen karakterizaziorako diseinatutako hasleak	<b>94</b>
<b>15. taula.</b> IV. bilduma.	<b>99</b>
<b>16. taula.</b> IV. bildumako isolatuen karakterizaziorako diseinatutako hasleak.	<b>102</b>
<b>15. taula.</b> PFGE-S1 teknikaren bidez eta IS26-zundaren hibridazioan lortutako datuak islatzen dira.	<b>113</b>
<b>16. taula.</b> Emandako PFGE profila eta bakoitzean lortutako MLVA patroia zehazten da tipifikatutako 13 isolatuetan.	<b>116</b>
<b>17. taula.</b> PCRren bidez amplifikatutako geneak zehazten dira eta lortutako delezio mota hurrenez hurren.	<b>122</b>
<b>18. taula.</b> Aztertutako geneen amplifikazioaren emaitzak isolatu monofasikoetan eta control moduan erabilitako anduietan.	<b>137</b>

## **IRUDIEN AURKIBIDEA**

- 1. irudia.** Flageloaren fase-aldaketaren mekanismoa eta parte hartzen duten geneen kokapena. **10**
- 2. irudia.** McQuiston *et al.*, 2008.ko lanaren arabera moldatutako irudia, eboluzioa milioi urtetan adierazia. **14**
- 3 irudia.** Azaltzen dira serotipo generalisten, ostalari bati egokituen edo hertsien ezaugarriak eta baita ezaugarri klinikoeekin duten erlazioa ere. Feasey *et al.*-en (2012) lanetik egokitua. **18**
- 4. irudia.** VNTR baten delezioa erakusten da. **35**
- 5. irudia.** Kokapen ezberdina eta errepikapen kopuru ezberdina duten VNTRen adibidea. **36**
- 6. irudia.** Transposon bakun (IS) eta konposatuen egitura (Tn). **42**
- 7. irudia.** 2008an Europan plazaratutako salmonelosien kasu kopuruak/100.000 biztanle. ECDC-aren 2008. urteko txosten-epidemiologikotik moldatua. **48**
- 8. irudia.** Lindstedt *et al.* (2003)-ko elektroforesi kapilarreko irudia. Hasle bikote bakoitzeko teknikan lortzen diren 5 zatiak irudikatzen dira. **70**
- 9. irudia.** 200-1.500 bp bitarteko zatien anplifikaziorako diseinatutako PCR programa. **74**

---

<b>10. irudia.</b> IS26 zundaren prestakuntzan jarraitutako anplifikazio programa.	<b>77</b>
<b>11. irudia.</b> Geneen kokapen-mapa zehazteko PCR guztiak egin ziren irudiko programa berarekin.	<b>82</b>
<b>12. irudia.</b> Fabrikatzaileak 12 Kb baino handiagoko zatien lorpenerako zehazten diren urratsen arabera diseinatutako PCR programa (Roche).	<b>86</b>
<b>13. irudia.</b> Sekuentziazio programa	<b>86</b>
<b>14. irudia.</b> LNRSan erabiltzen den PCR programa <i>phoP</i> genearen anplifikaziorako.	<b>91</b>
<b>15. irudia.</b> LNRSan Java barietatearen azterketarako erabili zen PCR programa.	<b>92</b>
<b>16. irudia.</b> PFGEren bidez lortutako taldekatzea. Isolatu bakoitzean isolaketa data, jatorria, formula antigenikoa, fagotipoa erresistentzia profila, delezio mota eta MLVAren bidez lortutako emaitzak zehazten dira (Laorden <i>et al</i> , 2010, JCM).	<b>106</b>
<b>17. irudia.</b> Anplifikatutako zatien tamaina eta deskribapena.	<b>108</b>
<b>18. irudia.</b> Genoman delezionatutako zonaldeatik hurbil dauden geneen kokapena zehazten da erreferentzia moduan erabilitako <i>Salmonella</i> Typhimurium-eko LT2 anduian eta aztertutako <i>Salmonella enterica</i> 4,5,12:i:-	



bariante monofasikoaren 60 isolatuen artean topatutako 4 delezioetan (Laorden <i>et al.</i> , 2010, JCM).	110
<b>19. irudia.</b> NCBI-ko Blast-ean lortutako irudietan zehazten da <i>Salmonella</i> Typhimurium U302-ren pU302L plasmidoaren eta <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2-ren STM2758 genearen eremuak, zeinak ikerketa honetan garrantzitsuak izan diren.	112
<b>20. irudia.</b> PFGE-S1 teknikaren bidez anplifikatutako plasmidoa eta erabilitako markatzailea adierazten dira	114
<b>21. irudia.</b> Dendograma Dice koefizientearen eta UPGMA taldekatzearen arabera eraikita.	115
<b>22. irudia.</b> 1. motako delezioa	122
<b>23. irudia.</b> 3. motako delezioa	125
<b>24. irudia.</b> 4. motako delezioa	127
<b>25. irudia.</b> 5. motako delezioa	130
<b>26. irudia.</b> 2. motako delezioa	133
<b>27. irudia.</b> Dice indizea eta UPGMA taldekatzearen bidez eraikitako dendograma.	135
<b>28. irudia.</b> III. bildumako delezioa	140

- 29. irudia.** Dice indizearen eta UPGMA taldekatzearen bidez  
eraikitako dendograma. **142**
- 30. irudia.** IV. bildumako isolatuen delezioa **146**

UD	Ur Destilatua
ADN	Azido Desoxirribonukleikoa
AMP	Anpizilina
ASM	<i>American Society of Microbiology</i>
ATB	Antibiograma
A <sub>w</sub>	Ur aktibitatea
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Cef	Zefalotina
CHL	Kloranfenikola
Cip	Ziprofloxazona
CNM	Mikrobiologia Zentru Nazionala
CTX	Zeftriaxona
ECDC	<i>European Center for Disease Control and Prevention</i>
EFSA	<i>European Food Safety Administration</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEN	Gentamizina
IR	<i>Inverted Repeat</i>
IS	<i>Insertion Sequence</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeat</i>

## *Laburdurak*

---

Kan	Kanamizina
Kb	Kilo baseak
LB	Luria-Bertani-agarra
LNRS	<i>Salmonella</i> Erreferentzia Laborategi Nazionala
LPS	Lipopolisakaridoa
MLVA	<i>Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis</i>
Na	Azido nalidixikoa
NA	<i>No Amplification</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NT	Tipifikatu ezina
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
bp	Base pareak
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
PMN	Polimorfonuklearrak
PNR	Patroi ezezaguna
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SGI1	<i>Salmonella</i> -ren 1. irla-genomikoa

SID	<i>Simpson´s Index of Diversity</i>
SIM	<i>Sulfide-indol-motility</i>
SPI1	1. patogenizitate-irla
SPI2	2. patogenizitate-irla
STR	Estreptomizina
SUL	Sulfonamida
SxT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TAE	Tris <i>Acetate</i> EDTA
TBE	Tris <i>Borate</i> EDTA
TE	Tris, EDTA
TET	Tetraziklina
Tn	Transposona
TSA	<i>Trypticasein Soy Agar</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UV	Ultramorea
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>



***SARRERA***

---





## 1. Aipamen historikoa

*Salmonella*-k eragindako infekzioa eta zehazki sukar tifoidea antzinatek ezaguna da, eta askotan deskribatua izan da historian zehar (Cunha, 2004). XIX. mendetik dihardu tifus eta sukar tifoideoaren artean dagoen ideia-nahasketa, aurretik zenbait ikerlariak bi gaixotasunak bereiztu izan arren (Miller eta Pegues, 2000; Cunha, 2004).

1885ean, Theobald Smith-ek (1859-1934), Daniel E. Salmon (1850-1914) al baitari estatubatuarraren zuzendaritzapean jardun zuenean, gaur egun *Salmonella choleraesuis* organismoa bezala ezagutzen dena isolatu zuen txerri baten hesteetatik. Joseph Léon Marcel Lignières (1868-1933) bakteriologo frantsesak, 1900. urtean proposatu zuen koleraren eragileak ziren bakterioen multzoa, txerri jatorrikoak, “*Salmonella*” bezala izendatzea Salmon-ren ohorez (Ellermeier eta Schlauch 2006).

Georges Widál (1862-1929) 1896an “aglutinina” kontzeptua erabili zuen Typhi serotipoko zelulak beroarekin hil ondoren serumean sortzen duten aglutinazio prozesua deskribatzeko (Widál erreakzioa). Alde batetik, Almroth Edward Wright (1861-1947) eta bestetik Richard F. J. Pfeiffer (1858-1945) eta Wilhelm Kolle (1868-1935), beroarekin hildako organismoak erabili zituzten sukar tifoideoaren kontrako txertoa diseinatzeko 1896. urtean. Gaur egun ere erabiltzen den txertoa da. Elie Metchnikov-ek (1845-1916) 1911an Koch-en postulatuak jarraitu zituen Typhi serotipoko *salmonella*-k sukar tifoideoaren eragilea zirela baieztatzen. Fritz Kauffmann-ek (1899-1978), P. B. White-n (White, 1926) lanarekin jarraituz, *Salmonella*-ren azterketa serologikoa ezarri zuen 1940. urtetik aurrera (Ellermeier eta Schlauch 2006).

1948an, K. Lilleengen-ek fagoen lisirako sentikortasun ezberdina aurkezten zuten, isolamendu klinikoetatik abiatuz, 25 andui karakterizatu zituen. Andui horiek “Lilleengen Type” bezala izendatu zituen LT1-etik LT25-era (Lilleengen, 1948). Typhimurium serotipoaren LT2 anduia da gaur egun erreferentzi-anduia, zeinaren genoma osoa sekuentziatua izan den (McClelland *et al.*, 2001).

## **2. *Salmonella* generoaren ezaugarri orokorrak**

### **2.1. Fisiologia**

*Salmonella* ssp. Enterobacteriaceae familiako bakterioa da, 0,7-1,5  $\mu\text{m}$  x 2-5  $\mu\text{m}$  neurrikoa eta baziloa, Gram-negatiboa eta aukerazko anaerobioa (Ellermeier eta Schlauch 2006). Mugikorra da flagelo peritrikoen bidez, baina badira flagelarik gabeko barianteak (Neidhart, 1996).

Fisiologiari dagokionez, salmonelen hazkuntza-tenperatura optimoa 37°C-koa da, baina bikoizketa prozesua burutu dezakete tenperatura tarte zabal batean, 7°C-tik 48°C-ra. Bestetik, pH optimoa 6,5-7,5-ekoa da, baina jasan dezakete 4,5 eta 9,5 bitarteko pH-a. Ondo garatzen dira 0,995-eko ur-aktibitatean ( $a_w$ ) (Soto, 2002), dena den, 0,20 ur-aktibitatea duten produktu deshidratatuetan ere denbora luzez biziraun dezakete, eta elikagaietan bikoizteko gaitasuna mantentzen dute 0,93ko  $a_w$  balioetan (Bourgeois *et al.*, 1995). Gatz-biliarren kontzentrazio altuak jasaten dituzte eta hazkuntza ez da galerazten hazkuntza-medio hautakorren diseinurako erabiliak diren koloranteen presentzian (metileno urdina, eosina, kristal-more edo berde distiratsuak adibidez).

## 2.2. Identifikazioa

*Salmonella*-ren identifikaziorako isolaketa burutu behar da, ondoren karakterizazio biokimikoa eta azkenik serotipifikazioa. Hasiera batean *Salmonella*-ren isolamenduak identifikatzeko erabiltzen diren proba biokimikoak katalasa (positibo) eta oxidasa (negatibo); glukosaren eta beste karbohidratoen hartidura (normalean gas ekoizpenarekin), sulfhidrikoaren ekoizpena, lisindeskarboxilasaren aktibitatea, Simmons zitratoan hazteko gaitasuna, indola ez ekoiztea eta urea hidrolizatzeko gaitasuna dira besteak beste. Ez dira zianuro potasikoaren presentzian hazten eta negatiboak dira Voges-Proskauer eta triptofano desaminasarekiko (Mejía, 2003).

*Salmonella*-ren serotipifikazioa egitura antigenikoan oinarritzen da: O antígeno somatikoan (termoegonkorra), H antígeno flagelarrean (termolabilia) eta Vi antígeno kapsularrean (egotekotan). Serologia bakarrik da baliagarria biokimikoki *Salmonella* bezala baieztatutako anduientzat, antiserumak erreazio gurutzatuak izan bait dezakete beste bakterio batzuekin. Serotipoen izendapena Kauffmann-White-Le Minor-en eskeman oinarritzen da (Grimont, 2007).

### **O antigenoa (AgO)**

Antigeno horrek izaera lipopolisakaridikoa du, pareta zelularraren kanpoko-mintzan kokatuta dago, termoegonkorra da eta alkoholarekiko erresistentea. Lipopolisakaridoa (LPS) birulentzia determinante garrantzitsua da bakterio Gram-negatibo gehienetan (Luk *et al.*, 1993). *Salmonella*-ren LPSaren egitura kimikoa 3 atalez osatuta dago: I atala, kanpoaldekoa, O antigenoa osatzen duen azukre-kate batez

osatuta dago (polisakaridoa) dago; II atala nukleoa da eta oligosakaridoz osatuta dago, eta; III atala A lipidoa da (Lüderitz *et al.*, 1966). A lipidoa zati sakonenean dago eta toxikoa da. Horregaitik sarritan endotoxina bezala ezagutzen da (Perry, 1992). A lipidoak, LPSaren molekula osoa txertatzen du bakterioaren kanpo-mintzaren kanpoaldean. Gainera zenbait generotan oso kontserbatuta dago, eta nukleo oligosakaridoa da aldaera bakarra erakutsi duenak orain arte aztertutako *Salmonella*-ko espezie guztietan (Luk *et al.*, 1993). Aitzitik, O polisakaridoko kateak antigenikoki oso aldakorrek dira eta errepikatutako unitateen polimerizazioaz sortzen dira, non hiru-zazpi oligosakarido ezberdin egon ahal diren (Mayer *et al.*, 1989). O katearen aldakortasun antigeniko horrek, *Salmonella*-ren sailkapenaren oinarria da (Luk, 1993). Beraz, *Salmonella* serotipo bakoitzak O antigeno bate do beste izaten ditu, eta batzuk komunak dira *Salmonella* serotipo batzuekiko. Azken horrek ahalbidetzen du serotipo ezberdinak serotaldeetan sailkatzeak

Talde antigeniko edo serotalde ezberdinak karakterizatzeko badira O antigeno nagusiak edo faktore nagusiak; horrela O:12 antigenoak A, B eta D serotaldeko salmonela guztietan agertzen da. Baita O Ag txikiak edo faktore sekundarioak ere daude, faktore nagusi bati lotuta daudenak. O Ag txikiek ez dute sailkapenerako baliorik, ez bait dute diskriminaziorik egiten gainera, batzuk Ag nagusi baten aldaketa kimiko baten ondorioz sortuak dira. Adibidez, O:5 Ag-a, polisakaridoan azetilazio baten bidez sortzen da, eta O:4-ren espezifizitatearen arduraduna dena, B serotaldearen bereizgarria da. Beste batzuk konbertsio fagiko baten ondorioz sortzen dira. Adibidez,

C1 (O:6,7) taldeko *Salmonella* baten lisogenizazioaren ondorioz O:14-ren agerpena eragiten da, O:6,7,14 sortuz; gauza bera gertatzen da K (O:18) taldeko O:6,14 faktoreekin, non O:6,14,18 izatera pasatzen da (Soto, 2002).

Pareta zelularraren polisakaridoaren sintesiaren akatsek, zelularen paretaren egituraren aldaketa eragin dezakete eta gainazaleko zimurtasuna eragin (R, *rough*, mutantea) forma leuna arruntarekin alderatuta (S, *smooth*, *wild-type*, andui basatia edo erreferentziakoa). Akats horrek polisakaridoen sintesian inplikaturako transferasa edo sintetasa baten efektua blokeatzen du. Mutanteak erraz bereizi daitezke kolonien egitura aztertuz, kolonia lauak eta zimurrak sortzen baitira eta ez arbasoenak bezalako ganbilak eta leunak. R formak inguru likidoan berez aglutinatzen eta sedimentatzen dira. Aldiz, S formak ez dira prezipitatzen eta esekidurak uhertasun handikoak dira. R mutanteak, O antigenoarekiko espezifikitatea galtzen dute, baina mantentzen dute H antigeno flagelarrarekiko (Lüderitz *et al.*, 1966).

## **H Antigenoa**

*Salmonella* andui gehienak mugikorrak dira flagelo peritrikoen bidez. Flageloak zelularen gainazalean daude eta oso immunogenikoak dira. O antigenoaren kasuan bezala, aldaketa nabariak aurkezten dituzte zelularen gainazalean txertatuta dauden azpiunitate flagelarren domeinuak. Gainera, I, II, IIIa eta VI subespezieak bifasikoak dira eta beraz bi flagelo sintetizatzeke gai dira (batzutan hiru ere). Funtzioari dagokionez flageloak berdinak dira, baina desberdintasun

immunologikoak aurkezten dituzte, oso baliogarria delarik haien artean bereizteko. H antigenoen arteko ezberdintasun serologikoak Kauffmann-White-Le Minor sailkapenaren bigarren atala osatzen du (Guibourdenche, 2010).

Lehen aipatu den moduan, *Salmonella*-n aurkitzen dira bi flagelo mota edo bi fase ezberdinetako flageloak. Lehenengo faseko H antigenoak letra xehe batekin izendatzen dira “a”-tik “z”-ra. Ondoren “z1”, “z2”, “z3”, etab. Bigarren faseko antigeno flagelarrak zenbakien bidez izendatzen dira, “1”, “2”, “3”, etab edo letren bidez (Ellermeier eta Slauch 2006). H antigenoen determinazioa burutzeko porta edo saio-hodian egindako aglutinazioa erabiltzen da. Hasiera batean H antiserum mistoekin egiten da aglutinazioa. Antiserum nahaste horiek diseinatuak izan dira H antigeno ohikoenak O talde jakin batzuekin erlazionatuta azaltzen direlako. (Brenner eta McWhorter-Murlin, 1998).

Gehieneko anduian lehenengo eta bigarren faseko H antigenoak adierazi daitezke txandaka, hau da inoiz ez dira biak aldi berean adierazten. Dena den, indibidualki isolatutako kolonia freskoek fase bakarra adierazi dezakete, lehenengoa edo bigarrena. Beste fasea determinatzeko, fase aldaketa eragin daiteke. Horretarako anduia mugikortasun-agarrean inokulatzen da, non anti-H seruma dago eta serum horrek ezaguna den flagelo motarekiko aglutinazioa eragingo du. Serumeko antigorputzak geldiarazi egingo dute hasierako H antigenoa espresatzen zuten zelulak eta ondorioz fase aldaketa egin dutenak eta H antigeno berria espresatzen duten zelulen mugimendua ahalbidetuz.

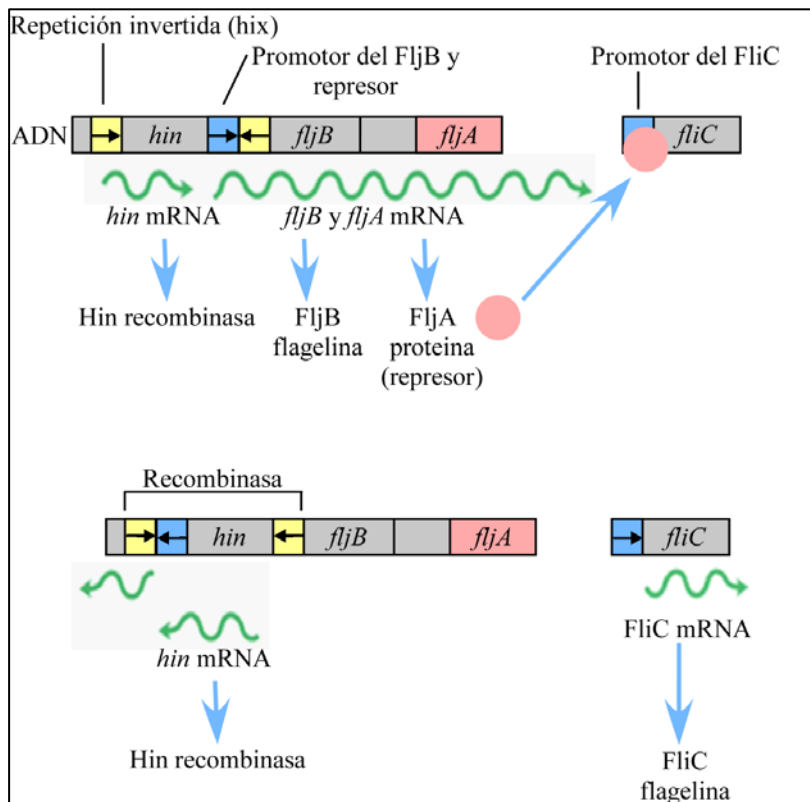
Zelula horien ondorengoak mugitu ahal izango dira eta inokuluaren puntutik urrunduko dira. Andui horiek isolatu ahal dira eta antigeno flagelar berriaren determinazioa burutu daiteke. Hasiera batean inokulatutako anduia anti-H serumaren presentzia ez badu mugimundurik adierazten, anduia monofasikoa delako izan daiteke, eta bigarren antigeno flagelarra espresatzeko ezintasuna dela eta, inokulazioa egin den puntuan bakarrik egongo da hazkuntza, eta ez inokuluaren inguruan.

### **Fase-aldaketa**

Bakterioen gainazaleko antigenoen espresioaren aldaketa, “Fase-aldaketa” bezala definitzen da. Orokorrean fase-aldaketa gertaera itzulezina da eta kanpo-faktoreez eragindakoa izan daiteke. Fase-aldaketa horrek etengailu itzulgarri batekin lotuta dago: antigeno bat espresatzeko unean beste antigenoaren errepresioa egiten da. Beraz, flagelo baten espresio guztia ahalbidetzen du, beste flageloaren sintesia guztiz blokeatuz (*on/off*).

*fliC* eta *fljB* geneak lehenengo eta bigarren faseko flagelinak kodetzen dituzte hurrenez hurren. Hala ere, gene horiek genomaren zonalde ezberdinetan kokatuta daude, haien artean nahiko urrun aurkitzen diren operon-etan. *fljBA* operonean *hin* genea kokatzen da, Hin errekonbinasa kodetzen duena; *fljB* genea, bigarren faseko flagelina kodetzen du; eta *fljA* geneak, *fliC* genearen proteina errepresorea kodetzen du. Hin rekonbinasak 993 bp-ko fragmentu baten inbertsio itzulgarria katalizatzen du kromosoma bakterianoan, non *fljBA*

operonaren promotorean dagoen. Norantza batean promotoreak *fljB* eta *fljA* geneen transkripzioa zuzentzen du eta *fljA*-ri esker, *fliC* genearen errepresioa eragiten da. Hala ere, *hin* genearen norantzak inbertsioa jasan badu, ez da *fljB* eta *fljA* geneen transkripzioa egiten eta ez dira espresatuko, ondorioz ez da bigarren faseko flagelina kodetuko, eta *fljA* geneak kodetutako errepresorearen ausentzian, *fliC* geneak zuzendutako transkripzioak egingo da lehenengo faseko flagelinaren espresioa ahalbidetuz (Herrera-León, 2004).



**1. irudia.** Flageloaren fase-aldaketaren mekanismoa eta parte hartzen duten geneen kokapena.



## Vi Antigenoa

Vi antigenoa polisakarido kapsularra da Typhi eta Paratyphi C serotipoetan ekoizten dena, eta baita ere Dublin serotipoko andui batzuetan. Kapsula homopolimero lineal bat da ( $\alpha$ -1,4 2-deoxi-2-*N*-azido uroniko azetilgalaktosamina) eta O-azetilatu izan daiteke C-3an (Daniels *et al.*, 1989). Sintesia zuzentzen duten entzimak eta kapsula esportatzen dutenak, 10 gene ezberdinez osatuta dagoena *viaB* locus-ean kodetzen dira (*tviA-E* a *vexA-E*).

Vi kapsularen presentzia aztertzen da portan egindako aglutinazioaren bidez. Analisi biokimikoen arabera andui bat Typhi edo Paratyphi C serotipoetakoa den zalantzazkoa bada, aglutinazioa egiten da Vi antiserumarekin eta baita O antiserum egokiarekin ere. Haatik, kapsularen presentziak oztopatu dezake antigorputzaren ezagupena O antigenoarekiko. O antigenoaren determinazio egokia egiteko, andui batek Vi antigenoarekiko positiboa izanda, bakterioa uretan irakiten da 15 minutuz, eta hoztu ondoren aglutinazioa egiten da. Orduan ez du aglutinaziorik egingo Vi antigenoarekin eta Typhi serotipokoa izanda, O antigenoaren aglutinazioarekiko positiboa izango da D taldekoa hain zuzen ere (Ellermeier eta Slauch 2006).

### 2.3. Filogenia

*Salmonella* Enterobacteriaceae familiako partaidea da, III Gamma-proteobakteria klase edo subdibisioaren barnean. Gaur egun bi espezie ezagutzen dira *Salmonella*-n: *Salmonella bongori* eta *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* sei subespezietan banatzen da (*S. enterica* subsp. *enterica* I, *S. enterica* subsp. *salamae* II, *S. enterica* subsp. *arizonae* IIIa, *S. enterica* subsp. *diarizonae* IIIb, *S. enterica* subsp. *houtenae* IV, *S. enterica* subsp. *indica* VI). *Salmonella*-ren sailkapena hurrengo eran antolatuta dago:

DOMINIO: Bacteria

FILO: Proteobacteria

KLASE:  $\gamma$ -Proteobacteria

ORDENA: Enterobacteriales

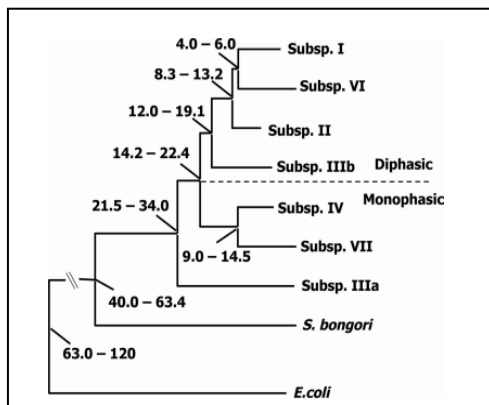
FAMILIA: Enterobacteriaceae

GENEROA: *Salmonella*

ESPEZIEA  $\left\{ \begin{array}{l} \textit{Salmonella enterica} \\ \textit{Salmonella bongori} \end{array} \right\}$  Subsp. I,II,IIIa,IIIb,IV,VI

Erabat sekuentziatuta dauden genomak eskura izateak erraztu du *Salmonella*-ren ikerketaren garapena eta Enterobacteriaceae familiako beste espeziekiko erlazioaren ezagutza (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001). Zenbait ikerlariiek plazaratutako lanek (Selander *et al.* 1996; Baumler *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2002; Porwollik *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; McQuiston *et al.*, 2008) ahalbidetu dute *Salmonella* generoko filogeniaren eredu orokorra berreraikitzea. Ikerlan horien arabera *Salmonella* eta

*Escherichia*-ren arteko dibergentzia eman zen duela 120 milioi urte, lehenengo ugaztunen sorrerarekin bat. Duela 25-40 milioi urte inguru, *Salmonella*-ren arbaso komunak 1. patogenizitate-irla eskuratu zuen (SPI1). SPI1 irlak III motako jariapen-sistema kodetzen du, heste-epitelioko inbasioan parte hartzen duena. Horrela, *Salmonella* odol hotzeko ornodunekin erlazionatutako zelulabarneko patogenoa bihurtu zen. 40-63 milioi urte bitartean, *Salmonella*-k 2. patogenizitate-irla eskuratu zuen (SPI2). Horrek, organismoari, makrofagoen barnean bizirautea ahalbidetzen dio, horrela barne ehunak kolonizatuz. Gertakizun horrek gaur egun *Salmonella*-n onartzen eta ezberdintzen diren bi espezieen sorrera eragin zuen. SPI2ren presentziak *Salmonella enterica*-ren ezaugarri bereizgarria da. *Salmonella enterica*-ren sei subespezieak eboluzionatzen jarraitu zuten euren nitxoetara egokitzeko (I, II, IIIa, IIIb, IV, VI). Orain dela 21-34 milioi urte, I, II, IIIb eta VI subespezieen arbasoak flageloaren azpiunitateen fase aldaketa egiteko gaitasuna eskuratu zuen *fljAB* operoia eskuratzearekin batera. I. subespeziearen arbasoek, odol beroko ornodunak kolonizatzeko gaitasuna lortzea aurrepauso garrantzitsua izan zen espeziearentzat, eta aldiz, gertaera larria giza osasunarentzat. I.go subespeziearen anduiak eboluzio-prozesu garrantzitsua jasan dute ostalari mota asko kolonizatzeko gaitasuna lortzeko. Typhi bezalako serotipo batzuk espezifikokoak dira eta bakarrik gizakia gaixotzen dute. Aldiz, Typhimurium bezalako serotipoak orotarikoak dira eta ugaztun espezie asko kolonizatzeko eta gaixotasuna sortarazteko gai dira (Ellermeier eta Schlauch 2006).



**2. irudia.** McQuiston *et al.*, 2008.ko lanaren arabera moldatutako irudia, eboluzioa milioi urtetan adierazia.

*Salmonella* generoaren filogeniaren azken aurrerapauso bezala, aipatu beharra dago 2004an Shelobodina *et al.*-ek plazaratutako ikerketa-lana. Isolatu berri zuten andui batentzat izen berria proposatu zuten: *Salmonella subterranea*. Anduia kutsatutako jalkin baten gainazaletik isolatu zuten eta 16S azpiunitatearen ADN erribosomikoaren sekuentziaren analisisian *Salmonella bongori*-rekin eta *Enterobacter cloacae*-rekin zuen bateragarritasuna. 2005. urtean izena onartua izan arren, Estatu Batuetako Gaixotasunen Kontrol eta Prebentziorako Zentruko (CDC) *Salmonella* Erreferentzia Laborategi Nazionalak, zehaztu du espezie berri hori ez dela *Salmonella* espeziekoa bateragarritasun gehiago duelako *Escherichia* generoarekin (Grimont *et al.*, 2007).

## 2.4. Taxonomia

*Salmonella*-ren nomenklatura betidanik aldatzen egon da (Brenner *et al.*, Euzeby, 2000). XX. mendearen erdialde arte *Salmonella*-ko espezieak gaixotasunarekin erlazionatzean deskribatzen eta izendatzen ziren. Hortik datozte *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Typhimurium edo *Salmonella* Enteritidis-en izenak. Kauffman-ek (1941; 1966; 1971) White-n (1926) lañaren jarraipena egin ondoren, Kauffman-ek *Salmonella*-ren azterketa serologikoa ezarri zuen eta plazaratu zuen formula antigenikoa hobeagoa zela serotipoak izendatzeko, gaixotasunarekin erlazionatuz izendatzea baino (Kauffmann 1971). Ondoren egindako aurkikuntzetan, organismoak isolatua izan zeneko lekuaren izenarekin izendatuak izan ziren, hala nola, *Salmonella* London, *Salmonella* Paris eta *Salmonella* Casablanca. Gaur egun 2500 serotipo baino gehiago ezagutzen dira *Salmonella* generoan (Grimont *et al.*, 2007) (1. Taula).

**1. Taula.** *Salmonella* espezie/subespezie bakoitzean identifikatutako serotipo kopurua (Grimont *et al.*, 2007-tik egokitua)

<b>Espezie eta subespezie bakoitzeko serotipo kopurua</b>	
<b><i>Salmonella enterica</i></b>	2557
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1531
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	505
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	99
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	336
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<b><i>Salmonella bongori</i></b>	22
Guztira (genero <i>Salmonella</i> )	2579

Le Minor, Popoff eta laguntzaileak espezie mailako izen bakarra proposatu zuten: *Salmonella choleraesuis*, non sei subespezie ezagunak agertzen ziren (Le Minor, 1982; Le Minor, 1986). I. subespezieko serotipoak aitortu ziren, adibidez *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* Typhimurium serotipoa edo *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraeuis* Typhi serotipoa. Hala ere, gaixotasun ezberdinak eragiten zituzten organismoak izendatzeko *Salmonella choleraesuis* izena erabiltzeak ekar zitzakeen nahasteagatik (adibidez Choleraesuis serotipoa aurrez-aurre Typhi serotipoarekin), Le Minor-ek eta Popoff-ek (1987) *Salmonella enterica* izena proposatu zuten espeziea izendatzeko eta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I) Typhimurium serotipoko LT2 anduia, erreferentziko anduia bezala. LT2 anduia Lilleengen-ren 2. anduia da (Lilleengen, 1948) eta bereziki oso ondo karakterizatuta dago bai genetikoki zein biokimikoki. Proposamena ahobatez onartua zuen Bakteriologia Sistematikoko Batzorde Internazionalaren enterobakterioen Sailak, XIV. Mikrobiologia Internazionalako Jardunaldietan (Penner, 1988). Ondoren, Reeves *et al.*-ek (1989), proposatu zuten karakterizazio molekularrean oinarrituz, *Salmonella bongori* subespeziea espezie izendatzea. Nomenklatura hori da gaur egun onartzen dutena CDC-ak, Gaixotasunen Kontrol eta Prebentziorako Europako Zentruak (ECDC), Amerikako Mikrobiologiako Elkarteak (ASM) eta Kauffmann-White-n eskemaren eguneratzearen arduraduna den *Salmonella*-rako erreferentzia-zentruak (Pasteur Institutua) (Popoff eta Le Minor, 1997; Popoff *et al.*, 2001b) (1. taula). *Salmonella enterica* subsp. *enterica*-ren serotipoak letra erromaterrekin idazten dira, letra etzanik gabe eta lehenengo letra larriz. Beste subespezietako serotipoak bere formula antigenikoaren arabera izendatzen dira.

Azken urteetan onartuak izan dira honako laburdura motak: *Salmonella enterica* Typhimurium serotipoa, edo *Salmonella* Typhimurium, edo bakarrik Typhimurium serotipoa. Tesi Doktoral honetan irakurmena erraztearren erabiliko den izendapena *Salmonella* Typhimurium izango da.

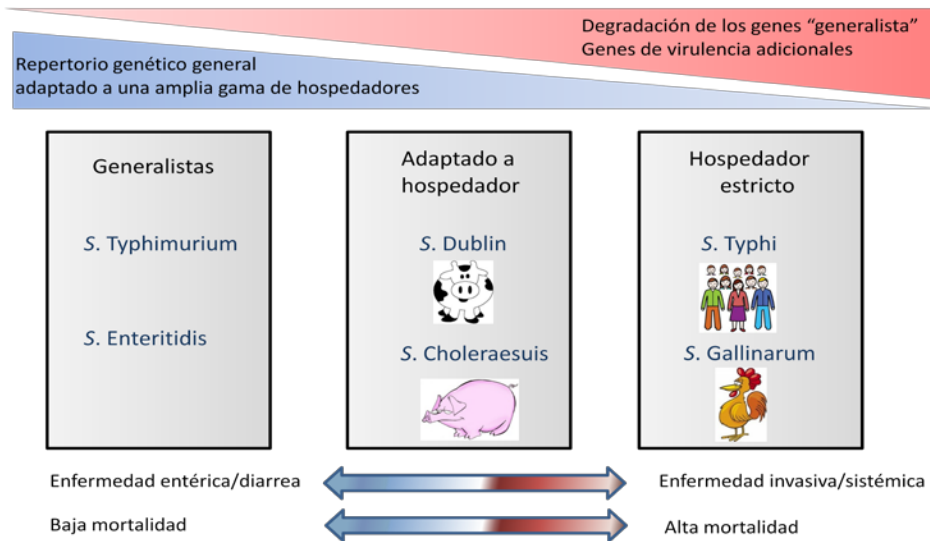
*Salmonella* serotipoen formula antigenikoetan, lehenengo O antigenoa idazten da, jarraian Vi (baldin badago) eta azkenik H antigenoak (aurretik 1. fasekoa eta gero 2. fasekoa). Antigeno nagusiak bi punturen bidez banatzen dira eta banako antigenoak komen bidez. Adibidez Typhimurium serotipoaren formula antigenikoa 1,4,[5],12:i:1,2 bezala izendatua dago. Kortxeteen artean dauden antigenoak adierazten dute euren presentzia aldakorra dela.

## 2.5. Habitata

*Salmonella* nagusiki animalien hesteetan bizi da. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* odol beroko animalietan bizi izaten da, baina *S. enterica* eta *S. bongori* bezalako subespezieak odol hotzeko animalien komentsalak dira eta nekez kutsatzen dute gizakia. *S. enterica* subsp. *enterica*-ren serotipoak ostalarien arabera hiru taldetan bana daitezke. Lehenik eta behin **ostalari bati egokituak** daudenak (zeintzuek nagusiki ostalari bakarra kutsatzen dute, baina beste ostalarietan gaixotasuna sor dezakete). Bigarren taldean, **ostalari bakar batekiko hertsia**k direnak. Azkenik, **generalistak** edo animalia mota asko kutsatzeko gai direnak (baina gaixotasunaren garapena aldatu daiteke ostalarien artean) (Uzzau *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2002).

*Salmonella*-rengatiko kutsadurak maiz gastroenteritisa eragiten du. Dena den, bere habitatean bizirauteko, *Salmonella*-k ostalari batzuetan komentsal modura iraun edo bizi daiteke eta ondoren transmitua izatea ostalariz ostalari.

Ez da ezagutzen komentsal modura bizirauteko mekanismo molekularra (Kingsley et al. 2003), baina organismoaren iraunkortasuna eta barreiapena ziurtatuta dago, munduan zehar agertu izan diren anduiak adierazten duten moduan, hala nola Typhimurium DT104 serotipokoak (Davis et al., 2002) eta Enteritidis PT4 serotipokoak (Guard-Petter *et al.*, 2001). Orokorrean, serotipo generalistak daukaten bilduma genetiko orokorrak ahalbidetzen die ostalari-gama zabaletara moldatuak egotea eta eragiten dituzten gaixotasun klinikoak ez dira serotipo hertsiek eragiten dituzten bezalako bortitzak (3. irudia).



**3 irudia.** Azaltzen dira serotipo generalisten, ostalari bati egokituen edo hertsien ezaugarriak eta baita ezaugarri klinikoekin duten erlazioa ere. Feasey *et al.*-en (2012) lanetik egokitua.

Gizakietan *S. Typhimurium* eta *S. Enteritidis* dira maiztasun altuagorekin gaixotasuna eragiten duten bi serotipoak generalistak. Ordea, *S. Typhi* hertsia da eta egoera kliniko larrienak eragiten dituen serotipoa da.



## 2.6. Epidemiologia

Salmonelosiak kutsatutako elikagaien edo uraren kontsumoarekin erlazionatuta dago eta garrantzi epidemiologiko handia du. Osasunaren Mundu Erakundearen (OMS) balioespen arabera, urtero mundu osoan zehar sukar tifoideoagatik 16 milioi pertsonen kutsadura eta 600.000 heriotza ematen dira (Mandell *et al.*, 2006). Bestalde, kalkulatu da *Salmonella enterica* urtero milioi bat enterokolitisen eta 400 heriotzen arduraduna dela, Estatu Batuetan (AEB) (Scallan *et al.*, 2011).

Garatutako herrialdeetan arrunta ez izan arren, sukar tifoidea garapen bidean dauden herrialdeetan maiztasun handikoa da eta bere ondorioak oso larriak edo hilkorrak dira. Kutsapen bide nagusia giza gorotzekin kutsatutako uraren bidezkoa da. Sukar tifoideoaren heriotza-tasa 10 aldiz handiagoa izan daiteke beste salmonelosiekin alderatuta.

Europar Batasuneko (EB) Elikagaien Segurtasun Agintaritzak (EFSA) eta ECDC-ak urtero elikagai jatorriko agerraldiei buruz plazaratutako 2012ko txostenean, esan zuten *Salmonella*-ren % 9ko beherakada egon zela 2010. urtean eta sei urtez beherakada jarraia izan zela (EFSA, 2012). Txostenaren arabera, giza salmonelosiaren kasuen beherakadaren arrazoiak *Salmonella*-ren kontrolerako Europar Batasunaren programen arrakastaren ondorio da. Programa hoiek dira bakterioaren iraunkortasuna ukuiluetako hegaztietan eta bereziki oiloetan gutxitzeko. *Salmonella*-k eragindako infekzioak, normalean sukarra, beherakoa edo sabel-karranpa dakarte. 2010. urtean gizakietan 99.020 gertakizun jakinarazi ziren, 2009ko 108.618 gertakizunen ostean. Maiztasun

altuagoan topatu zen *Salmonella* oilasko eta indioilar haragian. 2010. urteko txostenaren arabera, EBean elikagaien bidez transmititutako 5.262 agerraldi erregistratu ziren. Agerraldi horiek 43.000 pertsonetan izan zuten eragina eta 25 heriotz eragin zituzten. Dena dela, zenbaki horiek altuagoak izan zitezkeen, kasuen informazio falta dela eta. Agerraldien eragile nagusiak izan ziren *Salmonella* (% 31), Norovirus (% 15) eta *Campylobacter* (% 9). Kutsadura iturri nagusiak izan ziren arrautzak eta arrautza jatorriko produktuak, aurrez prestatutako jakiak eta barazkiak. Barazkien garrantzia agerraldi-iturri bezala handitu egin zen aurreko urteekin konparatuta.

*S. Enteritidis* eta *S. Typhimurium* serotipo arruntenak dira garatutako herrialdeetan eta nagusiki salmonelosia eragiten dute. Salmonelosia gaixotasun automugatua da, baina batzuetan heriotza ere sortarazi dezake. Animalia-gordailu desberdinak existitzen dira, zeintzuek ingurunearen kutsaduran parte hartzen duten, oilaskoak, indioilarrak, txerriak, behiak eta beste etxeko *animalia* eta *animalia* basatiak barne. Maskotak, organismo honen eramaileak izan daitezke, hala nola, narraziak, txoriak, katuak, txakurrak eta odol hotzeko beste animaliak.

Nahiz eta *Salmonella* erraz inaktibatzen den jakiak egostean, elikagai asko kontsumitzen dira egosi gabe (frutak eta barazkiak) edo gutxi egosita (arrautzak eta haragi batzuk). Horregaitik, jakien kutsadura ekiditeko oso garrantzitsua da garbitasuna elikagaiak prestatu aurretik eta ostean,. Hamar minutuz eta 70°C-tan egositako elikagaiak zuzenean kontsumitzeko egokiak dira, eta beranduago kontsumitzeko, 8°C-tik beherako hozkailuan gorde behar dira. *Salmonella*-k eragindako infekzioak sarriagoak dira udan neguan baino,

ziurrenik eguraldia epelagoa delako eta horrek elikagaietan organismoaren hazkuntzan laguntzen du. Salmonelosiaren intzidentzia altuagoa da euri garaian klima tropikaletan eta maiatzatik urrira klima epeletan.

Aurreko mendearen amaieran eta mende honen hasieran, garatutako herrialdeetan gizakietatik isolatutako *Salmonella*-ren maiztasunaren igoera gertatu zen. Igoera hori izan daiteke elikagaiak masiboki prozesatzeko metodo berrien ondorioa edota elikagai horiek lurralde asko eta ezberdinetara banatzeko dauden erraztasunengatik. Kontuan izan beharra dago, igoera horretan eragina izan duela gaur egun erreferentzia laborategietara isolamenduen informazio gehiago transmititzeak eta horrek kasuen maiztasuna gehitzen du. Nazioarteko datuek zehazten dute salmonelosiaren intzidentzia 14-120 kasu bitartean 100.000 pertsonako.

Gaur egun, Estatuan, *Salmonella*-k gastroenteritis bakterianoaren 2.rren eragilea da, *Campylobacter*-ren atzetik. Dena den, *Salmonella*-k dihardu elikagaien bidez transmititutako broteen lehenengo kausa giza. Mikrobiologia Informazio Sistemaren Urteko Txostenean azaltzen denaren arabera (Epidemiologia Zentro Nazionala eta Epidemiologia-jagoletzako Sare Nazionala), 2009. urtean *Salmonella* ez tifoideoen 4302 kasu jakinarazi ziren erreferentzia laborategietan. Serotipo ugariena *Salmonella* Enteritidis izan zen (% 36,8) eta bigarrena *Salmonella* Typhimurium (% 21,9).

## 2.7. Patogenizitatea

*Salmonella*-ren birulentzia-mekanismoak oso konplexuak dira eta serotipo batetik bestera oso aldakorak, baita serotipo berdineko anduien artean ere. *Salmonella*-ren aldakortasunak eta egokitze-gaitasunak ziurtatzen du andui egokiren bat egongo dela beti ostalaria kolonizatzeko prest aukeraren bat agertzekotan (EFSA, 2010). Edozein egoeratan birulentzia-faktoreen menpekoa da *Salmonella*-k duen bizirauteko gaitasuna eta ostalarien defentsa ugariak gainditzeko abilezia eta faktore horiek erregulatuko duen sistemaren presentzia.

Giza salmonekosiak bi talde handitan sailka daitezke: alde batetik, gizakiarentzako serotipo hertsia (normalean sindrome tifoideoak eragiten dituzte eta bakterioak odolean agertzen dira) eta beste aldetik, serotipo generalistak (beherakoa, gorakoa eta sukarra eragiten dituztenak). Gaixotasun honen iraupena eta nortasuna aldakorra da, ostalariaren egoera orokorraren arabera, eta batzutan, gaixotasun orokorrak sortarazi ditzake (Parra *et al.*, 2002).

*Salmonella*-ren infekzioa ura edo kutsatutako jakien kontsumoagatik gertatzen da. Kutsatutako jaki kontsumituak  $10^5$  eta  $10^8$  zelula bideragarria artean izan behar ditu heste mehearen eta lodiaren kolonizazioa ahalbidetzeko. Gaixotasunaren agerpena kontsumoaren ondoko 8-48 ordu bitartean izaten da. *Salmonella*-k ingumeneko ostalaritan biziraun behar du, eta ostalarien defentsak gainditu behar ditu infekzioa sortzeko.

Patogenizitate-irlek inbasioa zuzenduko duten geneak dituzte. Bakterioaren atxikidura-ahalmena ezaugarri garrantzitsua da patogenizitatean,

eta hori adhesina asko sortzen dituelako gertatzen da (Salyers 2002). Gainditu beharreko lehenengo muga ostalarien urdailaren azidotasuna da. pH azidodun baldintzak gainditu ondoren, bakterioak hestea kolonizatzen du, bertan itu-espezifikoak topatzen ditu eta Peyer plakak inbaditzen ditu (Carter eta Collins, 1974). Lehenengo patogenizitate-irla (SPI-1) eta 3. jariapen sistema (TTSS) erabiliz, bakterioa ehun linfatikoan sar daiteke M zelulak (ehun zelula endozitikoak) eta ehun zelula ez-fagozitikoak direla bide. *Salmonella* da 3. motako bi jariapen sistemadun ezagutzen den espezie bakarra, bi patogenizitate irla ezberdinetan kodetuak dauden (SPI-1 eta SPI-2). Badirudi, sistema bakoitzak zeregin garrantzitsu bat betetzen duela bakterioaren patogenizitatean: SPI-1-ak kodetutakoak bakterioaren hasierako ostalari-barneko sarreran parte hartzen du eta SPI-2-k kodetutakoa, garrantzitsua da infekzioaren gainontzeko aldietan (Hueck 1998).

Beherakoaren zergatiaren ikerketan, ikusi da 3. motako jariapen sistemen garrantzia *Salmonella*-n. Haiek beherako bat eragiteko beharrezkoak diren proteinen transferentziaren arduradunak dira, funtzio zelularra oztopatuz. Metabolismoaren eragozpen horren ondorioz, infektatutako zelulak zitokinak jariatzen dituzte zelula polimorfonuklearrak erakartzeko (PMN) eta azken horiek prostaglandinak askatzen dituzte adenilato ziklasaren gain eragiten. Ondoren AMPc-aren balioak handitzen dira, Na<sup>+</sup> absortzioa eragozten da eta Cl<sup>-</sup> ren jariapenaren gorakada eragiten da. Horregatik guztiagatik, zelulak ura galtzen du eta beherakoa hautematen da (Salyers 2002).

*Salmonella*-k ehun linfatikoan sartu ondoren, bikozketarekin jarraitzen du Peyer plaketan, SPI-2 patogenizitate-irlari esker. Noizbehinka beste itu-

organoetara sakabanatzen dira, gibela edo barea bezalakoetara eta makrofagoen barnean bikoizketarekin jarrai dezakete eta ostalariarengan septizemia edo heriotza eragin. Makrofagoen barnean bikoizketa burutzeko beharrezkoa da SPI-2-ik kodetzen duen 2. motako jariapen sistema. Zelulen kopurua handituz doan heinean, *Salmonella*-k organismoaren ehun guztiak infektatu ditzake. Batzutan ostalaria hiltzen da shock septiko edo arazo multiorganiko baten ondorioz. Sukar tifoideo izenarekin ezaguna den prozesu hori Typhi serotipoarekin erlazionatzen da.

## **2.8. Zeinu-klinikoak, diagnostikoa eta tratamendua**

*Salmonella*-k gizakietan infekzio ugari eragiten ditu, hala nola gastroenteritisa, sukar tifoideo edo paratifoidea, bakteriemia, osteomielitisa edo abzesuak. Gainera, sintomarik gabeko eramaile kronikoaren osasun-egoera ematea eragin dezake.

### **Salmonelosi ez-tifoideoak (gastroenteritisa edo enterokolitisa).**

Normalean sukarra, sabel-mina, goragaleak, gorakoak eta beherakoak hanturazko prozesuaren seinale dira, baita leukozito polimorfonuklearrak agertzen dira gorotzen azterketan (Sánchez, 2006). Diagnostikoa egiteko sintomen azterketa klinikoak, kontsumitu berri diren elikagaiei buruzko galdetegia eta gorotzetatik abiatuta mikroorganismoaren kultiboa erabiltzen dira hurrenez hurren. Sintomen artean hotzikarak, gorakoak eta beherakoak, eta sukarra zenbait egunetan zehar somatzen dira besteak beste. Gaixotasun hau normalean desagertzen da 2 edo 3 egunetan medikuen parte-hartzerik gabe. Dena den, sendatu ondoren *Salmonella*-ren presentzia aste batzuek detektatzen da gaixoen gorotzetan. Paziente batzuk sendatu eta asintomatiko bihurtzen dira,

baina mikroorganismoak daramatzate hilabete edota urteetan zehar, eramaile kroniko bilakatu. Bakterioak, heste-hodiaren kanpoalderantz hedatzekotan, sintoma-klinikoak bat-etortzen dira gertaera izan den herrialdeetan (septizemiak, meningitisak ...). Salmonelosi ez-tifoideoen gastroenteritisetan ez dira normalean antibiotikoak erabiltzen, immunoeskasia aurkezten duten gaixoetan ezezik (jaioberrietan, adineko jendean, HIESaren gaixoetan, leuzemia, linfomak, drepanozitosis, edo bihotz-gaixotasuna dutenetan) edo heste-kanpoko infekzioetan.

**Sukar tifoidea.** Gaixotasun hau *Salmonella* Typhi serotipoak eragiten du. *Salmonella* Typhiren gordailua gizakia da, beraz garraio-bidea pertsonaz-pertsona da. Gaixoak sukarra azaltzen du, orokorrean sintomatología garrantzitsurik gabe, baina pazientearen ahulezia orokorra dakar, edo batzutan koadro-toxikoa azal daiteke bidaiarrietan edo garapen bidean dauden herrialdeetan. Sukar tifoideoaren diagnostikoa sintomatologiaren araberakoa izan daiteke: gripea, neumonia-bakterianoa, meningoentzefalitisa, apendizitisa, kolezistitisa, hepatitisa, hesteen hanturazko gaixotasuna, linfoma, bruzelosia, rickettsiosia, endokarditis bakterianoa, tuberkulosi miliarra edo mononukleosi infekziosoa (Sánchez, 2006). Sukar tifoideoaren tratamendua 3. generazioko fluorokinolonetan edo zefalosporinetan oinarritzen da. Heriotza-tasa % 15era heltzen da tratatu gabeko kasuetan.

**Sukar paratifoidea.** Sukar paratifoideoak antzekotasun batzuk ditu sukarraren tifoideoarekin, baina onberagoa da. Gaixotasun horrek Paratyphi A, Paratyphi B eta Paratyphi C serotipoez eraginda dago. *S. Paratyphi* A-rengatiko infekzioak arruntak dira Afrikan eta Asian, Paratyphi B arruntagoa da Europan

eta gastroenteritis bortitza eragiten du, eta Paratyphi C Ekialde Urbilean izaten da arruntagoa eta septicemia eragiten du.

## **2.9. Genomika**

2001. urtetik Typhimurium serotipoaren LT2 anduiako genoma osoaren sekuentzia ezagutzen da (McClelland *et al.*, 2001). National Center for Biotechnology Information (NCBI) datubasean ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 2013. urtera arte guztiz sekuentziatutako eta izendatutako 11 salmonellen genomak zeuden eskuragarri, eta gutxienez 125 sekuentziazio proiektu zeuden martxan *Salmonella*-ko serotipo ezberdinentzat. Hortaz, 2014. urtean *Salmonella enterica*-ren guztiz sekuentziatutako genomen kopurua 50 baino handiagoa zen eta hilabetez-hilabete esponentzialki hazten den kopurua da. Genoma horien eskuragarritasunak *Salmonella*-ren aldaera berrien ikerketa-lana zeharo errazten du.

LT2 anduiaren genoma 4.857 kilobasekoa da (kb) eta 4.489 sekuentzia dauden eta asko proteina putatiboak kodetzen dutelarik. DNA-k % 53ko G+C edukia du eta gainera pSLT birulentzi plasmidoa dauka (94 kb-koa) non 108 zonalde daude proteinak ere kodetzen dituzten. pSLT plasmidoa autotransmitzailea da (Ahmer *et al.*, 1999a) eta *Salmonella enterica* subespeziearen beste andui ez tifoideoen birulentzia plasmidoekin erlazionatuta dago.



**2. Taula.** NCBIko datubasean eskuragarri eta guztiz sekuentziazatuta dauden *Salmonella* genomak. Sekuentzia horiek ikerlan honetan erabili dira.

Serotipoa	andui zbk	Sarbidea	Taldea
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	LT2	NC_003197	McClelland <i>et al.</i> , 2001
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	T000240	AP011957	Izumiya <i>et al.</i> , 2013
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	08-1736	CP006602	Strain <i>et al.</i> , 2013
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Paratyphi B	SPB7	CP000886	McClelland <i>et al.</i> , 2014
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Schwarzengrund	CVM19633	CP001127	Fricke <i>et al.</i> 2014

Doktorego-tesi honetan LT2 anduiaren genoma oinarrizkoa izan da hasle espezifikoen diseinurako, eta horiek erabili dira tipifikatutako anduien karakterizaziorako. Teknologia berriei esker eta tresna berriei esker (NGS, *Next Generation Sequencing*), guztiz sekuentziazatutako genomak lortzea errazagoa izatea lortu da eta prezio ez oso altuarekin. Horren adierazle nabarmenena aipatutako genoma kopuruen handipen esponentziala da. Horrek mikroorganismoen ezagupen genomikoan izugarrizko informazio kopurua eskuratzea ahalbidetuko du.

### 3. *Salmonella*-ren karakterizazio epidemiologikoa

Giza-osasunean *Salmonella*-k aurkezten duen intzidentziak azalarazten du bere detekzioaren, kontrolaren eta kasuen jarraipenaren garrantzia, eta baita osasun agintariei egin beharreko datuen-lagatzearen garrantzia. Horretarako ezinbestekoa da espeziearen barneko sailkapen egokia lortzea, tipifikazio metodoen bidez. Metodo horiek oinarrizten dira markatzaile epidemiologikoen

erabileran espezie konkrituaren barne-banaketa egiteko bai taldeetan, zein anduian edo klonetan, eta azkenik kluster-etan, lerro-klonaletan edo talde genomikoetan. Era horretan, banaka lortutako isolamendu bakterianoak, baita une edo toki ezberdinetan lortutakoak ere, erlazionatuta daudela baieztatu daiteke tipifikazio metodoen bidez emaitza berdinak lortuz gero.

*Salmonella*-k eragindako infekzioak kutsatutako elikagaiek eragindako agerraldien eragile nagusienetakoa da gaixotasun enterikoen artean. Beraz, *Salmonella* tipifikatu behar diren bakterio zoonotikoen artean nagusienetakoa da. *Salmonella*-ren tipifikazio-metodirik erabiliena serotipifikazioa da. Gaur egun, tipifikazio metodo fenotipiko eta genotipiko ezberdinak daude. Ondoren zehazten dira lan honetan erabili direnak.

### **3.1. Tipifikazio metodo fenotipikoak**

#### **3.1.1. Serotipifikazioa**

Serotipifikazioa laborategietan ohiko diagnostiko-prozedura ez izan arren, salmonelosiaren ikerketa epidemiologikoetan beharrezko erreferentzia teknika da.

Teknikaren oinarri teorikoa azaldu da alde aurretik. O, H eta Vi antigenoen azterketan oinarrizten da. Beraz jarraian oinarri praktikoa azalduko da. Serotipifikazioak andui bakoitzean agertzen diren antigenoak detektatzen dituen teknika da. Aurrez aipatu den moduan, *Salmonella* anduiek pareta zelularrean O antigeno somatikoak eta H antigeno flagelarrak dituzte, eta azkenak bi taldeetan banatzen dira: lehenengo fasekoak eta bigarren fasekoak. Serotipo batzuk Vi antigenoa izan ditzakete. *Salmonella*-ren serotipoa

definitzen da adierazitako antigenoen konbinazio bereziaren arabera. Teknikaren oinarria antiserum espezifikoekin egindako bakterioaren mikroaglutinazioan datza. Orokorrean antiserum komertzialak izaten dira eta formula antigenikoa zehaztea baimentzen dute.

Antigeno somatikoaren determinazioa: Bi antiserum mota daude polibalenteak eta monobalenteak. Hasteko aglutinazio erreakzioak aztertzen dira antigorputz nahasteak dituzten antiserum polibalenteekin. Ondoren, O faktore ezberdinentzat, aglutinazioa antiserum monobalenteekin egiten da eta horrek zehazten du zein antigorputza den antigeno somatiko konketuarekiko erreakzionatzen duena.

Antigeno flagelarren determinazioa: Flageloen aglutinazioa bi faseetan egiten da. Hasieran, bakterioak une horretan adierazten duen flageloarekiko aglutinazioa burutzen da (lehenengo edo bigarren fasekoa izan daiteke). Ondoren, “fase aldaketa” bultzatzen da *Salmonella* hazkuntza medio erdisolidoan erein ondoren. Medioan espresatu duen flageloaren aurkako antigorputzak daude. Bakarrik fase aldaketa burutu duten zelulak mugitu ahal izango dira, hau da, flagelo berria adieraztean, antigorputzak ez dute horiekin erreakzionatzen eta andui hoi mugimendua eman ahal izango da plakan zehar eta sakabanatuko dira. Beraz, hazkuntzaren muturretatik hartzen da lagina ondoren beste fasean espresatzen diren flageloaren antigenoak detektatzeko eta zehazteko. Antigeno somatikoekin gertatzen den bezala, bi antiserum mota daude polibalenteak eta monobalenteak.

### 3.1.2. Profil biokimikoa

Profil biokimikoak errazten du *Salmonella*-ren identifikazioa eta gainera hazkuntza-medio hautakorretan batera isolatuak izan diren beste enterobakterioetatik bereiztea. Teknika horiek, proba-serie espezifikoean oinarritzen dira. Ahalbidetzen dute bakterioaren bereizketa egitea metabolismoaren edo erreakzio biokimiko multzoen aurrean duten erantzunaren arabera. Orokorrean, erabiltzen diren probak espezifikoak dira: Ureasa, Oxidasa, Katalasa, Vogues-Proskauer, TSI, Simmons zitratua, SIM (Sulfide-indol-motility), fenilalanina desaminasa, azukreen hartidura, etb. Nabarmentzekoa da sarritan identifikazio biokimikorako sistema komertzialak erabiltzen direla, API sistema motakoak adibidez (bioMérieux Inc., Durham, NC), 21 orduko identifikazio-aldiarekin. Teknika mota horiek agertu zirenetik garapen azkarra izan dute eta betiko metodoen identifikazioaren eraginkortasuna hobetu dute (Stager *et al.*, 1992).

### 3.1.3. Fagotipifikazioa

*Salmonella* serotipo berdineko anduiak bakteriofago konkretuen aurrean sortutako lisiarekiko sentikortasun edo erresistentzia ezberdina azaldu dezakete. Fagotipoa edo lisotipoa epidemiologikoki oso garrantzitsua da, zeren eta jatorri epidemikoaren eta fagotipoaren arteko erlazio estuaren adierazlea da. Orokorrean, serotipifikazioarekin gertatzen den bezala, fagotipifikazioak aurkezten duen konplexutasunagatik ez da ohiko metodologia laborategi guztietan. Horrez gain, fagoen sortak ez dauden edonoren esku, eta horregatik, bakarrik erreferentzia-laborategietan egiten da. (Threlfall *et al.*, 1994, Low *et al.*, 1997, Angulo F, 1997, Glynn *et al.*, 1998).

Teknika honen emaitzak aldakorrak izan daitezke fagotipoaren aldaketa eragin dezaketen zenbait mekanismo daudelako. Gomendagarria da teknika hau egitean beti persona berdina izatea arduraduna beti irizpide berdinak jarraitzeko. Zailtasun horiek alde batera utzita, frogatu da *Salmonella*-ren fagotipifikaziorako beste metodo fenotipikoak baino egonkorragoa eta bereizkorragoa dela. Gaur egun erreferentzia-laborategietan erabilia da markatzaile epidemiologiko sekundario gisa Typhi, Typhimurium, Enteritidis, Hadar eta Virchow bezalako serotipoetan (De la Torre Martínez, 2006)

#### **3.1.4. Antimikrobianoen erresistentzia profila**

Teknika honen bidez zehazten da mikroorganismo baten erresistentzia profila antibiotiko edo antimikrobiano konkretu batekiko. Metodo hau gaixotasun infekziosoen diagnostikoan erabiltzen da infekzioak sendatzeko erabli ahal diren antibiotikoak ezagutzeko. Antimikrobianoekiko erresistentzia aldakorra da erresistentzia hori zehazten duten geneak askotan elementu genetiko mugikorretan azaltzen direlako, hala nola plasmido batean. Plasmidoak bakterioaren hazkuntzarako ezinbesteko elementuak ez direnez, bere transmisioan jasan beharreko presio selektiboa belaunaldiz-belaunaldi oso handia da. Antimikrobianoekiko erresistentzia eskaintzen duten geneen galera edo irabazia gertatzeak errazten du erresistentzia profil berdina duten anduien agerpena, baita beste tipifikazio metodoen bidez berdinak diren anduiak erresistentzia profil ezberdinak izan ditzakete ere.

## 3.2. Tipifikazio metodo genotipikoak

### 3.2.1. Elektroforesia eremu pulsatuko gelean (*Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE*)

Manipulazioa eta DNA azterketa biologia molekularren arloan ezinbestekoak dira. Elektroforesi teknika estandarrak gelean ahalbidetzen dute DNA zatien bereizketa lortzea bere tamainaren arabera. Baina oso mugakorrak dira 15-20 kilobase baino handiagoak diren zatiak bereizteko (kb). Etengabeko eremu elektriko batean pisu desberdineko zatiak bereizteko gaitasuna galdu egiten da molekulak handiak direnean. 1984an, Columbia Unibertsitatean, Schwartz-ek eta Cantor-ek, protokolo estandarraren aldaera bat garatu zuten: txandaka aldatzen zen tentsio gradiente bat sartuz, tamaina handiko zatien bereizmena hobetu zuten (Katheleen Gardiner, 1990). Teknika horrek Elektroforesia eremu pulsatuko gelean bezala ezaguna da (PFGE) eta *Salmonella*-ren tipifikazioan “*Gold Standard*” teknikatzat jotzen da (Olsen *et al.*, 1994).

Elektroforesi teknikaren berrikuntzak pultsu-elektrikoen erabilera ezberdina suposatu zuen gelean zeharreko ibilibidean. Gaur egun, erabiltzen dira eremu elektriko ez konstanteak norabidez txandakatzen direnak. Pultsu elektrikoaren norabide-aldaketa emateko maiztasunak zehazten du gelean zehar migratuko diren fragmentuen tamaina mota. Elektroforesian zehar DNAREN norabide aldaketa ematean, pisu molekular ezberdineko fragmentuak elkarrengandik bereizten hasiko dira. Eremu elektrikoaren aldaketa bakoitzarekin, txikiagoak diren DNA zatiak norantza berrira azkarrago mugituko dira zati handiagoak baino. Elektroforesian zehar, handiagoak diren

zatiak gel-aren goiko partean geratuko dira tamaina txikiagoa duten zatiengandik bananduz.

Bestalde, PFGE teknikan bakterioaren DNA guztia digeritzen da maiztasun gutxiko mozte-puntua duten errestrikzio endonukleasen bidez (McClelland *et al.*, 1987), eta ondoren PFGE teknikan tamaina ezberdineko zatiak bereizteko pultsu elektriko konkretudun protokoloa jarraitzen da. Ondorioz, tamaina ezberdineko bandak lortzen dira eta andui bakoitzarentzat patroia edo profil zehatz bat izango dute. Lortutako banden patroiak bakterioaren identifikazioa errazten du eta ahalbidetzen du elikagaien agerraldien ikerketan, ezinbestekoa den, datubaseen arteko konparaketa. Teknika hau aplikatu daiteke genomaren gutxi gorabeherako tamaina zehazteko, genomaren polimorfismoak edo errestrikzio genomikoaren mapa zehazteko (PFGE-profila), anduien arteko hurbiltasun genetikoaren araberrako harremanak ezartzeko, eta kartografiatzeko plasmidoak, geneak, loci eta irla-genomikoak PFGE profilen arabera.

1995. urtean, Barton *et al.*, PFGE metodoaren aldaera bat argitaratu zuten S1-PFGE izenekoa. Aldaera horrek tamaina handiko plasmidoak detektatzea ahalbidetzen du. Une horretara arte plasmidoen profila lortzeko erabiltzen ziren kit komertzialen bidez nahikoa zaila zen plasmido horien detekzioa egitea. Saiakuntza honetan digestioa S1 nukleasarekin egiten da (plasmidoen linealizazioa eragiten du, baina ez du DNA kromosomikoa digeritzen).

Nabarmentzekoa da PFGE-ak bi muga dituela: alde batetik teknika aurrera eramateko beharrezkoa den ekipamenduaren prezioa eta bestetik emaitzak lortu arte igaro beharreko denbora. Dena den, 1996an Gaixotasunen

Prebentzio eta Kontrolerako Zentruak (CDC) teknika honen estandarizazioa azaldu zuen PulseNet bezala izendatutako gaixotasunen zaintza-programarako (*The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance*), teknikak errestrikzio patroiak lortzeko duen gaitasunagatik, bere espezifizitate handiagatik eta laborategien arteko erreproduzibilitateagatik. Gaur egun, *Salmonella*-ren tipifikaziorako PulseNet Nazioarteko sistema normalizatua jarraitzen da (*PulseNet International*), eta ahalbidetu da andui patogeno gehienak karakterizatzea (De la Torre Martinez, 2006).

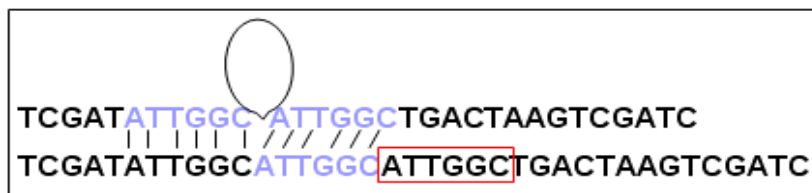
### **3.2.2. Errepikapen kopuru aldakorreko tandem-en multilocus analisia (MLVA)**

Orain dela gutxi garatutako teknika hau VNTR-en (*Variable Number of Tandem Repeats*) aldakortasunean edo DNA errepikakorrean oinarritutako tipifikazio metodoa da. Geneak edo eskualde intergenikoak askotan VNTR izeneko DNA errepikakorreko loci-ak dituzte (King *et al.*, 1997). VNTR horiek ia espezie prokarioto eta eukarioto guztietan detektatu izan dira, eta identifikazio-helburuekin arrakastaz erabiliak dira (van Belkum *et al.*, 1998). Gene bakteriano horietako mota nabarmena gainazaleko osagaiak kodifikatzen dituztenak dira (Rivas *et al.*, 2004). 1996an, ikertu zen immunoglobulinarekin lotzen den A proteinak kodetzen duen genea *Staphylococcus aureus*-aren andui ezberdinetan. VNTR bat detektatu zen 21 nukleotidoetako luzerako unitate errepikatuarekin eta andui ezberdinen artean errepikapen kopurua 1-tik 15-era aldatzen zen (Frenay *et al.*, 1996). 1995ean genoma osoko errepikatutako DNA loci-en lehenengo bilduma egin zen. *Haemophilus influenzae*-ren genomak oinarritutik zehaztua izan (Fleischman *et al.*, 1995). *H. influenzae*-ren



sekuentzia oinarritzat hartuta eta errepikapenen aldakortasuna aintzat hartuta, lehenengo MLVA teknika garatu zen (van Belkum *et al.*, 1997 a, b). Loci ezberdinen errepikapen kopuruaren aldaketa-abiadura aztertzean antzeman zen abiadura aldakorra zela. Ondorioz, errepikapen batzuk egokiagoak ziren *H. influenzae*-ren jarraipen epidemiologikoa egiteko (van Belkum, 2006).

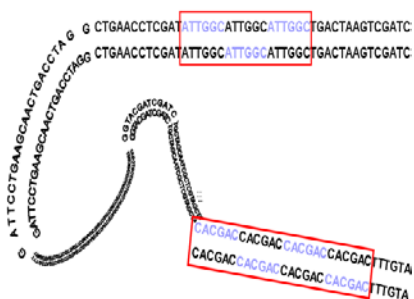
DNAREN errepikapenen aldakortasuna erraztasunez gertatzen da errepikapen unitateen taimana txikiagatik. Unitate horiek DNA polimerasaz kopiatzen direnean baseen hibridazio desegokia eman daiteke. Horrek DNA polimerasari behartzen dio errepikapen unitateak sartzera edo kentzera. Akats horien maiztasuna DNAREN konponketa sistemen araberakoak dira (Caporale, 2003). Askotan proposatu da errepikapenen aldakortasunak abantail selektiboak eskaintzen dituela (Wise *et al.*, 2006).



**4. irudia.** VNTR baten delezioa erakusten da.

Gutziz sekuentziatutako genomen gehipenak bakterioen errepikapen zona horiek anplifikatzeko hasle espezifikoaren diseinua erraztu egin du, *Salmonella* kasu. Horregatik, tipifikazio metodo hau osasunerako garrantzitsuak diren ia espezie bakteriano guztietarako garatua da. Bakterio guztien genomak DNA loci-en errepikapen unitate ezberdinak dituzte. Dena den, errepikapen unitateen tamaina aldakorrak izan daitezke espezie bereko anduietan (6 bp, 9 bp, 33 bp...), eta unitate horien errepikapen kopurua ere aldakorra denez, andui

bakoitzarekiko espezifikoa izan daiteke. Beraz, VNTR mota berdinentzako serotipo berbereko anduiak errepikapen kopuru ezberdina izan dezakete. Aldakortasun horren azterketa esperimentalala loci sorta bati aplikatzen bada (VNTRei) MLVA bezala izendatzen da. Teknika, PCRaren bidez loci-en (VNTRen) anplifikazio zuzena egitean datza.



CEPA A:	CACGAC CACGAC CACGAC CACGAC	→ 4 REPETICIONES
CEPA B:	CACGAC CACGAC CACGAC CACGAC CACGAC CACGAC CACGAC	→ 7 REPET.
CEPA C:	CACGAC CACGAC	→ 2 REPET.

**5. irudia.** Kokapen ezberdina eta errepikapen kopuru ezberdina duten VNTRen adibidea.

2003an, garai hartako MLVA sistema sofistikuena Lindstedt *et al.* taldekoek garatu zuten *Salmonella enterica* ssp. *enterica*-rentzat (van Belkum, 2006). Zortzi errepikapen guneen multzoa aukeratu zuten txikiena 6 bp-koa zen eta handiena 189 bp-koa (STTR1, STTR2, STTR3, STTR4, STTR5, STTR6, STTR7 eta STTR8). Gune bakoitzeko errepikapenen kopurua 2-tik 15-era alda zitekeen. Berrikuntza gisa, PCR produktuak fluoreszentiarekin markatu zituzten elektroforesi-kapilarrean bereiztu ahal izateko, eta horrela, zati bakoitzaren tamainu konkretua ezagutu ahal izateko. 2004an teknikaren zenbait hobekuntza plazaratu zituzten *Salmonella Typhimurium*-entzat (Lindstedt *et al.*, 2004), adibidez bi VNTR berriren sarrera (STTR9 eta STTR10pl) aztertutako anduiak tipifikatzeko orduan zehaztasun handiagoa lortzeko. Anplifikatutako zatien tamaina bakoitzaren alelo zenbakia zehaztu zuten emaitzak zenbaki-

balioetan adierazteko, eta horrela, andui bakoitzaren zenbakien patroia bat sartzen zen laborategien arteko datuen elkartruckerako. 2009an, Larsson *et al.*, teknikaren interpretazioa eta azterketa hobetzeko zenbait aldakuntza egin zituzten (3. taula).

**3. Taula.** MLVaren zenbaki-patroiak lortzeko eta interpretatzeko irizpideak, Larsson *et al.* (2009) lanetik egokitua.

Haslea	Produktua	Errepikapen unitatea		Alelo kop.	Zatien tamaina Alelo motak
STTR9	153 - 270 pb	9 pb		14	153, 162, 171, 180, 189, 198, 207, 216, 225, 234, 243, 252, 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 261, 270 13 14
STTR5	187 - 301 pb	6 pb		20	187, 193, 199, 205, 211, 217, 223, 229, 235, 241 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 247, 253, 259, 265, 271, 277, 283, 289, 298, 301 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
STTR6	270 - 402 pb	6 pb		23	270, 276, 282, 288, 294, 300, 306, 312, 318, 324, 330, 336, 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 342, 348, 354, 360, 366, 372, 378, 384, 390, 396, 402 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
STTR10 pl	317 - 449 pb	6 pb		23	317, 323, 329, 335, 341, 347, 353, 359, 365, 371, 377, 383, 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 389, 395, 401, 407, 413, 419, 425, 431, 437, 443, 449, 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
STTR3	337- 616 pb	27 pb	33 pb	8	337, 370, 436, 451, 463, 469, 490, 496, 08 09 011 309 111 012 211 112 517, 523, 544, 550, 572, 616 311 212 411 312 511 314

### 3.2.3. Polimerasaren kate-erreakzioa (PCR)

Polimerasaren kate-erreakzioa (PCR), 1986an Kary Banks Mullis-ek garatutako biologia molekular arloko teknika da. Asmakizun horrengatik kimikako Nobel saria irabazi zuen 1993an. Dena den iritzi kontrajarriak daude PCR-aren asmatzaile bakarra izateak zalantzan jartzen dutenak. 1971an, Kleppe *et al.* plazaratutako lanean, entzimen eta hasleen bidez DNA sekuentzia txiki

batzuk erreplikatzeko metodo bat deskribatu zen lehenengo aldiz. Hala ere, PCR printzipioaren aurrerapauso horrek ez zuen arreta handia jaso.

PCR teknika, DNA zati zehatz baten “in vitro” amplifikazioan datza. Jarraian errepikatzen diren zikloak egiten dira: hasieran DNAREN bi harizpiak banatzeko desnaturalizazioa egiten da, ondoren hasleen eta DNA moldearen arteko hibridazioa gertatzen da, eta azkenik, amplifikatutako zatien luzapena edo elongazioa ematen da. Horretarako ezinbestekoa da DNA hasle espezifikoaren erabilera. *Primer* bezala ere ezagunak dira eta amplifikatu nahi den DNA zatiaren muturrekiko osagarriak izan behar dira. Dena den, 80ko hamarkadan teknika honen arrakastaren oinarria DNA polimerasa termoeogonkor (tenperatura altuak jasateko gaitasuna) baten erabilpena izan zen. DNA harizpiak banatzeko behar diren tenperaturak 94°C-ak baino altuagoak dira eta hasiera batean erabiltzen ziren DNA polimerasak erreplikazio ziklo bakoitzean desnaturalizatzen ziren. Horrela, 1976. urtean *Thermus aquaticus* bakterio termofiloaren Taq polimerasaren aurkikuntzak PCR metodoaren eragozpenak ezabatu zituen. Aurkikuntza horrek prozesuaren automatizazioa ahalbidetu zuen eta termozikladore batean egiteko aukera bideratuz.

DNA zatiaren amplifikazio prozesua aurrera eramateko DNA moldea, dNTPak, DNA polimerasa termoeogonkorra, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O eta hasla bat edo bi behar dira. Desnaturalizazio, hibridazio eta luzapen zikloak errepikatzen dira kopuru konkretu batez zikloetan zehar jadanik amplifikatuak izan diren zatiak molde bezala jarduten dute gainontzeko amplifikazioetarako eta aukeratutako zatiaren amplifikazio esponenziala eragiten da.

Gaur egun PCR mota ugari daude horren adibidea doktorego-tesi honetan erabiliak izan diren *Long-PCR* eta alderantzizko PCRa dira. Entzima termoeonkor ezberdinen erabilpena (batzuk akatsen zuzenketa burutzen dutenak, besteak denbora luzeagoko zikloak...) eta entzimen konbinazioak *Long-PCR*-aren diseinurako ezinbestekoak dira. Bestalde, alderantzizko PCRaren bidez gene zehatz bat bakarrik ezagutuz PCRa kanpoalderantz egin daiteke gene horretatik abiatuta. Oso baliogarria da insertzio genomikoen alboetan dauden sekuentziak identifikatzeko.

#### **3.2.4. Genoma osoaren sekuentziazioa (Hurrengo belaunaldiko sekuentziazioa, NGS)**

Genoma, organismo batek edo espezie jakin batek duen informazio genetiko osoa da. Genoma guztiaren sekuentzia bakarra lortzeko metodoa Genoma osoaren sekuentziazioa bezala ezagutzen da (WGS, *whole genome sequencing*). Hurrengo belaunaldiko sekuentziazioa barneratzen duten ikerketa lanak genomaren aldakuntzak aurkitzeko bide eraginkorrak dira (Sabat, 2013). NGS (*Next Generation Sequencing*) teknologia horiek “Bigarren belaunaldiko sekuentziazio teknika” bezala ere ezagunak dira, Sanger metodoaren bidez burutzen den Lehenengo belaunaldiko sekuentziaziotik bereizteko. NGSen abantail nabarmenena Sanger metodoaren bidezko sekuentziazioaren aurrean, 35-700 bp luzeerako milioika irakurketa zati edo *reads* lortzeko gaitasuna da esperimendu edo *run* bakar batean eta prezio baxuan. Genomaren nukleotido-sekuentzia osoa eraikitzeko sekuentzia motzak teilakatzea beharrezkoa, *de novo* teilakatuz edo datubaseetan eskuragarri dauden aldeztatik guztiz sekuentziatutako genomekin alderatuz .

Azken urteetan, genoma osoaren sekuentziazioa ikerketa epidemiologikoetarako ezinbesteko tresna bilakatzen hasi da eta etorkizunean WGS teknologia laborategi klinikoetan errutinako teknika bezala erabiliz posible izango da isolamendu bakterianoen identifikazio eta karakterizazio zehatzagoa (Sabat, 2013). Hala ere, erronka nagusia WGSan lortzen diren datu kopuru altutik informazio garrantzitsuena azkar aztertzeke zailtasuna da. Bestalde, teknologia honen bidez lortzen diren zatiak nahiko motzak izateak *de novo* sekuentziazioan zatiak gaizki elkartzea edo okerreko ordenean jartzea eragin dezake. Beraz, teilakatzeko ondo egiteak zailtasun handia dakar. Hala ere, genomaren sekuentziazio osoan, normalean ez da genomaren % 90a baino gehiago lortzen, *contig*-ak teilakatzeko orduan hutsuneak edo tartekak geratzen direlako genomaren zehar egoten diren errepikapenengatik. Irakurketen (*reads*) loturak sekuentzia luzeagoak lortzeko aukera eman arren, *contig* kimerikoak sortzearen arriskua dakar, bereziki elkarrekiko erlazio estua duten habitat bereko espezieen artekoak edo espezie ezberdinen artean oso kontserbatuta dauden sekuentzien artean (adibidez, transposasak, fagoak eta geneen transferentzia horizontala). Horrez gain, *contig*-ak lotzeko orduan aldeztu aurretik lortutako informazioa desitxuratu daiteke: espezie batean errepikatutako sekuentzia ugari lortzen direnean gainjarri daitezke, eta genomaren zonalde berdinekoak izango balira bezala identifikatutako dira, ondorioz emaitza okerrak eskuratuz. Irtenbide bat *contig* zehatz bat osatzen duten irakurketa (*reads*) guztien jarraipena egitea da eta lortutako informazioarekin mapa bat osatzea. Guztiz sekuentziatuta dauden genomak eskuragarri izateak izugarri errazten du identifikazio lana, bi genomen arteko konparaketak eginez. Bestalde, geneen bilatzaile desberdinen konbinazioak eta geneen arteko zonaldeen eta alboko

geneen azterketak maiz erabiltzen diren estrategiak dira halako muga batzuk gainditzeko (Teeling, 2012).

Hasiera batean, Roche-ko 454 pirosekuentziadoreak izan zen erabiliena, sekuentzia (*reads*) luzeagoak ekoizten zituelako beste enpresen plataformekin alderatuta. Ondoren, bereziki metagenomaren eskala handiko proiektuak Illumina plataformaren erabilera ugartu dute eta neurri txikiagoan SOLiD plataformarena. Nahiz eta azken bi horiek pirosekuentziazioak baino sekuentzia motzagoak ekoiztu, etekin handiagoa eskaintzen dute, eta ondorioz, emaitza fidagarriagoak prezio berdinetatik (Teeling, 2012). Gainera genoma osoen sekuentziazioaren prezioa behera doa urterik urte (Armengaud, 2013).

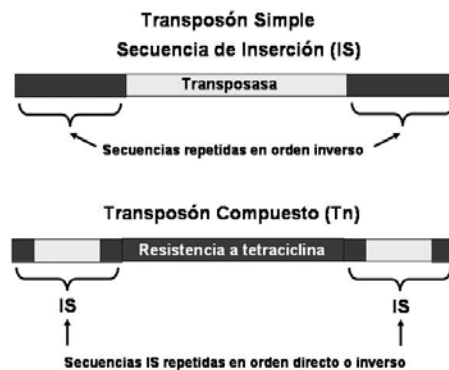
NGS-ek genoma mikrobiano ugariaren sekuentziazio azkarra ahalbidetu dute, beraz nabaria da mikrobiologiako erabilpen gehienentzat preziatuagoak izango direla aparatu azkarrak eta txikiak, giza sekuentziaziorako diseinatu izan diren edukiera handiko aparatuekin alderatuz. Halako bi plataforma Ion torrent PGM eta Illumina MiSeq, sekuentziazioaren hasierako amplifikazio prozeduretan erabiliak dira eta mikrobiologoaren artean nahiko erabiliak izaten hasi dira (Didelot, 2012). NGS-ek, metagenomikaren eboluzioarekin jarraituko dute eta gerta liteke noizbait IBM edo Roche-ren DNA transistorea eremu honen iraultza berriz eragitea.

#### **4. Insektzio-sekuentziak**

Berezko mutazioak, hautapen naturala eta isolamenduak eboluzio biologikoaren funtsezko elementuak dira (Arber, 1991). Gene baten funtzioen eboluzioak edo garapenak DNAREN berrantolaketen ondorioz gerta daitezke edo nukleotido-sekuentzien alterazioen ondorioz izatea, nukleotidoen

ordezkapenengatik, delezioengatik, insertzioengatik edo bikoizpenengatik, eta batzutan elementu genetiko mugikorren eraginez (Arber, 1990 eta 1991).

Transposonak edo elementu genetiko transposagarriak 50ko hamarkadan Barbara McClintock artoarekin egindako ikerketan aurkitu ziren lehenengo aldiz (Klug eta Cummings, 1999). Transposon bakterioanoak bakunak edo konposatuak izan daitezke. Transposon bakunean transposasak kodetzen duen genea agertzen da kontrako norantzan errepikatuta dauden sekuentziez inguratuta. Egitura hau insertzio-sekuentzia bezala ezagutzen da (*Insertion Sequence*, murriztuta IS). Transposon konposatuetan dauden geneen funtzioa ez dago insertzio prozesuarekin erlazionatuta (adibidez antimikrobianoekiko erresistentzia geneak) eta insertzio-sekuentziez inguratuta daude (6. irudia) (Klug eta Cummings, 1999).



**6. irudia.** Transposon bakun (IS) eta konposatuen egitura (Tn).

1970.eko hamarkadan aurkitu ziren lehenengo insertzio-sekuentziak ikertzaile ezberdinen eskutik lehenengo behaketa (detekzioa) *E. coli*-ren IS-etan egin zen (Kleckner, 1977). IS-en aurkikuntza eta ezaugarrien azterketaren



inguruan egin ziren ikerketa lanetan, ondorioztatu zen IS-en insertzioaren eragina hereditarioa zela eta mutazioa ez zela nukleotido pare batekoa baizik eta DNAREN zati motz eta zehatz batek kromosoma bakterianoan txertatu izanaren ondorioa. Segmentu hori kromosoma bakterianotik espontaneoki banatzean, funtzio basatia berreskuratzen zen (Klug eta Cummings, 1999). Geroago, antzeko eran jokatzen zuten beste segmentu batzuk aurkitu ziren, kromosoman txertatu eta geneen funtzioetan eraginez. Zatiak nahikoa motzak ziren, gehienetan, ez ziren 2.000 bp baino handiagoak. Aurkitu zen lehehengo insertzio-sekuentzia *E. coli*-ren IS1 izan zen, 800 bp luzerakoa. Insertzio-sekuentziak kromosomaren edo bakterio Gram negatiboen plasmidoen osagai arruntak izango balira bezala aurkitzen dira. *E. coli* K12 anduiaren kromosomak IS1-ren 8 kopia ditu, IS2ren 5 kopia eta IS3ren beste 3 kopia. Horrez gain IS1 *Salmonella* Typhimurium-en eta *Citrobacter freundii*-n ere aurkitu zen duela 30 urte baino gehiago (Kleckner, 1977).

Insertzio-sekuentziak, luzeerari dagokionez nahikoa motzak izateaz gain, nahikoa trinkoak dira. Bere mugikortasun funtzioaz gain, ez dute beste funtziorik kodetzen. Horregaitik IS-en egiturak bere mugikortasunerako ezaugarri garrantzitsu bat adierazi behar du. Mutur bakoitzean, nukleotidoen sekuentzia, ITR edo Inbertitutako Errepikapen Amaieraz osatuta. ITRak zeintzuek tamainaz aldatzen dira IS batetik bestera (18-40 bp). ITR horiek ISa DNAn txertatzeko mekanismoetan ezinbesteko osagaiak dira (Madigan *et al.*, 2009). Insertzio-sekuentziak hoberen definitzen duen zatia transposasa da (bere kokapena kodetzen duen entzima). Normalean bat edo bi genez kodetuta dago eta IS-aren gehiengoa osatzen dute (Mahillon eta Chandler, 1998). Hortaz, insertzio-sekuentziak DNAREN zati txiki bezala definitzen dira (<2.5kb),

antolaketa genetiko sinplearekin eta itu-molekularen toki anitzetan txertatzeko gaitasunarekin (Mahillon eta Chandler, 1998).

Sarritan, IS-ak lehentasuna azaltzen dute DNAREN zonalde zehatz batzuetan txertatzeko. Honen arabera proposatzen da IS-aren amaierako muturrak itu-sekuentzia konkretu batzuk ezagutzen dituztela kromosoman txertaketa prozesuan zehar (Klug eta Cummings, 1999). DNAREN txertatze-toki edo puntu “bero” horiekiko lehentasun honek ikertzaile ezberdinek aztertu dute. Halling eta Kleckner-en lanean (1982) adibidez ondorioztatu zuten Tn10 transposonak “*hotspots*” zehatz batzuetan txertatzen dela lehentasunez.

Gaur egun 500 IS baino gehiago deskribatu dira. ISak 73 genero desberdinetan aurkitu dira eta 159 espezie bakterianoak biltzen dira. 1998. urtean, Mahillon-ek eta Chandler-ek egindako lanean, 443 IS-k 17 familiatan sailkatu ziren 17 familiatan, hurrengo irizpideetan oinarrituz: (i) bere antolaketa genetikoaren araberrako antzekotasuna; (ii) bere transposasetan zeuden antzeko marka edo marka berdinen arabera; (iii) amaiera antzekoak (IR), eta; (iv) itu-sekuentziaren antzekotasunaren arabera (tamaina zehatz bateko bikoizketa eraginez). Era honetan 443 insertzio-sekuentziak sailkatu ziren hurrengo familietan: IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/IS605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 eta ISL3.

IS1 insertzio sekuentziak, *E. coli*-n deskribatu zen lehenengo aldiz, 768 bp-ko luzeera dauka batezbeste eta bere IR-en (amaiera-muturrak) luzeera aldakorra da (18-23 bp artean). IS1-aren familian 14 insertzio-sekuentzia daude sailkatuta.

IS3 baita detektatu zen lehenengo aldiz *Escherichia coli*-n, baina kasu honetan, luzeera 1.258 bp-koa da. Bere inbertitutako amaiera-muturrak (IR) 29-40 bp-koak dira. IS3 familiak 6 insertzio-sekuentzia gehiago barneratzen ditu.

IS26, Mollet *et al.*-en lanean plazaratua izan zen 1983.an eta IS6-arekin zuen antzekotasunen arabera geroago IS6 familian sailkatu zen. IS26-aren luzera 820 bp-koa da, eta IR-ak 14 bp-koak dira.

Azkenik, IS10 *Salmonella* Typhimurium-en deskribatu zen lehenengo aldiz eta IS4 familian barneratu zen. Luzera 1.329 bp-koa da eta IR-ak 17-22 bp bitartekoak dira.

## 5. Aztertutako anduien aurrekariak

Doktorego-tesi honetan azken urteotan Espainian epidemiologikoki garrantzitsuak izan diren *Salmonella enterica*-ren 3 serotipoetatik eratorritako 4 barianteen ikerketa egin da. Bakoitzaren sarrera bat egiten da jarraian.

### 5.1. *Salmonella* Typhimurium

*Salmonella enterica* Typhimurium bezala deskribatutako anduiak 1,4,[5],12:i:1,2 formula antigenikoa dute, non antigeno somatikoak 1,4,5,12 dira eta H antigenoen bi faseak daude: 1. fasean “i” eta 2. fasean “1, 2”.

Typhimurium serotipoa *Salmonella*-ren serotipoen artean munduan zehar infekzio gehiago eragiten duenetariko bat da eta urtero milioka giza-infekzioen eta heriotzen arduraduna da. *S. Typhimurium Salmonella*-ren ondorioz gertatutako elikadura-intoxikazio kausa arrunta da. Bere izenak

adierazten duen bezala saguetan sukarrak tifoideoaren antzeko gaixotasuna eragiten du. Gizakietan *S. Typhimurium*-ek ez du *S. Typhi*-k bezalako gaixotasun erasotzailea eragiten eta normalean ez da hiltzailea.

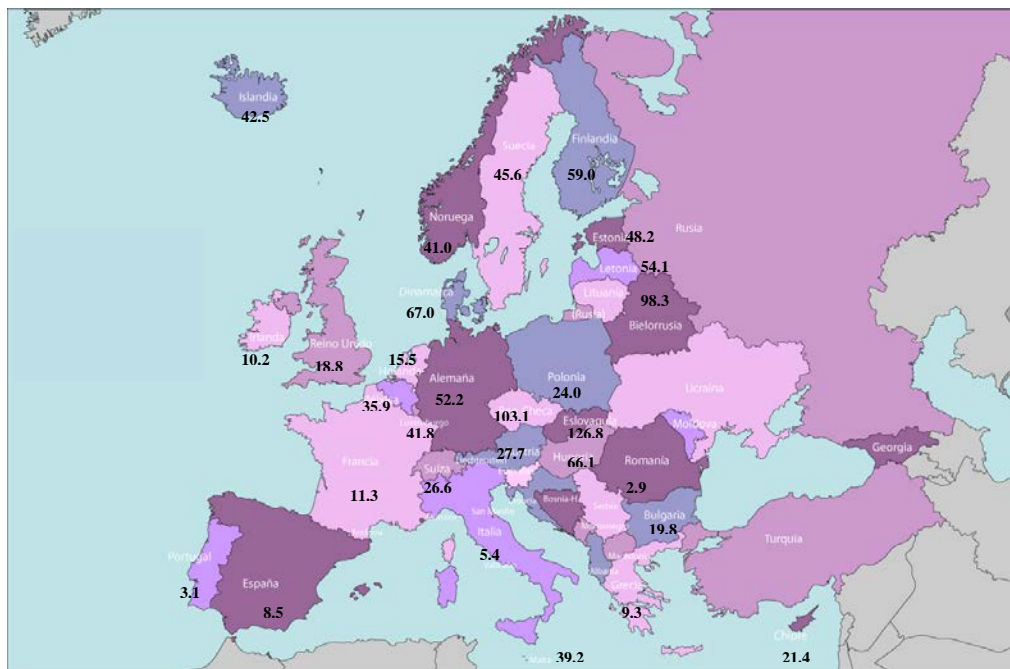
2000 eta 2002 urteetan *Typhimurium* serotipokoak Europan eman ziren 232.442 salmonelosi kasuen % 20a suposatuz (Gatto, 2006). 2008an, gizakietan arruntagoak ziren zoonosien artean 2. toki hartu zuen, Europar Batasunean (EB) baieztatutako 131.468 kasuekin. *S. Enteritidis*-en ondorioz sortutako kasuak behera egin zuten heinean *S. Typhimurium* kasuen gorakada eman zen. Urte hartan *S. Enteritidis*-en eta *S. Typhimurium*-en gailentzearen beherakada nabaritu zen oilo erruleen artean. Urte horretan EBeko herrialdeetan ezarri ziren animalia hauentzat bereziki egindako kontrol programak (EFSA, 2010). 2010 urteko EFSAren txostenean, *S. Typhimurium*-aren 2.088 kasuen beherakada deskribatu zen 2009. urtearekin konparatuz. Esan beharra dago 2009an *S. Typhimurium*-ak andui monofasikoen datuak biltzen zituela eta 2010an bereizita aurkeztu zirela (EFSA, 2011a, 2012a).

*S. Typhimurium*-aren gordailu naturala txerria izan arren, *animalia* iturri ezberdinetan isolatua izan da serotipo hau, hala nola oilaskoetan, oilo erruleetan, indioilarretan, etab. (EFSA 2011). 2009ko txostenean (EFSA 2010) *S. Typhimurium* DT191 agerpena aipatzen da 237 giza kasutan. Fagotipo honen gordailua artoko sugeak ziren, AEB-tik EB-ra inportatutako saguekin elikatuak izan zirenak (Harker et al, 2011). Oso gutxitan aurkitu izan da *Salmonella* esneki, fruta edo barazkiak bezalako beste elikagaietan (AEBn izan ezik).

*S. Typhimurium* kasu gehienak kutsatutako txerri haragiaren, oilategiko hegaztien eta behi-haragiaren kontsumoarekin erlazionatuta daude. Transmisioa

elikagaien prestakuntza zonaldeetan organismoa sartzen denean ematen da. Bertan elikagaietan biderkatzea baimentzen da, adibidez jakiak gordetzeko temperatura desegokiak erabiltzean, jakiak gaizki egostean eta prestatuak izan diren eta prestatu gabeko elikagaien arteko kutsadura trukea eman denean. Organismoa kutsatutako animalien edo kutsatutako gizakien artean ere transmititu daiteke eta baita materia fekalez kutsatutako inguruneetan ere.

*S. Typhimurium*-aren banaketa geografikoa oso zabala da mundo osoan zehar banatutako patogenoa da eta. ECDCaren txostenen arabera *Salmonella*-rengatik emandako infekzioaren intzidentziak 2004. urtetik aurrera behera egin du etengabe. Kasuen indize altuena Txekiar errepublikan, Eslovakian, Hungarian eta Lituanian ematen da, nahiz eta azken urteetan lurralde horietan ere behera egin duen (7.irudia). Dena den, banaketa zabala izan arren eta kasu kopuruaren beherakada eman arren, *Salmonella*-ren ondorioz gertatutako infekzioen gehiengoa 5 urtetik beherako haurretan ematen da eta kasu gehienak abuztuan eta irailan izaten dira (ECDC 2011).



**7.irudia.** 2008an Europan plazaratutako salmonelosen kasu kopuruak/100.000 biztanle. ECDC-aren 2008. urteko txosten-epidemiologikotik moldatua.

### 5.1.1. *Salmonella enterica* 4,5,12:i:-, U302 fagotipoa eta erresistentzia anitzekoa

Typhimurium bezala izendatutako isolatuak edo beste serotipoko isolatuak monofasikoak diren determinatzeko formula antigeniko osoa aztertu beharra dago. *S. Typhimurium*-aren kasuan deskribatu dira bariante antigenikoak gabezia dutenak 1. edo 2. faseko H antigenoetan edo bietan (hurrenez hurren: 1,4,[5],12:-:1,2, edo 1,4,[5],12:i:-, edo 1,4,[5],12:-: -). Bariante horiek “*S. Typhimurium*-aren bariante monofasiko” bezala izendatu dira (EFSA, 2010).

1997an isolatu izan zen Espainian lehenengo aldiz *Salmonella*-ren andui

monofasikoa [4,5,12:i:-] formula antigenikoarekin, estatua maiztasun altuena izaten duten serotipoen artean 4.a izatera helduz 1998an (Echeita, 1999). Izugarrizko areagotze honen ondorioz zenbait ikerketa epidemiologikoak egin ziren bere jatorria zehazteko helburuarekin (Echeita 2001, Guerra 2000, Garaizar 2002, Zamperini 2004). 2001ean Echeita *et al.*-ek egindako lanean, *S. Typhimurium* eta andui monofasiko atipikoaren arteko erlazioa frogatu zen. Lan horretan *S. Typhimurium* DT104 fagotipoaren eta U302 fagotipoaren bi sekuentzia espezifiko aztertu ziren, (*Salmonella enterica* [4,5,12:i:-]-an aurkitu zirenak), besteak beste bi serotipoen arteko erlazio ebolutiboa frogatuz (Echeita, 2001).

Bariante monofasiko horren ezaugarrien artean nabarmentzekoa da sarritan antibiotikoekiko aurkezten zuen erresistentzia anitza: ampizilina, kloranfenikola, sulfonamida, gentamizina, estreptomizina, tetraziklina eta sulfamethoxazol-trimetoprima (R-ACSuGSTSxT). Kasuen % 55a baino gehiagoan bariante horrek U302 fagotipoa zuen. Beste aldetik, ezaugarri nagusia bigarren faseko flageloen sintesiaren arduraduna den operonaren delezioa zen. Delezio horrek anduiak monofasikoak izatea eragiten zuen eta formula antigenikoan dagoen ausentziaren erakusle zen.

2002an gure ikerketa taldeak serotipo horretako andui batzuen karakterizazioa egin zuen DNA *microarray*-en bidez, eta *Salmonella* Typhimurium LT2 anduiaren genomarekiko (Garaizar, 2002). Emaitzei esker pSLT plasmidoaren delezioa detektatu zen eta beste 5 gene kromosomiko taldeen delezioa ere. Delezio horien artean, bigarren faseko flageloen sintesiaren arduraduna zen zonalde genetikoa zegoen. Gainera,

PCR bidez anplifikatu ziren *fljAB* operonaren inguruan zeuden eskualdeak eta sekuentzia hoiek lan honen oinarria izan dira.

### **5.1.2. *Salmonella enterica* 4[5]12:i-, tetraerresistentek**

Aurreko atalean deskribatutako anduien agerpen eta zabalkuntzaren ostean Typhimurium-en beste bariante monofasiko baten hedapena hasi zen. Barianteak erresistentzia kopuru ezberdina zuen, fagotipo ezberdinena, etab. Ondoren, zenbait ikerteta taldeak andui berri horiek beste bi lerro ebolutibotan sailkatu zituzten, AEB-koa eta EB-koa hurrenez hurren (Lucarelli, Soyer, EFSA 2010).

Europako Zaintza Sistemak (TESSy) plazaratutako datuen arabera, 30 herrialdetan egindako ikerketan, bakarrik 7 herrialdek bidali zituzten datuak. 2007an hirugarren lerro ebolutiboan (EB-koa) taldekatutako anduien eraginez sortutako 360 kasu salatu ziren eta 2009an 1.416 kasuetara heldu zen (EFSA, 2010).

## **5.2. *Salmonella* Paratyphi B**

*Salmonella* Paratyphi B anduiek 1, 4, [5], 12: b:1,2 formula antigenikoa dute, non antigenoa somatikoak 1,4,12, dira eta 5. antigenoaren presentzia aldakorra da, 1.faseko antigeno flagelarra “b”-ri dagokio eta 2. fasekoa “1, 2”da. *S. Paratyphi B* eta *S. Paratyphi B* Java barietatea, 1,4,[5],12:b:1,2 serotipoaren biotipoak dira. Sukar paratifoidea eta gizakietan gastroenteritisa eragiten dute hurrenez hurren (Denny 2007, Threlfall 2005b). Bi barianteak tartratoaren metabolismoaren azterketaren bidez desberdinu daitezke, baina prozedura hau ez da errutinaz jarraitzen laborategi guztietan



(Sundeeep, 2008). Java barietateak karbono iturri bakar moduan tartratoa hartitzeko gaitasuna duenez *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Paratyphi B dT+ bezala izendatzen da. *S. Paratyphi B dT(+)*-a gizakietan birulentzia txikiagokoa da beste biotipoarekin konparatuz, d-tartratoa (dT-) hartitzeko gaitasuna ez duena nahikoa birulentoa da eta (Hernandez, 2012).

Sukar enterikoa eta sukur tifoidea bezala, sukur paratifoidea ez da oso arrunta garatutako herrialdeetan. Sukur tifoideoak eta paratifoideoak gaixotasun arraroak dira EB-an (ECDC, 2011). Agertzen diren kasuen gehiengoa EB-tik kanpoko noizbehinkako inportazioen ondorioa dira eta banaketa horrek EB-eko hiritarren bidai-aukeren adierazlea da gaixotasun horiek endemikoak diren herrialdeetara. Dena den, 2000. urtean estimatu zen sukur paratifoideoaren 5.400.000 kasu egon zirela mundu osoan (Sundeeep, 2008). Amerikako Estatu Batuetan 2005 eta 2006 urteen tartean *Salmonella* Paratyphi B-ren 49 kasu detektatu ziren, eta % 76a Java barietatekoak ziren (Sundeeep, 2008). 2010an Txilen 2.728 *Salmonella* kasu eman ziren eta *S. Paratyphi B* hirugarren maiztasun postuara heldu zen Enteritidis eta Typhimurium ostean.

Gizakia, *S. Paratyphi B*-ren ezagutzen diren gordailuetako nagusia da. *Salmonella*-rengatiko infekzioak eskuratzen dira batez ere gorotz-aho tansmisioaren bidez, edo infektatutako persona baten gorotzekin kutsatutako elikagaien kontsumoaren bidez. Kontuan izan behar da persona horiek asintomatikoa izan daitezkeela eta batzuetan bektore-mekanikoen bidez (euliak eta labezomorroak) eman daiteke kutsadura elikagaien gainean jartzean bakterioak bertan biderkatu baitaitezke elikagaia kutsatuz eta pertsonaz persona transmisioa ahalbidetuz.

Java barietateaz infektatutako gaixoak, dT(-) bariantearekin konparatuz, ez dute hain gaixotasun larria jasaten. Beherakoan odola izan dezake eta gorakoak, sukarra eta sabeleko kalanbreak ere aer daitezke (Harris, 2009). Nahiz eta Java biotipoa birulentzia txikiagokoa izan, infekzio-inbasiboko kasuak eman dira noizbait (Denny 2007, Threlfall 2005b, Desenclos 1995).

*S. Paratyphi B* Java biotipoa *animalia*-gordailua izanda, erlazionatu izan da, kasu isolatuetan, kutsatutako elikagaiekin: entsaladak, ahuntz gaztak, oilaskoak eta narrazti zein akuarioetako arrain tropikalekin (Hernandez 2012). Narraztiak Java barietatearen eramaile arruntak dira beraien hesteetan, eta normalean, ez dute gaixotasunaren seinalerik azaltzen. Bakterioak gorztetan askatzen dituzte eta animalia dagoen lekua kutsatzen dute, ura eta baita akuarioaren gainazal guztiak. Nahiz eta narrazti askok *Salmonella*-ren eramaile izan, dortokak arrisku berezia dute, gure gizartean arrunta delako dortoka txikiak maskota bezala izatea umeei (Hernandez 2012). *S. Paratyphi B* Java biotipoak eragindako agerraldiak Australian ez dira elikadura jatorrikoak izaten. 2007. urtera arte deskribatutako agerraldiak inportatutako akuarioetarako arrain txikien ondoriozkoak izan ziren, eta 2008 eta 2009an, haurtzaindegietako arekutzatan emandako kutsapenaren ondoriozkoak (Staff 2012). 1972an AEB-an argitaratutako lan batean, deskribatu zen ordura arte dortoketan topatutako infekzioaren prebalentzia altuena: etxeko dortoken % 85a bakterio horrekin kutsatuta zeuden. AEB-n urteroko *Salmonella* 1,5 milioi kasuetatik, 74.000 narraztien kontaktuarekin erlazionatuta daude. Salmonelosi kasu guztien artean estimatzen da % 3-5 bitartean narraztiekin erlazioren bat dutela (Lafuente 2013). Gure herrialdean, Bizkaiko Zaintza Epidemiologikoko Unitateak, 2010eko iraila eta 2011ko urriaren artean Java barietateak eragindako 8

infekzio kasu detektatu zituen eta beste 3 kasu bariante monofasiko batek eragindakoa (4,5,12:b:-) (Hernandez 2012). 2009an Castellón-en hiru kasu eta beste bi Bartzelonan detektatu ziren *S. Paratyphi B* Java-rekin infektatutako umeetan dortoekin izandako kontaktuaren ostean (Lafuente 2013).

*Salmonella* Paratyphi B Java organismo konplexua da, genetikoki ezberdinak diren leinu klonalekin. *S. Paratyphi B* dT(-)-a ez bezala *S. Paratyphi B* dT(+)-a kutsatutako elikagaien bidezko agerraldiak eragin ditu. Adibidez, 2003an Frantzian 273 banako infektatua izan ziren eta bat hil egin zen ahuntz gaztarekin erlazionatutako agerraldi batean (Weill 2005). Duela gutxi, antimikrobianoekiko erresistentziaren arabera karakterizatutako bi leinu klonal sakabanatu dira. Leinu bata Herbeheretan topatu zen ukuiluetako hegaztien produkzioarekin erlazionatuta 2000 eta 2004 urteen bitartean (Dorn 2001, Van Pelt 2003). Horrek Europa osoko biztanleetan zenbait infekzio eragin ditu Herbeheretatik inportatutako ukuilu-hegazti kutsatuengatik (Brown 2003). Bigarren leinu klonala, *Salmonella*-ren 1.go Irla Genomikoa izateagatik bereizten dena (SGII), mundu osoan zehar sakabanatu da. Andui horiek erresistenteak dira orokorrean ampizilinarekiko, kloranfenikolarekiko, estreptomizinarekiko, espektinomizinarekiko, sulfonamidekiko eta tetraziklinekiko (Threlfall 2005b, Weill 2005, Han 2006) eta arrain tropikaleko akuarioekin bereziki erlazionatu dira (Gaulin 2002), baina abereetan ere eman dira agerraldiak (Evans 2005).

### 5.3. *Salmonella* Schwarzengrund

Schwarzengrund serotipoko anduiak 1,4,12,27:d:1,7 formula antigenikoa dute: antigeno somatikoak 1,4,12,27, dira eta 1. faseko flagelarra “d” da eta 2.fasekoa “1,7”.

Azken urteotan, *S. Schwarzengrund* zenbait herrialdetan gizakien eta ukuiluetako hegaztien infekzioak sortzen ari dituzten serotipo emergenteetako bat bilakatu da (Chen et al., 2010). Osasunaren Mundu Erakundearen zuzendaritzapean dagoen *Salmonella*-ren Zaintza programa Internazionalaren arabera (<http://www.who.int/salmsurv>), zenbait herrialdeetan, *Salmonella* Schwarzengrund elikagaietatik, animalietatik eta gizakietatik isolatzen diren *Salmonella*-ren 15 serotipo garrantzitsuenen artean dago (Chen et al., 2010). AEBn, txerri baserrietan identifikatutako *Salmonella*-ren lehenengo 5 serotipoen artean sailkatua da (Bahnsen et al., 2006). Gaixotasunen Kontrolerako Zentruaren arabera (CDC), kutsatutako oilaskoetan detektatu diren *Salmonella*-ren serotipo emergenteetako bat izango litzateke.

Munduan, prebalentzia balio baxuagoak ditu *S. Schwarzengrund*-ek *S. Enteritidis*-ek eta *S. Typhimurium*-ek baino. Beraz salmonelesi kasu gutxiago eragiten ditu. Dena den, azken urteetan serotipo horren intzidentzia handitu dela dirudi (Aarestrup 2007). Gaur egun zenbait herrialdeetan *Salmonella*-ren 20 serotipo ugarienen artean dago (Eslovakian, Zelanda Berrian, Venezuelan eta Tailandian adibidez) eta Danimarkan eta AEBn maiztasun handieneko 40 serotipoenetako bat da. 2004an AEBn, haragi iturritik isolatutako 5. serotipo ugariena izan zen (ukuiluratutako hegaztien haragiarekin erlazionatuta batez ere). Zenbait ikerketak proposatu dute gordailu arruntena ukuiluratutako

hegaztiak izan litezkeela (Aarestrup 2007, Limawongpranee 1999, Poppe 1991).

Manifestazio klinikoei dagokienez, ez dira aurretik deskribatuekiko gehiegi aldentzen. Gaixo gehienak beherakoa, sukarra eta sabeleko kalanbreak izaten dituzte infekzioa gertatu eta ondorengo 12-72 orduetan. Gorotzen laginetatik egindako ereinketaren bidez egiten da infekzioaren diagnostikoa. Gaixotasuna, orokorrean, 4-7 egun bitartekoa izaten da eta persona gehieank botikarik gabe sendatzen dira (CDC, 2007).



***HELBURUAK***

---





*Salmonella enterica* XIX. mendetik ezaguna den patogenoa da. Gaur egun, 2.500 serotipo baino gehiago deskribatuta daude baina ez dute garrantzia berdina jaso serotipo guztiek. Beraz, lagin klinikoetatik isolatutako serotipoak dira kontrola eta jarraipen epidemiologiko sendoagoa jaso dutenak. Baldintza hauetan, 1990. hamarkadan bariante monofasiko baten agerpenak eta hurrengo urteetan izandako zabalkuntzak frogatu zuen gaur egun eskuragarriak diren biologia molekularreko teknikek ahalbidetzen dutela aurretik karakterizatu gabeko bariante ugari eta berrien identifikazioa eta karakterizazioa. Doktorego-tesi honen lana oinarritzen da Typhimurium serotipoko 4,[5],12:i:- bariante monofasikoaren isolatuen karakterizazio molekularrean eta azken urteetan garrantzia klinikoa duten eta estatuan zirkulatzailerak izan diren hurrengo isolatuen karakterizazioan: 4,5,12:b:- eta 4,12:d:-.

Jarraitutako helburuak deskribatzen dira:

1. Helburua: Espainian detektatutako klon espainolakoak diren Typhimurium serotipotik eratorritako 4,5,12:i:- bariante monofasikoaren isolatuen azterketa: karakterizazio eta tipifikazio molekularra, fenotipo monofasikoaren oinarri molekularren azterketa eta jatorri ebolutiboaren determinazioa.
2. Helburua: Espainian detektatutako Typhimurium serotipoko 4,[5],12:i:- bariante monofasikoaren gainerako klonen azterketa: karakterizazio eta tipifikazio molekularra, fenotipo monofasikoaren oinarri molekularren azterketa, lerro klonalen eta bere barianteen identifikazioa, jatorri ebolutiboaren determinazioa, eta barianteen detekzio azkarra, kontrola eta jarraipena egiteko markatzaile epidemiologikoen diseinua.

3. Helburua: Espainian detektatutako 4,5,12:b:- bariantearen isolatuen azterketa: karakterizazio eta tipifikazio molekularra, fenotipo monofasikoaren oinarri molekularraren azterketa eta jatorri ebolutiboaren determinazioa.
  
4. Helburua: Espainian detektatutako 4,12:d:- bariantearen isolatuen azterketa: karakterizazio eta tipifikazio molekularra, fenotipo monofasikoaren oinarri molekularraren azterketa eta izan ebolutiboaren determinazioa.

# ***MATERIALAK ETA METODOAK***

---



### ***Salmonella enterica* isolatuak**

Ikerketa lan honen *Salmonella* isolatuak Mikrobiologia Zentru Nazionaleko (CNM, Majadahonda, Madrid) *Salmonella*-rentzako Erreferentzia Laborategi Nazionalaren (LNRS) bildumatik aukeratuak izan ziren. Isolatuak gaixoetatik, animalietatik edo elikagai jatorrizko iturrietatik herrialde osoko zenbait eskualdeetatik jasotzen diren. Jarraitzen den ohiko prozeduran serotipifikatzen dira serotipoetan, eta fagotipifikaziorako nazioartean onartuak dauden serotipoen eskemak jarraituz, fagotipoa zehazten da. Gainera, gaur egun jasotako isolatuen % 50ean antibiotipoa egiten da. Serotipifikazio, fagotipifikazio eta antimikrobianoekikon erresistentzia profilak LNRSak eskainitakoak izan ziren doktorego-tesi honen gauzatzerako.

Doktorego-tesi horrek osatzen duten isolatuak ikertzeko 4 bildumatan banatu ziren:

1. *S. enterica* subesp. *enterica* 4,5,12:i:- bariante monofasikoa U302 fagotipoa. Guztira 60 isolatu. I. bilduma.
2. *S. enterica* subesp. *enterica* 4,[5],12:i:- bariante monofasikoa fagotipo ezberdinekoak. Guztira 215 isolatu. II. bilduma.
3. *S. enterica* subesp. *enterica* 4,5,12:b:- bariante monofasikoa. Guztira 39 isolatu. III. bilduma.
4. *S. enterica* subesp. *enterica* 4,5,12:d:- bariante monofasikoa. Guztira 19 isolatu. IV. bilduma.

Jarraian bilduma bakoitza karakterizatzeko erabiliak izan diren metodoak azaltzen dira:

**1. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 4,5,12:i:- bariante monofasikoa U302 fagotipoa. I. bilduma**

60 isolatu aztertu ziren, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* 4,5,12:i:- bariante monofasikoa, U302 fagotipoduna eta ACSuGSTSxT erresistentzia profilarekin identifikatutakoak (ampizilina, kloranfenikol, sulfonamida, gentamizina, estreptomizina, tetraziklina eta sulfametoxazol-trimetoprim). Kontrol moduan hurrengo anduiak erabili ziren: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis serotipoa, 4 *Salmonella* Typhimuirum U302 eta DT104b fagotipoko anduiak (guztiak LNRSkoak), eta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium LT2 anduia (Espainiako Kultibo Moten Bildumakoa; CECT 722) (4. Taula).

**4. Taula:** I. bildumako isolatuak. Aztertutako antibiotikoak: anpizilina (AMP), kloranfenikol (CHL), sulfonamida (SUL), gentamizina (GEN), ziprofloxazino (Cip), kanamizina (Kan), estreptomizina (STR), zefalotina (Cef), azido nalidixikoa (Na), zeftriaxona (CTX), tetraziklina (TET), sulfametoxazol-trimetoprim (SxT). Erresistentzia profil nagusitik aldentzen diren erresistentziak markatu dira: urdinez irabazitakoak eta berdez galdutakoak.

UPV/EHU zbk	Isolatuak	Urtea	Iturria	Formula antigenikoa	Fag	AMP	CHL	SUL	GEN	Cip	Kan	STR	Cef	Na	CTX	TET	SxT
	6411	1998		4,5,12:i:-	U302												
603	995	2000	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
604	1670	2000	Ezezaguna	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
605	5552	2000	Txerriki	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
606	5664	2000	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
607	5743	2000	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
608	6163	2000	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
609	6217	2000	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
610	6987	2000	Txerriki	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
611	7151	2000	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
612	8076	2000	Ezezaguna	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
613	2961	2001	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
614	4213	2001	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
615	4609	2001	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
616	4668	2001	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
617	4836	2001	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
618	5113	2001	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
619	6148	2001	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
620	7178	2001	Txerriki	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
621	8927	2001	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
622	311	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
623	461	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
624	666	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
625	995	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R
626	998	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
627	954	2002	Txerriki	4,5,12:i:-	U302	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
628	2202	2002	Txerriki	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
629	2577	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
630	3569	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
631	51	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
632	561	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R
633	1953	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
634	7101	2002	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R	R
635	697	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
636	993	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
637	1093	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S

**4. Taula (jarraipena).**

638	1470	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
639	4038	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
640	5476	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
641	5854	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
642	5915	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
643	7267	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
644	2566	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
645	6686	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
646	7518	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
647	8404	2003	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
648	222	2004	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
649	539	2004	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R	R
650	835	2004	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
651	7713	2004	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	R	R
652	1874	2005	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
653	1992	2005	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
654	4655	2005	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R	S
655	5831	2005	Odola	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
656	7236	2005	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
657	916	2006	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
658	3250	2006	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
659	5218	2006	Odola	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
660	633	2007	Porcino	4,5,12:i:-	U302	S	R	R	R	S	I	R	S	R	S	S	S
661	2013	2007	Gorotz	4,5,12:i:-	U302	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
662	3897	2007	Odola	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
663	3356	2002		Enteritidis		R	S	S	R	S	I	S	R	S	S	S	S
	5480	2003		Typhimurium	U302	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	R	S
	8303	2004		Typhimurium	U302	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
	3024	2006		Typhimurium	PNR	R	R	R	S	S	I	R	S	S	S	R	S
	2004	2007		Typhimurium	104b	S	S	R	S	S	S	R	S	I	S	R	S



## 1.1. Elektroforesia eremu pulsatuko gelean (PFGE)

Lan honetan ikertutako andui guztien PFGE profilak PulseNet estandarizatutako prozedura jarraituz lortu ziren ([http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/PNL05\\_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf](http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf)):

### 1.1.1 Agarosa blokeen prestakuntza

- Isolatuen ereintza TSA (*Trypticasein Soy Agar*, Pronadisa, Madril, Espainia) eta 18-24 orduko inkubaldia.
- Esekidura bakterianoen prestakuntza CSB disoluzio indargetzailean (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH:8), andui esekidura bakoitzetik 2 ml erabilitzen dira absobantzia espektrofotometroan 420nm-tan neurtzeko. Dentsitate zelularra doitu 0,6 absobantzia baliora eta 400µl-ko amaierako bolumenean CSB disoluzio indargetzailean. Jarraian 20 µl proteinasa K gehitzen dira (21,2 mg/ml) (Fermentas, GMBH, Alemania)
- Agarosa blokeen prestakuntza, PFGE-rako espezifikoa den fusio-puntu baxuko agarosa erabiliz (SeaKem Gold Agarose, Lonza, Iberlabo S. A., Madrid, España): % 1 agarosa TE disoluzio indargetzailean (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), pH 8 eta % 10 SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Horrela prestatutako agarosak 50-55°C-tan mantentzen da eta 1:1 proportzian nahasten da esekidura bakterianoarekin. Homogeneizatu ondoren moldeetan banatu eta giro-tenperaturan solidifikatzen usten da.

### 1.1.2 Bakterioen lisia agarosa blokeetan

- Solidifikatutako blokeak 5 ml lisi-disoluzio indargetzailean sartzen dira (50 mM Tris, 50 mM EDTA, % 1 sarkosyl, pH 8). Ondoren 25 µl proteinasa K gehitzen dira (21,2 mg/ml) eta 2 orduz inkubatzen dira mugimendua duen bainu termikoan 55°C-tan.
- Agarosa blokeak ikuzten dira bi aldiz, 5 ml miliQ ur esterilarekin eta 4 aldiz pH 8-ko TE disoluzio indargetzailearekin. Garbiketa pausu guztiak bainuan egiten dira mugimenduarekin eta 50°C-tan. Azkenean, blokeak 5 ml pH8 TE disoluzio indargetzailean gordetzen dira 4°C-tan.

### 1.1.3 DNAren digestioa

- Agarosa blokearen 1,5 mm-ko zatia moztu eta gainontzekoa berriz 4°C-tan TE-n gordetzen da. Moztutako zatiak 37°C-tan eta 15 minutuz inkubatzen dira termoblokean 90 µl miliQ ur esterilarekin (Nuclease free, Fermentas) eta *XbaI*-entzimarentzako espezifiko den 10 µl disoluzio indargetzailearekin (Fast-Digest, Fermentas). 15 minutu igaro ondoren aurreDigeriketa disoluzioa kentzen da eta hurrengoa gehitzen da: 87 µl miliQ ur esterila, 10 µl disoluzio indargetzaile eta *XbaI* entzimaren 3 µl (50U/lagin). Termoblokean inkubatzen da 37°C-tan 2 orduz.

### 1.1.4 Elektroforesia

- Agarosa gela prestatzeko Seakem Gold agarosa erabiltzen da % 1ean eta 0,5x TBE disoluzio indargetzailean (44 mM Tris, 44 mM azido

borikoa, 1 mM EDTA). Digeritutako zatiak orratzean kokatzen dira eta kontu handiz plakaren gainean jartzen dira orratza kendu gabe, zatiak lekuz ez mugitzeko. Ondoren, agarosa gehitzen da eta solidifikatzen uzten da 30 minutuz giro-tenperaturan. *Universal Size Standard* kontrol moduan erabiltzen den *Salmonella* Braenderup H9812 anduiaren agarosa zatiak 1, 8 eta 15 posizioetan kokatzen dira, azkenik orratza kentzen da.

- Elektroforesia CHEF-DR III System ekipamenduan egin zen (Bio-Rad, Hercules, CA, AEB), 2l 0,5x TBE disoluzio indargetzailean eta tenperatura 14°C-tara egokituz, 21 orduz, 2,2-63,8 segundu bitarteko pultsoen progresio lineala aplikatuz eta 6V/cm boltaiarekin.

#### 1.1.5 Tindaketa eta irudia lortzea

- Gela, 400 ml ur destilatuarekin prestatutako 1 µg/ml etidio bromuro disoluzioan mantendu zen 25 minutuz eta mugimenduarekin. Jarraian 20 minutuko ikuzketak egin ziren ur destilatuarekin.
- Irudia TIFF formatuan lortu zen Gel Doc XRS ekipamenduarekin (Bio-Rad).

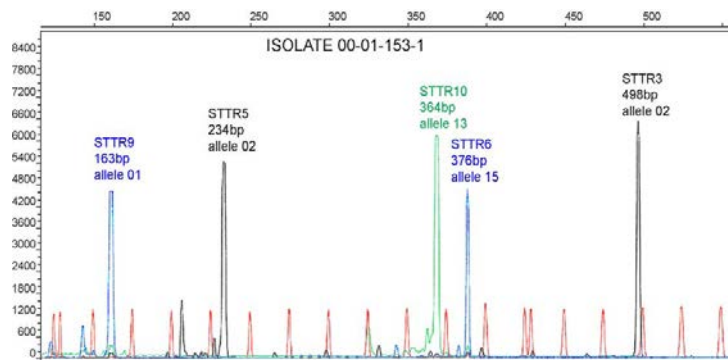
#### 1.1.6 Banda-profilen azterketa

- InfoQuestTMFP (Bio-Rad) software-arekin lortutako TIFF artxiboen azterketa DICE koefizientearen eta UPGMA taldekatzearen arabera egin zen eta % 1eko tolerantzia balioudun dendograma lortu zen. Banden esleipena egiteko eta PFGE profilak eratzeko, 33,3 kb baino txikiagoko bandak ez ziren kontuan hartu analisisian. Baita PulseNet

sareak emandako gomendioak kontuan izanda, banda batekiko ezberdintasuna onartu zen profilak zehazteko orduan.

## 1.2. Errepikapen kopuru aldakorreko tandem-en multilocus analisisa (MLVA)

MLVA analisisa egiteko 2004an *Salmonella* Typhimurium-entzat Lindstedt *et al.* deskribatutako metodoa erabili zen, hasleen markatze ezberdina erabiliz (5. taula). Aipatutako metodoan 2 PCR anitz egiten dira 2 eta 3 hasle bikoteekin hurrenez hurren (8. irudia). Ondoren, alelo zenbakia kalkulatu da Larsson *et al.*, 2009an proposatutako nomenklaturan oinarrituz. Horrela, 5 aleloei dagozkien 5 zenbakiekin osatutako patroiarekin klasifikatu ziren isolatu monofasiko guztiak.



**8. irudia.** Lindstedt *et al.* (2003)-ko elektroforesi kapilarreko irudia. Hasle bikote bakoitzeko teknikan lortzen diren 5 zatiak irudikatzen dira.

Esan beharra dago erreferentziatutako teknika *Salmonella* Typhimurium-ean erabiltzeko espezifikoki diseinatuta zegoela, eta ez lan honetan aztertutako bariante monofasikoentzako.

Zatien analisia Euskal Herriko Unibertsitateko Genomika eta Proteomika Zerbitzuko DNA bankuan egin zen (UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz), 3130 Genetic Analyser (4 Capillary) sekuentziadorean (Applied Biosystems, Foster City, California, AEB). Datuen azterketa BioNumerics v3.5 software-arekin egin zen (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgika).

**5. taula.** PCR bidez MLVA-ko errepikapenak detektatzeko erabilitako hasleak (Lindstedt *et al.*, 2003). Erabilitako markatze fluoreszentea adierazten da.

Locus	Hasleak	Nukleotido sekuentzia (5'-3')
STTR3	STTR3-F HEX	CCCCCTAAGCCCGATAATGG
	STTR3-R	TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA
STTR5	STTR5-F HEX	ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT
	STTR5-R	GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT
STTR6	STTR6-F	TCGGGCATGCGTTGAAA
	6FAM	
	STTR6-R	CTGGTGGGGAGAATGACTGG
STTR9	STTR9-F	AGAGGCGCTGCGATTGACGATA
	6FAM	
	STTR9-R	CATTTTCCACAGCGGCAGTTTTTC
STTR10, pSLT plasmidoa	STTR10pl-F	CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG
	TET	
	STTR10pl-R	GAAGGGGCCGGGCAGAGACAGC

### 1.3. *fljB* genearen delezioaren ikerketa

#### 1.3.1 DNA erauzketa

DNAREN erauzketa irakite-metodoaren bidez egin zen. Horretarako, 1 µl-ko edukiera duten inokulazio begiztak erabiliz, eta TSA hazkuntza-medio

solidoko hazkuntza bakterianotik lagina hartu eta 500µl miliQ ur esterilarekin esekidura bat prestatu zen. Jarraian esekidura 100°C-tan 10 minutuz mantendu zen eta ondoren zentrifugatu zen 13.000 rpm-tan 10 minutuz. Azkenik gainjalkina -20°C gorde zen etorkizunean erabiltzeko.

### 1.3.2 Polimerasaren kate-erreakzioa (PCR) eta sekuentziakzioa

Ikerketa-taldearen aurreko lan batean *fljBA* operonaren delezioaren zati bat sekuentziatzea lortu zen (Garaizar *et al.*, 2002). Lortutako sekuentzian oinarrituz bi hasle-bikote diseinatu ziren delezioaren hasiera- (*STM2757* genea) eta amaiera-muturren arteko (*iroB-STM2773* genea, *iroC-STM2774*, edo *emrA-STM2814*) zatia anplifikatzeko. Hasleak diseinatzeko Primer3 programa erabili zen ([www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/](http://www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/)) eta sintesia egin zen Eurofins MWG Operon enpresan (Ebersberg, Alemania) eta Sigma-Aldrich enpresatan (St Louis, MO, AEB) (6-7 taulak).

**6. taula.** Anduien I. bilduman, 2. faseko flageloaren delezioaren PCR bidezko anplifikaziorako diseinatutako hasleak.

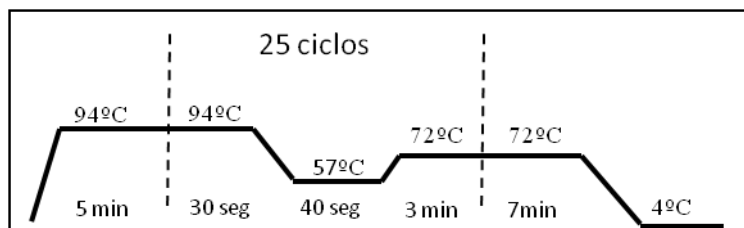
Genea	Haslea	Nukleotido sekuentzia (5'-3')	Tamaina (bp)	Erreferentzia
STM2758	4512F	CGCTGTGGTGTAGCTGTTTC	705	Álvarez <i>et al.</i> 2004
IS26	4512R	TCTGCCACTTCTTCACGTTG		
IS26	IS26-3F	TCGTAACAGCAAAGCTGCAT	900/1100	Laorden <i>et al.</i> 2010
<i>iroC</i>	2774-2R	TTTTACGTTCCCAACACACG		
IS26	DIS26Fcomp	TATTATGGTGATCCCCTGGG	230	Laorden <i>et al.</i> 2010
<i>iroC</i>	D57-2774R	TGAAGATCGCTGTTGGTACG		
IS26	IS26F-TD	CGCCTGGTAAGCAGAGTTTT	900	Laorden <i>et al.</i> 2010
STM2815	2815R	CACCCCGAAAGAGGTGATAA		

**7. taula.** Anduien I. bilduman, 2. faseko flageloaren delezioaren inguruko geneen presentzia/absentzia mapa PCR bidez egiteko diseinatutako hasleak.

	<b>STM geneak</b>	<b>Nukleotido sekuentzia (5'-3') Forward/Reverse</b>	<b>Lortutako tamaina (bp)</b>
	2775	GCA GCT TTT CAC CTC AGA GC / TCG GGG CAG TAG ACG TAA TC	740
	2776	TAT GGT CGC CAG TAC CAC AA / ATG ACG ACA GCC AGG AGT CT	680
	2777	GAG CGT TTG CTC AAA TAG CC / GGA AAG CAG CAA AGA AGG TG	610
	2780	TCT TCC AGA CAG GCG TTC TT/ GGG ATA CGT CGG AGA AAT GA	520
	2784	TGC TCA GGC GTG TAT TTC AG/ GTG CTG GTT GGC TGG TTA TT	600
<b><i>fljB</i> genearen inguruan kokatutako geneen presentzia/absentzia frogatzeko hasleak</b>	2788	ACG GTG TAC ATT GGC TGT GA GAA/ CAA CAT TCG ACC CGT TT	530
	2792	CAC GGC ATT ATG TTG ATT GC/ ACC GCA GGA GAG CAG AAT TA	470
	2799	TTA GGC GTA CGA CCT TGT CC / GCG AAT TCT CCA TTG ACG TT	300
	2807	TGA CAT CTC CTG CAATCT CG / CGGACC GAT ATC GTAAGC AT	750
	2814	TCA GAC TGA CGC CAACAA G/ GTT AGC GTC CAC CCA CAG AT	510
	2815	AAC TTC ACG ATT GGC TGC TT / GAG CAT GGT GTA GCG ACT CA	490
	2816	TCG ATC CAC TTC CCA TTC TC / ACC TTG ATGATG CCG TTT TC	435
	2817	TCC TGC ACT TTC AGC ACA TC / TGT TTG ATC TGC GTT TTT GC	246
2820	CGC ACA GTA GGA AGG TGT CA / TTT TGATGAACA GGC AAT GG	344	

PCR erreakzioak 25  $\mu$ l amaierako bolumenerako diseinatu ziren. Erreakzio bakoitzeko hurrengoak erabili ziren: irakin metodoaren bidez erauzitako 1  $\mu$ l DNA, 200  $\mu$ M dNTP, 1,50 mM MgCl<sub>2</sub>, hasleen 0,4  $\mu$ M eta unitate 1 Taq polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) erabili ziren.

Anplifikazio programa 9. irudian deskribatzen da.



**9. irudia.** 200-1.500 bp bitarteko zatien amplifikaziorako diseinatutako PCR programa.

PCR produktuak 1x TAE disoluzio indargetzailean (Tris-acetato-EDTA) prestatutako % 1eko agarosa-gelean detektatu ziren (Pronadisa) elektroforesia 50 minutuz 100V-tan egin eta gero. Ondoren etidio bromuroarekin gelak tindatu eta Chemi-Doc XRA-transiliminadorean aztertu ziren (UV-transilluminator, Bio-Rad). Pisu molekularren markatzailea Hyperladder IV izan zen (Bioline). PCR produktuak NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) kitaren bidez araztu ziren. Zatien sekuentziazioa Sistemas Genómicos S.A (Valencia, España) enpresan egin zen BigDye Terminator teknika jarraituz.

Kromatogramak Chromas programaren bidez aztertu ziren (ChromasPro 1.5). Lortutako sekuentzien konparaketa eta analisisa zenbait programa informatikoren bidez egin zen: Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), ADN/Protein alignment



(<http://insilico.ehu.es/align/>) eta ClustalW  
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) besteak beste.

#### **1.4. pU302 plasmidoaren presentziaren azterketa IS26 insertzio-sekuentziaren zundarekin**

##### 1.4.1 S1 nukleasaren bidezko digestioa

Barton *et al*, 1995an deskribatutako protokoloan oinarritzen da, non funtsean PFGE-n jarraitutako urratsak erabiltzen diren salbuespen batzuekin:

- Esekiduren absorbantzia espektrofotometroan 420 nm-tan neurtu eta dentsitate-zelularren doiketa 1-eko amaierako absorbantziara.
- DNAREN digestioa: Digeritu beharreko zatiaren tamaina handiagoa izan behar da, PFGEan mozten denaren bikoitza (3mm). Zatiak 37°C-tan 15 minutuz inkubatu dira termoblokean, 90 µl miliQ ur esterilarekin eta S1 nukleasarekiko espezifiko den 10 µl disoluzio indargetzailearekin (Takara, Japoni). Ondoren disoluzioa kentzen da eta gehitzen dira berriz 90 µl miliQ ur esteril, S1 nukleasarekiko espezifiko den 10 µl disoluzio indargetzaile eta 0,058 µl S1 nukleasarekin (7U/laginako). Termoblokean inkubatu zen 37°Ctan 45 minutuz.
- Zatiaren tamainaren kontrol moduan lambda fagoaren konkatemeroak erabiltzen dira. Horiek 50-1.000 kb bitarteko eremua betetzen dute (New England Biolabs, Hitchin, Erresuma Batua).

1.4.2. Lambda fagoaren konkatemeroen markatzea

- Fabrikatzailearen zehaztapenen arabera, lambda fagoaren konkatemeroen digestioa *PstI* entzimaren bidez (Roche) egin zen, jarraian biotinarekin markatzeko.
- Markatzea “DIG ADN labeling and Detection Kit”-ekin egin zen (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Amaierako sedimentua 50 µl-tan TE pH 8 disolbatu zen eta -20°C-tan gorde zen.

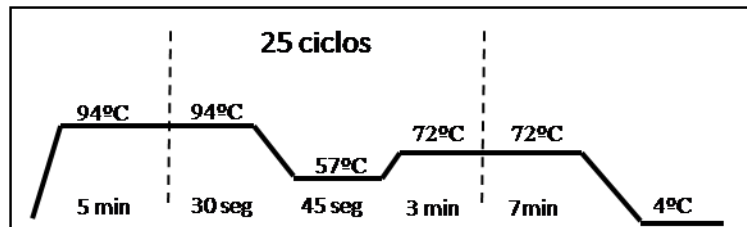
1.4.3. IS26 zundaren prestakuntza

- Erreferentzia andui bezala 4836/01 anduia erabili zen. Andui horrek 1. motako delezioa zuen (1.ΔFljB1) eta IS26 sekuentziaren amplifikazioarako erabilitako hasleak (IS26F: 5′- GCA AAT AGT CGG TGG TGA TAA AC-3′, IS26R1: 5′- GAG GCA GCC TTT TGT CTT ATT C-3′). Zatiaren markatzea amplifikazio prozesuan zehar dUTP-digoxigenina gehituz egin zen. Jarraian zerrendatzen dira erabilitako errektiboak eta neurriak (8. taula):

**8. taula.** IS26 zundaren prestakuntzan erabilitako errektiboak.

ERREAKTIBOAK	ZUNDA	KONTROL -
Ur destilatua	14 µl	18 µl
Digoxigenina (dUTP, Roche)	4 µl	- µl
Hasleak	2 µl	2 µl
DNA (4836/01, irakin)	5 µl	5 µl

- Erabilitako PCR programa:



**10. irudia.** IS26 zundaren prestakuntzan jarraitutako anplifikazio programa.

#### 1.4.4. Hibridazioa IS26 zundarekin

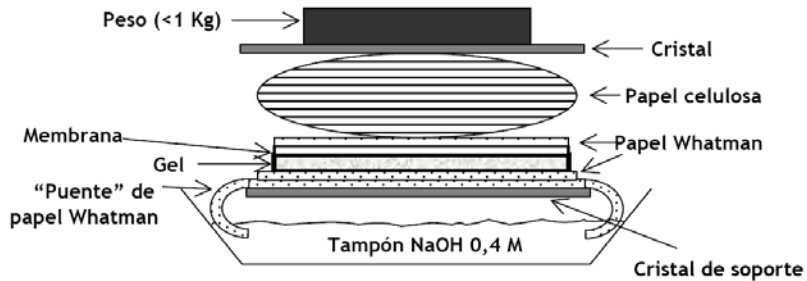
##### 1.4.4.1. PFGE-S1 gelaren tratamendua

- Depurinizazio prozesua: gela 10 minutuz barneratu (2 aldiz/5 min) 0,25 N HCl-n (125ml HCl 1 M, 500 ml H<sub>2</sub>O-Destilatua (UD) agitazio leunarekin).
- Desnaturalizazioa, 30 min (2 aldiz/15 min) 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH disoluzioarekin (150 ml NaCl 5 M, 50 ml NaOH 5 M, 500 ml arte UD).
- Neutralizazioa, 30 min 1,5 ml NaCl / 0,5 M TrisHCl / 0,001 M EDTA pH 7,2-ko disoluzioarekin (150 ml NaCl 5 M pH 7,2, 250 ml Tris HCl 1 M pH 7,2, 1 ml EDTA, 500 ml arte UD).

##### 1.4.4.2. Transferentzia mintzera

- Gelaren soberakinak mozten dira (goiko eta alboko parteak), eta neurri berdineko Nylon-eko (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Staffanstorp, Suedia) mintza mozten da.

- Ondoren, irudian azaltzen den transferentziarako muntaia prestatzen da:



- Muntaia 24 orduz mantentzen da DNAREN transferentzia geletik Nylon-eko mintzera baimentzeko. DNA kapilaritateagatik transferitzen da (SSC 10X disoluzio indargetzaileak eragindakoa) positiboki kargatutako Nylon-eko mintzara.

#### 1.4.4.3. DNAREN finkapena

- Transferentzia ondoren mintza agitazioarekin ikuzten da SSC 2x soluzioarekin agarosa soberakinak kentzeko. Ostean mintza iragazki-paperan lehortzen da eta plastikozko zorroan sartzen da DNA finkatzeko berogailuan 37°C-tan.
- DNA argi ultramorearekin finkatzen da 2 minutuz. Ondoren iragazki-paperean lehortzen uzten da 24 orduz.

#### 1.4.4.4. Aurrehibridazioa

- Mintza hibridazio tutuan sartzen da DNA daukan gainazala tutuaren barnealderantz begira egongo da eta mintza eta tutuaren paretaren arteko burbuilak kenduko dira.
- Aurrehibridazio-nahastea gehitzen da (SSCX 5x / % 0,1 N-lauril-sarcosina / % 0,02 SDS / % 1 blokeatzailea):
  - 8,75 ml SSC 20X
  - % 30, 116 µl N-lauril-sarcosina
  - % 10, 70 µl SDS
  - 0,35 g blokeatzailea (Roche)
  - 35 ml arte UD
- Tutua hibridazio labean sartu zen 68°C-tan 2 orduz.

#### 1.4.4.5. Hibridazioa

- Zunda irakiten da 10 minutuz eta azkar izotzan hozten da.
- 25 µl zunda gehitzen dira hibridazio nahasteko 5 ml-tara.
- Aurrehibridazio nahastea kentzen da eta zunda pipeta baten bidez gehitzen da.
- Gau osoan zehar inkubatzen da 68°C-tan.

#### 1.4.4.6. Errebelazioa

Bero gabeko eta errotazioa duen inkubazio-labean egiten da, ondoren zerrendatzen diren pausuak jarraituz:

- Mintza ikuzi 1. errebelatzeko disoluzioaren 50 ml-rekin (10 ml SSC 20x, 1 ml SDS 10 % , 100 ml arte UD), 5 min, 2 aldiz.
- Mintza ikuzi 2. errebelatzeko disoluzioaren 50 ml-rekin (0,5 ml SSC 20x, 1 ml SDS 10 % , 100 ml arte UD), 15 min, 2 aldiz.
- Mintzaren orekatzea egiten da, 1. disoluzio-indargetzailearekin 20 ml (10 ml Tris HCl 1 M pH 7,2, 3 ml NaCl 5 M pH 7,2, 87 ml UD), 1 min.
- Blokeo-soluzioarekin inkubatu 30 min (0,25 g blokeatzailea, 25 ml disoluzio indargetzaile 1)
- Inkubazioa 30 min anti-Dig 1-ekin (4 µl anti-Dig, Roche, 20 ml 1. disoluzio indargetzaile).
- Garbiketa urratsak 20 ml 1. disoluzio indargetzailearekin, 2 aldiz 15 min bakoitzean.
- Mintzaren orekatzea 3. disoluzio indargetzailearen 30 ml-rekin (5 ml Tris HCl 1 M pH 9,5, 1 ml NaCl 5 M, 2,5 ml Cl<sub>2</sub>Mg 1M, 50 ml arte UD), 2 min.
- Mintza errebelatu ilunpean eta agitaziorik gabe, mintzaren gainean errebelatzeko soluzioa banatu (90 µl NBT, 20 ml 3. disoluzio indargetzailean eta 70 µl BCIP, Roche). Erreakzioa gelditzeko TE pH 8 gehitu.

**2. Fagotipo ezberdineko *Salmonella enterica* subespecie *enterica* 4,[5],12:i- bariante monofasikoa. II. bilduma**

Hasieran *Salmonella enterica* subespecie *enterica* 4,[5],12:i- bariante monofasikoa bezala sailkatutako 13 isolatu aztertu ziren. Anduiek, 18, 104b, 193, 195, 138, 7, PNR eta NT fagotipoak zituzten eta ASuST erresistentzia profila zuten (9. taula). Behin 2. faseko flageloaren delezioaren muturrak zehaztuta eta sekuentziatuta, hasle espezifikokoak diseinatu ziren bildumaren isolatuen kopurua handitzeko. Bilduman 202 isolatu gehiago sartu ziren, hasierako isolatuen ezaugarri berdinak zituztenak. Kontrolerako anduiak aurreko bildumako andui monofasiko bat (4,5,12:i-) eta aurretik aipatutako LT2 anduia erabili ziren.

**9. taula.** II. bilduman hasiera batean karakterizatutako 13 isolatuak zehazten dira. Aztertutako antimikrobianoak 4. taulan zehaztutakoak dira.

Isolatuak	Urtea	Formula Antigenikoa	Fag	AMP	CHL	SUL	GEN	Cip	Kan	STR	Cef	Na	CTX	TET	SxT
1139	2008	4,5,12:i-	PNR	S	S	R	S	S	S	I	R	S	S	R	R
4521	2008	4,5,12:i-	PNR	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
4939	2008	4,12:i-	PNR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
4229	2008	4,12:i-	104b	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1536	2008	4,12:i-	193	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S	R	S
1566	2008	4,12:i-	NT	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
2054	2008	4,12:i-	195	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
4605	2008	4,12:i-	138	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
4257	2008	4,5,12:i-	104b	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
4672	2008	4,5,12:i-	193	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
4525	2008	4,5,12:i-	138	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
5036	2008	4,5,12:i-	7	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
4604	2008	4,5,12:i-	NT	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S

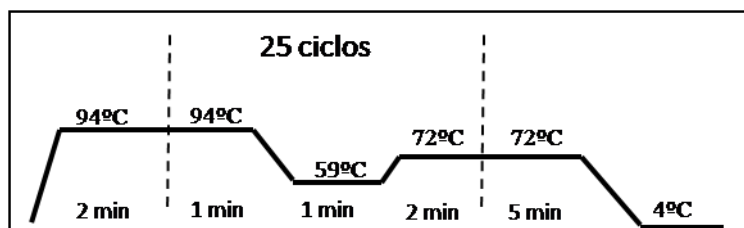
PFGE eta MLVA teknikak I. bilduman deskribatutako moduan egin ziren.

## 2.1. *fljB* genearen delezioaren ikerketa

### 2.1.1. Geneen kokapen-mapa

DNA erauzketa irakite metodoaren bidez eta 1.4.1 puntuan zehazten den moduan egin zen.

PCRak pure-Taq<sup>TM</sup> Ready-To-Go Beads (GE Healthcare AB) sistemaren bidez egin ziren STM2692-STM2775 geneen arteko 33 geneen presentzia edo absentzia frogatzeko eta ere berean isolatu bakoitzaren *fljB* genearen delezioaren hasiera eta amaiera muturrak zehazteko. Hasleak Primer3 programaren bidez diseinatu ziren eta Sigma-Aldrich enpresak prestatu zituen (10. taula). PCR erreakzioak 25 µl-ko amaierako bolumenean egin ziren, 5 µl DNA, 1µM hasle eta 18 µl miliQ ur esterila gehituz (Nuclease free Fermentas). Amplifikazio programa 11. irudian azaltzen da:



**11. irudia.** Geneen kokapen-mapa zehazteko PCR guztiak egin ziren irudiko programa berarekin.



PCR produktuak 1.3.2.atalean azaltzen den moduan eta tresnekin aztertuak izan ziren. Diseinatutako hasleen gaitasuna frogatzeko, LT2 anduiarekin lortutako produktuen purifikazioa eta sekuentziakzioa egin zen 1.3.2. atalean deskribatu den moduan.

**10. taula.** II. bildumako isolatuen ikerketarako espezifikoki diseinatutako hasleak.

STM geneak	Nukleotido sekuentzia (5'-3') Forward/Reverse	Anplikonaren tamaina (bp)
2692	TGATGGAGATAGTGCCGGTAGAC/ TCCCGTCGAATCCAGAATCAG	490
2693	AAACTCATGTGGCCTTGACC/ TGGTGGGATAACAGCAATGA	278
2695	GCTTAAATCCCGTCACCTTAC/ CCC GGCATAACCTCAAAGTG	220
2697	CACTTCACGGGCAATATCCT/ ACCCCG TTAATCCACTTC	596
2699/2700	GATTCGTGGGATCACAGTCA/ GTT CAACGACGGGAACAAC	664
<b><i>fljB</i> genearen inguruko geneen presentzia/absentzia frogatzeko hasleak</b>	2710	583
	2724	460
	2740	1078
	2742	699
	2744/2745	883
	2747	732
	2748/2749	633
	2753	724

STM geneak	Nukleotido sekuentzia (5'-3') Forward/Reverse	Anplikonaren tamaina (bp)	
2756	TCATGTTGGTTTCCTTGTGTGC/ GATGATTTATTCCCGCTCTGTCAG	402	
2757	ATAATGCTCTGCCCCCTCT/ CTGAAACCGCCGCTAAACTA	522	
2758	CTGAATGTTGTTCCCGACCT/ TGG CGACCAGCTTATCTTCT	411	
2759	GATCCGCTTAACCCACTCGTCC/ CCGCAGCAGGGGAATAAAG	730	
2760	TACTGGACCGGGTTC ATCAT/ CGCCTCTTTATGGCTCAGAC	450	
2761	TGTC AATCTAACCAAGGATGAATGTC/ TTTACCTCAGAATAACCTGTGTGCTC	450	
2763	CCAAAAAGCGAACTAAGGTGAGC/ ACGGACAGATGCATTGTTCAAGT	700	
2763/2764	ATGCCCTAAAAGATGCAACG/ ACCAGAGCTGGTCTGTCGAT	848	
2766	CTGGCAACGGAAACGGTGAG/ CAAGTTTGTGCTGTAAGGGATGC	471	
(Jarraipena) <i>fljB</i> genearen inguruko geneen presentzia/absentzia frogatzeko hasleak	2767	TCCGCAATTATCCTTTCGAC/ GAACCTGTTCTGCGTTGGTT	990
	2768/2769	GTCAGGAAGCCCTGAAACTG/ CTGAAATACACGGCACATGG	789
	<i>fljA</i>	CTCTTTATGATGCCCGTGAACC / TGATATCCCTGTTTCGATTGGTGAG	614
	<i>fljB</i>	CAGCTCTGGTTGTGCTTTGA/ GCCAACGACGGTGAAACTAT	834
	<i>hin</i>	CATGAACAGGAACAGATTAGTCGGC/ CAATCTTGTCACTGATACGGTCC	54/59
		GCTTACTAGTGCAAATTGTGACCG/ GCTAGTTGCTGCCGAGGATG	432
	<i>iroB</i> (2773)	GGA GAG CCG GTT ATC TCC AT/ CCG CTC TTA CCG GGA ATA AT	463
	<i>iroC</i> (2774)	CGG TAT GCG GGT AGT TCA GT/ GGT CAG CGA GGT CAT TAA GC	956

### 2.1.2. Polimerasaren kate-erreakzioa tamaina handiko zatiak lortzeko (Long-PCR)

DNA genomikoaren erauzketa Qiagen DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Alemania) bidez egin zen. Ondoren, lortutako DNA laginak Nanodrop 1000 espektrofotometroan kuantifikatu ziren (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, AEB).

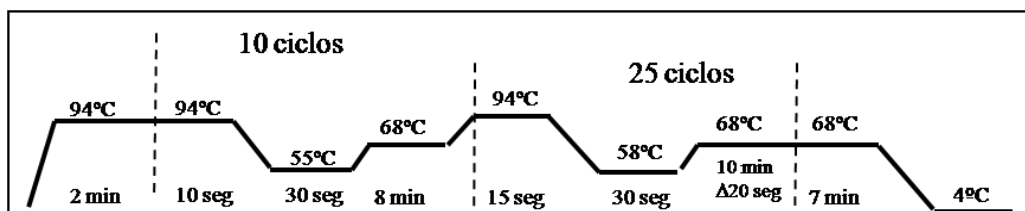
PCR teknika hau (*Long-PCR*) Expand Long Template PCR System kit-arekin egin zen (Roche). Erreakzio bolumena 50 µl-tako izan zen, 5 µl disoluzio indargetzailerekin, 2,5 µl dNTP bakoitzetik (Roche), 2 µl hasle bakoitzetik, 0,75 µl *Taq* eta *Tgo* entzimen nahastearekin eta 300ng/µl DNA-rekin, 50 µl arte UD-kin osatuz (Fermentas).

PCR guztietan programa eta erreaktibo berdinak erabili ziren. Bakarrik, hasleak aldatu ziren PCR batetik bestera. Hasleak espezifikoki diseinatuak izan ziren delezio mota bakoitzarekiko, Primer 3 programarekin eta Sigma enpresan prestatuak (11. taula).

#### 11. taula. Delezio mota bakoitzarentzako diseinatutako hasleak.

	Delezio mota	Zentzu	Nukleotido sekuentzia (5'-3')	Itu-genea	Anplikonaren tamaina (bp)
<i>Long-PCR</i> haslea	$\Delta fljAB1$	Forward	GACGATCGTCTGCTGATTGAAAC	STM2692	8700
	$\Delta fljAB3$	Forward	GATCCGCTTAACCCACTCGTCC	STM2759	1600 or 3300
	$\Delta fljAB4$	Forward	TCCGCAATTATCCTTTCGAC	STM2767	1900
	$\Delta fljAB5$	Forward	TACTGGACCGGTTTCATCAT	STM2760	8400
	Guztiak	Reverse	CAGGATTGGGGAACTGGATTTCGCATACC	<i>iroB</i>	-

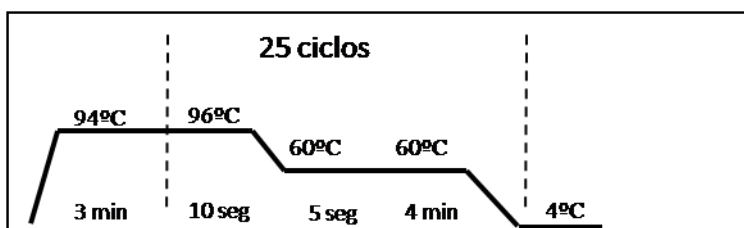
Anplifikazio programa 12. irudian azaltzen da.:



**12. irudia.** Fabrikatzaileak 12 Kb baino handiagoko zatien lorpenerako zehazten diren urratsen arabera diseinatutako PCR programa (Roche).

PCR produktuen azterketa 1.3.2. puntuan azaltzen den moduan egin zen, salbuespen batekin: agarosa kontzentrazioa % 0,8koa izan zen. PCR produktuen purifikazioa GeneJet purification Kit bidez egin zen (Fermentas). Purifikatutako zatien sekuentziario-PCRa amaierako 10 µl-ko bolumenean egin zen hurrengo osagaiekin: 5 µl UD, 2 µl Big Dye v 3.1, 1 µl hasle eta 2 µl PCR produktua.

Sekuentziario-PCR-aren programa 13. irudian azaltzen da.



**13. irudia.** Sekuentziario programa.

Sekuentziario produktuen kapilaritatezko elektroforesia CNM-ko sekuentziario-zerbitzuan egin zen.

Kromatogramak DNASTar Lasergene vs. 7.0 programarekin aztertu ziren (Madison, Wisconsin, AEB). Sekuentzien konparaketa eta azterketa BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) eta ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) programen bidez egin zen.

### 2.1.3. Kateatutako sekuentziazio teknika (*Walking-primer*)

*Long-PCR*-ren bidez lortutako tamaina handiko produktuen sekuentziazioan hasleetatik hurbil zeuden sekuentizak soilik lortu ziren. Tamaina handiko PCR produktuak izanda (2.000-9.000 pb), kateatutako sekuentziazioa egin zen produktu osoaren nukleotido sekuentzia lortzeko.

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) programaren bidez sekuentziazio zatiaren hasiera aztertu ondoren, sekuentziazioarekin aurrera jarraitzeko, hasle berriak diseinatzen ziren. Horrela zenbait sekuentziazio-PCR egin ziren fragmentu osoaren sekuentzia lortu arte (12. taula).

**12. taula.** Delezio mota bakoitzean lortutako zatiaren sekuentziaziorako diseinatutako hasleak.

	<b>Delezio mota</b>	<b>Nukleotido sekuentzia (5'-3')</b>	<b>Itu-genea</b>
<b>Sekuentziazio hasleak</b>		Forward-GACGATCGTCTGCTGATTGAAAC	STM2692
		Forward-GGCATCCCCAAGTAACACAC	insertzioan
		Forward-GAAATATCCAGCGCTTCGGTAG	insertzioan
		Forward-TGCTAAAGCGCGAGAACAAAG	insertzioan
		Forward-CCGAAAGAACATTAGCAACCCG	insertzioan
		Forward-TTGAAAATGTGAATGGCGACG	insertzioan
		Forward-AGCATAGATGGGTATACCTGGGC	insertzioan
		Forward-GCTCCTGGATGGTGGGATAAAG	insertzioan
		Forward-CGAAGTACAGCGTCCCCTTTC	insertzioan
		Forward-CGCTATCATCGAAAAGGTTG	insertzioan
	2.Δ <i>flj</i> AB1	Forward-GCCTGGCTTGCCTTGGGAG	insertzioan
		Forward-ATCGAGCACAGGAAAGGAGG	insertzioan
		Forward-GATACATCTTCTGATACGGAACGG	insertzioan
		Forward-TGTTATCGTAGTCCGGGTCATCAG	insertzioan
		Forward-ACCATTCTGTTTAAGCCCTGTATC	insertzioan
		Forward-ACAGTGTATATGTCTGACCGTTTCG	insertzioan
		Forward-GGCATCCCCAAGTAACACAC	insertzioan
		Reverse-GCCACACGATTTATTGGTTCTTG	<i>hin-iroB</i> zonalde intergenikoa
		Reverse-CGTCACCGTTCGAATGTTGC	<i>hin-iroB</i> zonalde intergenikoa
	2.Δ <i>flj</i> AB3-A	Forward-AGCGTAGTCCTGGAGCAGAGC	STM2759
	Reverse-TTGAGGTGATGCGTGCACTA	IS26	
2.Δ <i>flj</i> AB3-B	Reverse-TCTGCCACTTCTTCACGTTG	IS26	
2.Δ <i>flj</i> AB4	Forward-GGGTTGAGAAGCGGTGTAAG	IS1	
	Forward-CGCCTGGTAAGCAGAGTTTT	IS26	
	Reverse-AGACAAAAGGCTGCCTCATC	IS26	

	Delezio mota	Nukleotido sekuentzia (5'-3')	Itu-genea
		Forward-GTTTCCATTTACCCGCACTT	STM2761
		Forward-CTGCGTATATCGCTTGCTGA	IS1
		Reverse-ACGAACAGTGGGGATACGTC	IS1
		Forward-GCGGCTTTTTATTGAGCTTG	<i>tetA</i>
		Forward-TGCGTCTCAACCCCTACTTC	<i>tetA</i>
Sekuentziazio hasleak	2.Δ <i>fljAB5</i>	Forward-TGCCCTTTAGAAGGGGAAAG	<i>terR</i>
		Forward-CAAACCTTGCCCTAACCAA	<i>jemC</i>
		Forward-CGCCCAGAAGCTAGGTGTAG	<i>jemB</i>
		Forward-CGACCATAGGAACGACAAGG	<i>jemA</i>
		Forward-AGGGGATCTCTCAGTGCTCA	IS10
		Forward-TCGTAACAGCAAAGCTGCAT	IS263
		Reverse-ACCTTTGATGGTGGCGTAAG	IS4

#### 2.1.4. Genoma osoaren sekuentziazioa (NGS)

2.Δ*fljAB2* mota zuten 3 isolatuetan genoma osoaren sekuentziazioa egin zen (NGS, *Next Generation Sequencing*). Laginen sekuentziaziorako DNAREN erazketa TSBn hazitako zeluletatik abiatuta egin zen DNeasy Blood and Tissue kit-a erabiliz (Qiagen). DNA erazketa ND-1000 Spectrophotometer espektrofotometroaren bidez kuantifikatu ziren (Nanodrop, Delaware, AEB). Sekuentziazioa aScidea Computational Biology Solutions, S.L. (Barcelona, España) enpresan egin zen. Sekuentziazioa Illumina MiSeq sekuentziadorean egin zen. Horretarako DNAREN fragmentazioa egin zen 500 bp-ko fragmentuak lortuz eta fragmentu bakoitzaren muturren sekuentziazioa egin zen (*pair-end*), 251 bp luzera arteko sekuentziak lortuz.

### 3. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* 4,5,12:b:- bariante monofasikoa. III. bilduma

*Salmonella enterica* subespecie *enterica* 4,5,12:b:- bezala izendatutako 39 isolatu aztertu ziren (13. taula). PCR kontrol moduan I. eta II. bildumetan aipatutako LT2 anduia erabili zen.

PFGEaren bidezko karakterizazioa 1.1. atalean azaldutako moduan egin zen.

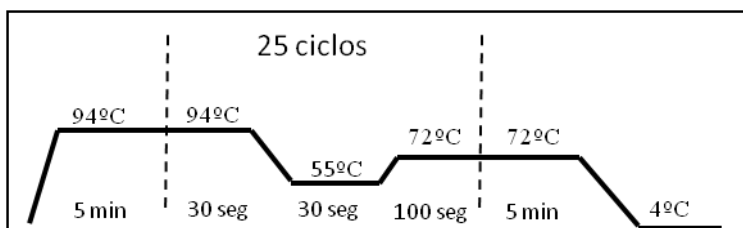
**13. taula.** III. bilduma. Laugarren taulan zehaztutako antimikrobianoak erabili ziren baina isolatu guztiak sentikorrek zirenez ez dira datuak taula agertzen.

Isolatuak	Urtea	Formula antigenikoa	Isolatuak	Urtea	Formula antigenikoa
96	2006	4,5,12:b:-	4128	2008	4,5,12:b:-
994	2006	4,5,12:b:-	4281	2008	4,5,12:b:-
1457	2006	4,5,12:b:-	4370	2008	4,5,12:b:-
1834	2006	4,5,12:b:-	5736	2008	4,5,12:b:-
913	2006	4,5,12:b:-	466	2009	4,5,12:b:-
6529	2006	4,5,12:b:-	485	2009	4,5,12:b:-
6538	2006	4,5,12:b:-	1111	2009	4,5,12:b:-
6539	2006	4,5,12:b:-	2671	2009	4,5,12:b:-
6576	2006	4,5,12:b:-	3095	2009	4,5,12:b:-
7641	2006	4,5,12:b:-	4486	2009	4,5,12:b:-
505	2007	4,5,12:b:-	4917	2009	4,5,12:b:-
510	2007	4,5,12:b:-	5282	2009	4,5,12:b:-
516	2007	4,5,12:b:-	5394	2009	4,5,12:b:-
519	2007	4,5,12:b:-	5446	2009	4,5,12:b:-
528	2007	4,5,12:b:-	5463	2009	4,5,12:b:-
4591	2007	4,5,12:b:-	918	2010	4,5,12:b:-
4761	2007	4,5,12:b:-	1210	2010	4,5,12:b:-
15	2008	4,5,12:b:-	2957	2010	4,5,12:b:-
40	2008	4,5,12:b:-	3364	2010	4,5,12:b:-
2185	2008	4,5,12:b:-			



### 3.1. Subespeziea determinatzeko PCRa

Bilduma honen formula antigenikoa 4,5,12:b:- zela kontuan izanik, bariante monofasiko hau *Salmonella enterica*-ren zein subespezieri dagokion jakiteko PCR bat egin zen III. bildumako isolatu guztiakin DreamTaq™ Green PCR Master Mix sistemaren bidez (Fermentas) eta 2.1.1. atalean azaltzen den moduan. PCR erreakzioak 25 µl-tako amaierako bolumenean egin ziren: 5 µl DNA irakitura, 1 µl (1µM) hasle bakoitzetik, 6 µl miliQ ur esterila (Fermentas) eta 12 µl DreamTaq™ (Fermentas). Hasleak (*phoP*) LNRS-k eskainitakoak izan ziren. Anplifikazio programa 14. irudian azaltzen da.



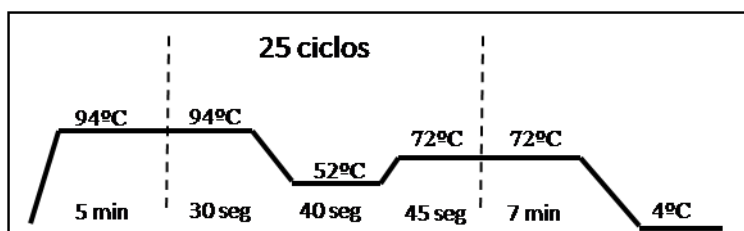
**14. irudia.** LNRSan erabiltzen den PCR programa *phoP* genearen anplifikaziorako.

PCR produktuen azterketa 1.3.2. atalean deskribatutako moduan eta tresnekin egin zen.

Produktuen purifikazioa GeneJet purification Kit-arekin egin zen (Fermentas). Purifikatutako produktuen sekuentziazio-PCRa 1.4.2 atalean azaldu den moduan egin zen. Kromatogramak DNASTAR (Lasergene) programaren bidez aztertu ziren. Analisia eta lortutako sekuentzien konparaketa McQuiston *et al.* plazaratutako lanean egindako gomendioen arabera egin zen (92).

### 3.2. Java barietatearen determinaziorako PCR espezifikoa

Aurreko atalean deskribatutako DremTaq™ sistemaren bidez egin zen PCR bat III. bildumako isolatuak *Salmonella* Paratyphi B-ren Java biotipoaren bariante monofasiko baten isolatuak ziren edo ez frogatzeko. Hasleak LNRS-k eskainitakoak izan ziren, baita kontrol moduan erabilitako 2 anduiak ere (positibo eta negatibo moduan erabilitakoak). Anplifikazio programa 15. irudian azaltzen da.



**15. irudia.** LNRSan Java barietatearen azterketarako erabili zen PCR programa.

### 3.3. *fljB* genearen delezioaren ikerketa

#### 3.3.1. *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* eta *iroC* geneen detekziorako PCRak

Bost PCR egin ziren *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* eta *iroC* geneen presentzia edo galera frogatzeko (10.taula). Erabilitako hasleak II. bildumako geneen kokapen-mapan diseinatuak izan ziren (2.1.1. atala), beraz PCR prozedura eta datuak aztertzeko pausu berdinak jarraitu ziren.

#### 3.3.2. Geneen kokapen-mapa

PFGEan lortutako patroien arabera bariante monofasiko horrek *Salmonella* Paratyphi B serotipokoa izan litekeelaren hipotesia planteatu genuen. Horregatik hipotesi horren frogapenerako zenbait teknika erabili ziren.

NCBI datubasean eskura dagoen *Salmonella* Paratyphi B-ren genoma bakarra *Salmonella* Paratyphi B dT(-) biotipoarena zen. Genoma hau gida bezala erabiliz, 4 hasle-bikote diseinatu ziren *fljB*-tik hurbil dauden geneak detektatzeko (14.taula). Hasle bikote horiekin 4 PCR egin ziren III. bildumako 3 isolatuetan eta kontrol positibo moduan erabilitako 2 anduietan (LNRS-ko *Salmonella* Paratyphi B dT(+)) biotipokoak). PCRak pure-Taq<sup>TM</sup> Ready-To-Go Beads sistema erabiliz egin ziren (2.1.1. atalean deskribatu da).

**14. taula.** III. bildumako isolatuen karakterizazioarako diseinatutako hasleak.

Helburua	Genea	Haslea	Nukleotido sekuentzia (5'-3')	Tamaina (bp)
<i>fljB</i> -rekiko	SPAB3434	3434F	GGAACAGATTGCCCCGAAG	360
		3434R	TGGCTGGCAACCCCTTACC	
hurbil dauden geneen presentzia	SPAB3435	3435R	CGGTCCGGGTAGGTTATGTTG	501
		3436F	AAACTTCTTTCCATGCTTCAACC	
/absentzia	SPAB3436	3436R	GAGGATGGCAGATATGAAATGACG	241
		3437R	TTGATACATGATGAACAGTCCGTG	
Alderantzizko PCR	<i>iroB</i>	iroBi	AGCAGCATGATCAATACCTTCTCG	-
		iroBf	GGCCATTAACACGAAACGCTTG	-
		iroBR	CAGGATTGGGGAAGTGGATTTCGCATACC	-
		SPBiroCF		

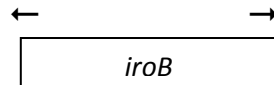
Atal honetan lortutako emaitza negatiboak zirela eta, hipotesi honen frogapena beste teknika molekularren bidez ebatzea erabaki zen, jarraian deskribatuko direnak.

### 3.3.3. Alderantzizko PCRa eta sekuentziazioa

Teknika hau erabiltzen da ezaguna den zati baten alboko zonaldearen sekuentzia lortu nahi denean eta genoma horretan sekuentzia ezagun bakarra dagoenean eta ezinezkoa denean PCR arruntaren bidezko amplifikazioa eta sekuentziazioa egitea. Prozeduraren pausuak hurrengoak dira:

- Sekuentziazioa hasteko *iroB* genea aukeratu zen, bere presentzia ezagutzen genuelako eta aurreko ikerketetatik ezagutzen genuelako *iroB* eta *fljB* geneen arteko gertutasuna.

- Hasleen diseinua aukeratutako genearen muturretan egin behar da, baina amplifikazioa genearen kanpoalderantz gerta dadin diseinatu behar dira hasleak (iroBi; 5'-AGCAGCATGATCAATACCTTCCTCG-3', iroBf; 5'-GGCCATTAACACGAAACGCT TG-3').



- DNAREN ERAUZKETA. Honetarako ADN mini kit (Qiagen) erabili zen. Erauzitako DNAREN kuantifikazioa ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop, Delaware, USA) espektrofotometroaren bidez egin zen. Gomendagarria da 30 ng/μl eta 60 ng/μl arteko DNA kontzentrazioa izatea teknika egin ahal izateko.
- DNA genomikoaren digestioa mozte-puntu gutxi dituen errestrikzio-entzimekin: *PstI* (Fermentas) entzima aukeratu zen ez zuelako mozte-punturik guk aukeratutako genean (*iroB*) eta 600 eta 900 zati bitartean sortarazten zituelako. Fabrikatzailearen urratsak jarraituz, PCRaren amaierako bolumena 50 μl-koa izan zen: 10 μl DNA, 2,5 μl *PstI* (15 U/μl), 5 μl *PstI*-en disoluzio indargetzaile eta 32,5 μl UD (Fermentas). Nahastea termoblokean inkubatu zen 37°C-tan 4 orduz.
- Entzimaren inaktibazioa egin zen 65°C-tan eta 20 minutuz.
- DNAREN digestioa konprobatzeko % 0,8 agarosa gelean egin zen TAE 1x-ekin, 90V-tan 50 minutuz. Gela ikusteko etidio bromuroarekin tindatu zen eta Gel Doc XRS -ean aztertu zen (Bio-Rad).

- Digeritutako DNAREN prezipitazioa, kloroformo: alkohol isoamiliko 24:1 soluzioarekin egin zen, 1:1 proportzioan. Ondoren zentrifugatu zen 5 minutuz 13.000 rpm-tan. Soluzioaren goiko fase akuosoa beste eppendorf garbira transferitu zen eta 1:1-eko proportzioan nahastu zen alkohol isoamiliko: fenol: kloroformoarekin (AppliChem, Gatersleben, Saxony-Anhalt, Alemania). Berriz zentrifugatu zen 5 minutuz 13.000 rpm-tan. Goiko fase akuosoa transferitu zen beste eppendorf garbi batera eta 1:0,6 proportzioan nahastu zen isopropanolarekin (-20°C). Nahastea zentrifugatu zen 10 minutuz 13.000 rpm-tan. Gainjalkina kendu eta sedimentuaren ikuzketa egin zen 100 µl etanol absolutuarekin (-20°C), horretarako zentrifugazio bat egin zen 5 minutukoa 13.000 rpm-tan. Ondoren etanol guztia kendu zen, eta sedimentua 37°C-tan lehortu zen termoblokean. Behin etanol soberakin guztiak kenduta, sedimentua 20 µl TE pH 8 disoluzio-indargetzailean bersuspenditu zen.
- Ligazioa, T4 DNA ligasaren bidez (Roche) egin zen. Amaierako 30 µl bolumenean prestatu zen hurrengo nahasketa: 18 µl UD (Fermentas), 3 µl T4-ren disoluzio indargetzaile, 2 µl T4 DNA ligasa (5u) eta 7 µl aurreko prezipitazioko DNA. Gau osoan mantendu zen 14°C-tan.
- Prezipitazioa: 7. urratsean (DNA prezipitazioa) deskribatu den moduan egin zen, baina amaieran sedimentuaren bersuspenditzea 15 µl TE pH 8 disoluzio-indargetzailean egin zen.
- *Long PCR*. 2.1.2 ataleko Expand Long Template PCR System kit erabili zen. Kasu honetan erabilitako hasleak iroBi eta iroBf izan ziren, amaierako 50 µl-tako bolumenean: 20,25 µl UD (Fermentas), 5 µl 3.

disoluzio indargetzaile, 2,5  $\mu$ l dNTP bakoitzetik, 2  $\mu$ l (1 $\mu$ M) hasle bakoitzetik, 0,75  $\mu$ l Taq eta Tgo entzimen mix-a eta aurreko pausuko 10  $\mu$ l DNA. Jarraitutako amplifikazio metodoa 2.1.2 atalean deskribatutakoa izan zen. PCR produktuak % 0,8ko agarosa-geleko elektroforesian aztertu ziren (TAE 1x, 70 minutuz 90Vtan). Ondoren gelaren tindaketa etidio bromuroarekin egin zen eta banden azterketa Gel-Doc XRA sistemarekin egin zen (Bio-Rad). Pisu molekularren markatzaile moduan erabili ziren X Markatzailea (Roche) eta GeneRuler DNA 100bp Plus (Thermo Fisher Scientific). PCR produktuak GeneJet purification Kit-ren bidez purifikatu ziren (Fermentas).

- Anplifikatutako produktuen klonazioa egin zen *E. coli* anduietan produktuaren sekuentziaziorako zatien kopiak soberan izateko. Transformazioa egin zen Clonning TOPO kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, AEB) erabiliz. Ondoren, hiru ereintza egin ziren Luria-Bertani-agar (LB) hazkuntza-medioaren bolumen ezberdineko (50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l eta 200  $\mu$ l) plaketan eta 10  $\mu$ l anpizilinarekin (100 ng/  $\mu$ l) (Sigma). Plakak inkubatu ziren 37°C-tan 24 orduz. Produktuak bektorean txertatu ziren frogatzeko eta *E. coli* zelula kompetenteetan transformazioa eman zela baieztatzeko, plasmidoen erauzketa egin zen QIAprep Spin Miniprep Kit-ren bidez (protocolo Plasmid ADN purification, Qiagen). Jarraian PCR bidez *iroB* genearen amplifikazioa egin zen pure-Taq<sup>TM</sup> Ready-To-Go Beads (GE Healthcare AB) sistema erabiliz eta 2.1.1. ataleko amplifikazio programa jarraituz. PCR produktuen azterketa 1.4.2. atalean deskribatu den moduan egin zen.

- Sekuentziazioa: 2.1.2. atalean deskribatutako metodoa erabili zen.
- Kateatutako sekuentziazioa (*walking-primer*): 2.1.3 atalean deskribatutako metodoa erabili zen eta 14. taulan zehaztutako hasleak erabili ziren.

### 3.4. PCR eta sekuentziazioa

Alderantzizko PCRan lortutako datuetan oinarrituz, STM2744-STM2773 (*iroB*) geneen arteko zatia anplifikatu zen. Gene horiek *Salmonella* Typhimurium-ean eta *S. Paratyphi B* dT(+)-an deskribatzen dira (hasleak 10. taulan zehazten dira). PCRa egin zen III. bilduma osatzen duten 39 isolatuekin eta CNM-ko *Salmonella* Paratyphi B dT(+) Java barietatea bezala tipifikatutako 6 anduiekin ere (azken horiek kontrol negatibo moduan erabiliak izan ziren), 3.1. atalean deskribatzen den moduan. PCR-en eta hasleen eraginkortasuna frogatzeko 39 isolatuetatik 3ren produktuak sekuentziatu ziren.

Azkenik, aipatutako Java barietateko 6 anduiekin beste PCR bat egin zen *fljB-iroB* geneen arteko zatia anplifikatzeko. Horren helburua, bi gene horiek Espainiako Java biotipoko *Salmonella* Paratyphi B isolatuen genoman duten gertutasuna determinatzea zen. Anplifikazioa egiteko, Fermentas-eko DreamTaq™ sistema erabili zen eta 2.1.1 ataleko anplifikazio programa eta 1.3.2. atalean azaltzen den sekuentziazioa erabili ziren.





PFGE analisia 1.2. atalean deskribatutako metodologia jarraituz egin zen. 1. saiakuntzan isolatu horiek autodigestio-prozesua jasaten zutela ikusi ondoren, PFGEren prozeduratan tioureako soluzioa erabili zen. Horretarako, elektroforesiaren disoluzio-indargetzailean 782 µl tiourea (10 mg/ml, Sigma) gehitu ziren gertakizun hau ekiditeko.

Bost PCR egin ziren *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* eta *iroC* geneen presentzia edo absentzia aztertzeko, 3.3.1 atalean deskribatzen den moduan.

#### **4.1. *fljB* genearen delezioaren ikerketa**

##### **4.1.1. Geneen kokapen-mapa**

*Salmonella* Schwanzengrund-en deskribatutako 9 generen presentzia edo galera aztertzeko DreamTaq™ sistemaren bidezko PCRak egin ziren 3.1. atalean azaldu den moduan. Geneak SesA2901-SesA2914 bitartekoak dira eta hauek aztertu ziren 2. faseko flageloaren delezioaren hasiera eta amaiera puntuak zehazteko. Hasleak Primer3 programarekin diseinatu ziren eta Sigma enpresan sintetizatu ziren (16. taula).

Anplifikazio programa 2.1.1. atalean deskribatutakoa izan zen eta produktuak ikusteko eta aztertzeko 1.3.2. atalean azaldu den prozedura jarraitu zen.

#### 4.1.2. Alderantzizko PCRa eta sekuentziazioa

Prozedurak, 3.2.3. atalean jarraitutako berdinak erabili ziren. Hasleak atal berdinean aukeratutako iroBi eta iroBf izan ziren (14. taula).

#### 4.1.3. Long-PCR eta sekuentziazioa

Aurreko ataletan lortutako emaitzetan oinarrituz, 19 isolatuetatik 3 aukeratu ziren *Long-PCR* egiteko SesA\_2902 (S2902F) eta SesA\_2915 (iroBR) geneen artean. Sekuentziaziorako, alderantzizko PCRan diseinatutako hasleak erabili ziren (16. taula). Baita kateatutako sekuentziazio-prozedura berdina egin zen, kit berdina erabiliz, anplifikazio eta sekuentziazio programa berdinak erabiliz (2.1.3. eta 2.1.2. ataletan deskribatutakoak).

16. taula. IV. bildumako isolatuen karakterizaziorako diseinatutako hasleak.

Helburua	Genea	Haslea	Nukleotido sekuentzia (5'-3')	Tamaina (bp)
	SesA_2902	S2902F	TAACCTTTTCCTGCCACCAG	352
		S2902R	AAGGGCAATGACTTTTACCG	
	SesA_2903	S2903F	TTACATTCACGCCTGATCATT	698
	SesA_2904	S2904R	AGGGTTACGGGCTTTCTGTT	490
		S2904F	TCGTGACGACTTCTCACTGG	
<i>fljB</i> -rekiko hurbil dauden geneen presentzia/ absentzia	SesA_2905	S2905F	AGCGAAAAGAAAGCAAACG	224
		S2905R	CTGTACGCGCAATTGTGTTC	
	SesA_2906	S2906F	CGGACTTCTTCCAGCATTTC	363
	SesA_2907	S2907R	GGCCTGGATTTATCGTCTGA	
	SesA_2908	S2908F	GCTGACGAACGACAGATTCA	271
		S2908R	GATAACTACCGGGCACTGGA	
	SesA_2910	S2910F	ACCCATCGTTGGACTTGTCT	328
		S2910R	TTCAGAGCCTATTGGGATGC	
	SesA_2914	S2914F	GAATCCAGTCCCCAATCCT	110
		S2914R	AAATCGGGAAAAGAGGAGAGC	
Alderantzizko PCRa	<i>iroB</i>	iroBi	AGCAGCATGATCAATACCTTCCTCG	-
		iroBf	GGCCATTAACACGAAACGCTTG	-
		iroBR	CAGGATTGGGGAAGTGGATTTCGCATACC	-
	EAE_1190	ENTF	TCCTAATTGCGAATGCTGTG	-
	IS30	EntfWP2	CTCAGAAGCGGAAGAGCAGT	-

***EMAITZAK***

---



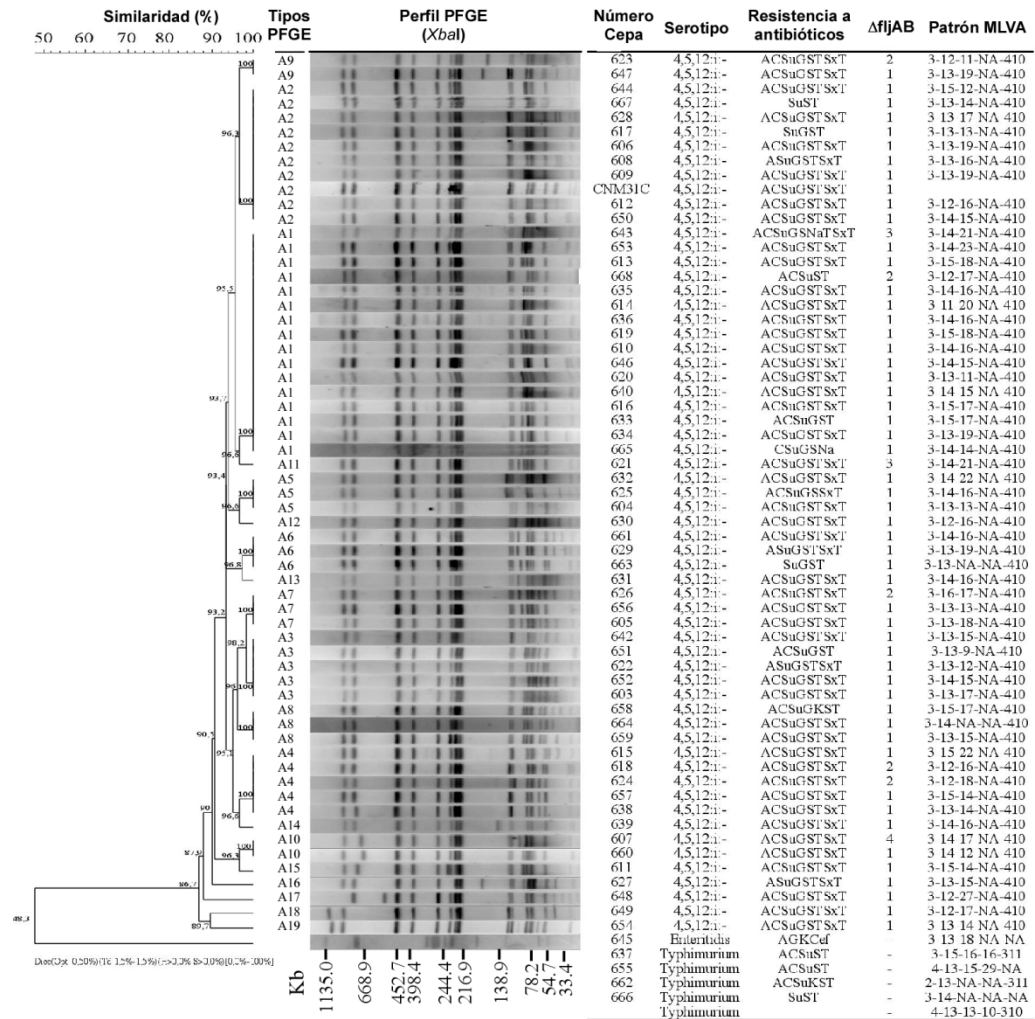
## **1. *Salmonella enterica* subesp. *enterica* 4,5,12:i:- bariante monofasikoa U302 fagotipoa. I. bilduma**

### **1.1. Elektroforesia eremu pulsatuko gelean (PFGE)**

PFGEan lortutako emaitzak 60 banda-patroi oso antzekoak erakutsi zituzten. Patroien artean ez zeuden 4 banda baino gehiagoko aldaerarik. Beraz isolatu monofasiko guztiak A profilaren barruan sailkatu ziren. Profil horretan 19 azpimota bereiztu ziren (A1-A19) (16. irudia). Profil ezberdinak 12-15 banda zituzten, kontuan izanda profil batzuk banda kopuru berdina zutela baina pisu molekular ezberdinekoak zirela. Lortutako 19 azpimotekin 0,89 balioko Simpson-en dibertsitate indizea kalkulatu zen (SID). Ezberdintasun nabariak gelaren azpiko partean eman ziren, 190 kb-ko pisu molekularra baino txikiagoko banden artean (16. irudia). Profilen arteko antzekotasunen irudikapenerako parekotasun-dendograma bat eraiki zen Dice indizearen eta UPGMAren bidezko taldekatzearen arabera (16. irudia).

### **1.2. Errepikapen kopuru aldakorreko tandem-en multilocus analisisia (MLVA).**

MLVAren bidez lortutako profilak hurrengo eran sailkatu ziren amplifikatutako zatiak: STTR9 - STTR5 - STTR6 - STTR10pl - STTR3. PCR anitzetan, ez zen STTR10pl haslearekin amplifikaziorik lortu isolatu monofasikoetan, baina kontrol moduan erabilitako beste serotipoetako anduietan bai, beraz isolatu monofasikoei NA aleloa erantsi zitzaien (*no amplification*) (16. irudia).



16. **irudia.** PFGEren bidez lortutako taldekatzea. Isolatu bakoitzean isolaketa data, jatorria, formula antigenikoa, fagotipoa erresistentzia profila, delezio mota eta MLVaren bidez lortutako emaitzak zehazten dira (Laorden *et al*, 2010).

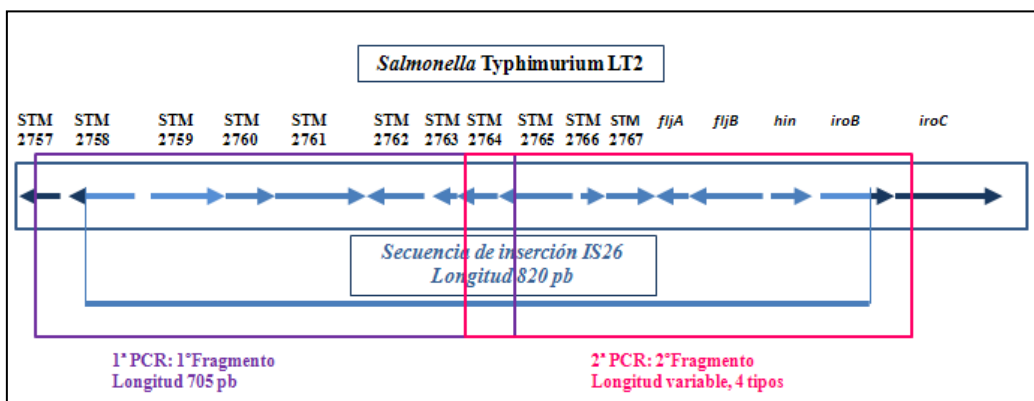


Kontrol moduan erabilitako 2 *Salmonella* Typhimurium anduietan 180 bp-ko zatia lortu zen STTR9 haslearekin eta LT2 anduietan 162 bp-koa. I bilduma osatzen zuten 60 isolatuetan zatia 171 bp-koa izan zen. Larsson *et al.*, 2009an, proposatutako izendapenaren arabera 4, 2 eta 3 alelo zenbakiak esleitu zitzairen hurrenez hurren (16. irudia, 3. taula). STTR5 eta STTR6 hasleekin tamaina ezberdineko zatiak lortu ziren isolatu guztien artean. Isolatu guztietan amplifikazioa eman zen STTR5 haslerekin, 241-271 bp arteko zatiak lortu ziren eta, 10 eta 15 aleloen arteko zenbakia erantzi zitzairen (16. irudia). STTR6 haslearekin amplifikazio portzentaia % 93koa izan zen eta 12 zati mota lortu ziren, tamainak 330 bp-tik 396 bp-ra aldatuz (16. irudia), ondorioz 11 eta 22 alelo bitartean izendatu genituen. STTR3 hasleak % 21eko amplifikazio portzentaia izan zuen isolatu monofasikoetan. Aldiz ikerketa-lanean erabilitako *Salmonella* ez-monofasiko guztietan 484 bp-ko zatia lortu zen. Honengatik guztiatik, PCR bakuna egin zen STTR3 markatze gabeko haslearekin. Orduan, % 100 amplifikazioa lortu zen. Zati horien sekuentziazioak erakutsi zuen errepikapen kopuru berdina (4 errepikapen 1. VNTRan eta 10 errepikapen 2. VNTRan) isolatu monofasiko guztietan. Beraz, guztiei STTR3 haslearekiko alelo zenbaki berdina jarri zitzairen, 410 aleloa (16. irudia).

Laburbilduz, 32 profil ezberdin lortu ziren 60 isolatuen artean, 0,97 balioko SID-arekin.

### 1.3. *fljB* genearen delezioaren ikerketa

Delezioaren 5' muturra aztertzeko 4512F eta 4512R hasleak erabili ziren (Alvarez *et al.*, 2004). 60 isolatuetan 705 bp-ko zatia amplifikatu zen eta sekuentziazioaren bidez frogatu zen delezioa STM 2758 genearen 99. bp-an hasten zela (17. irudia).

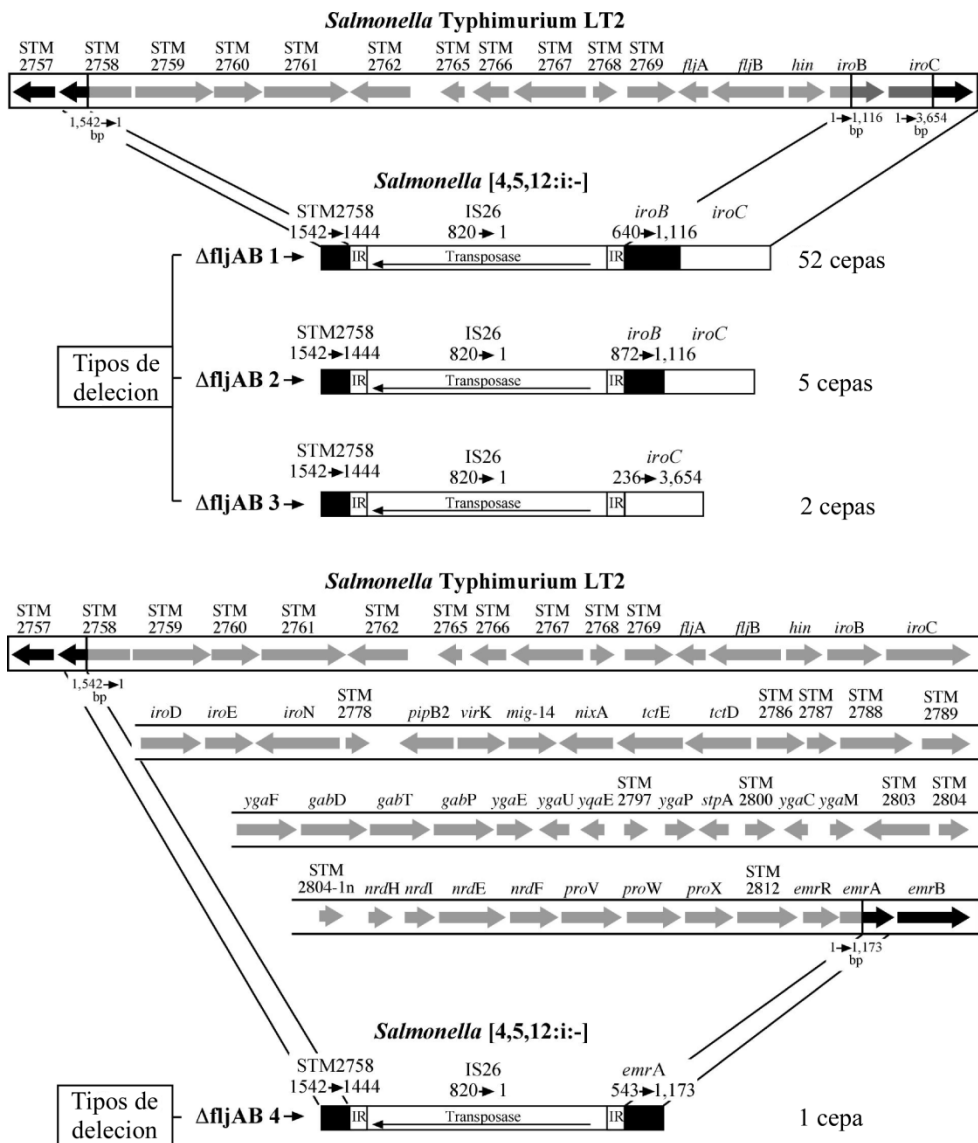


**17. irudia.** Amplifikatutako zatien tamaina eta deskribapena.

Delezioaren 3' muturraren amplifikaziorako diseinatu ziren hasleak IS26-3F eta 2774-2R. I bilduma osatzen duten 60 isolatuen artean 52tan 1.100 bp-ko zatia lortu zen eta sekuentziazioz ikusi zen operonaren delezioak *iroB* genearen 640 nukleotidoan amaitzen zuela (STM2773) (18. irudia).

Bi PCR-kin lortutako zatien artean 60 nukleotido sekuentzia komuna zuten, sekuentziaren erdia zen. Beraz, frogatu zen IS26 insertzio-sequentzia (820 pb) delezioaren erdialdean zegoela (18. irudia). Delezio mota hau 1.Δ*fljAB1* bezala izendatu zen. Beste aldetik, 60 isolatuetatik 5etan, 900 bp-ko zatia lortu zen eta sekuentziazioak baieztatu zuen delezioa pixkat handiagoa zela. Hain zuzen ere, delezioaren amaiera *iroB* genearen 872 nukleotidoan zen

(18. irudia). Aurreko motan bezala, delezioaren erdialdean IS26 insertzio-sekuentzia zegoen. Delezio mota hau 1.ΔfljAB2 bezala izendatu zen. Gainontzeko 3 isolatuetan ez zen amplifikaziorik lortu 3' muturrarentzako ziren bigarren hasle-bikotearekin. Beraz, 14 hasle-bikote berri diseinatu ziren *iroC* (STM2774) genearen ostean zeuden 14 geneen presentzia edo galera zehazteko eta horrela delezioaren amaierako muturra detektatzeko. Bi isolatuetan *iroC* ezik, beste geneen presentzia detektatu zen eta delezioaren 3' muturra zehaztu ahal izan zen 2. hasle-bikotea diseinatuz. Hain zuzen ere, delezioa *iroC* genearen 235. nukleotidoan amaitzen zen eta delezioa 1.ΔfljAB3 bezala izendatu zen (18. irudia). Azkenik, sailkatu barik zegoen isolatuan STM2775 eta STM2815 geneen arteko delezioa baieztatu zen eta 3. hasle-bikotea diseinatu zen delezioaren bigarren zatia amplifikatzeko, IS26-tik STM2815 genearen hasiera arte. Kasu honetan delezioa *emrA* (STM2814) genearen 543 nukleotidoan amaitzen zen (18. irudia), 1.ΔfljAB4 bezala izendatuz.



**18. irudia.** Genoman delezionatutako zonaldeatik hurbil dauden geneen kokapena zehazten da erreferentzia moduan erabilitako *Salmonella* Typhimurium-eko LT2 anduian eta aztertutako *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- bariante monofasikoaren 60 isolatuen artean topatutako 4 delezioetan (Laorden *et al.*, 2010).

Sekuentzien analisi informatikoa

Delezioaren inguruko sekuentzien azterketan ikusi zen *Salmonella* Typhimurium U302-ren pU302L plasmidoak IS26 insertzio-sekuentziaren 5 kopia zituela: bi kopia 5'-3' norantzan eta beste hirurak 3'-5' norantzan. NCBI-ren sekuentzien azterketarako Blast plataformaren bidez aurkitu zen pU302L plasmidoaren IS26ren 3. kopiaren ostean, 14 nukleotidotako sekuentzia osagarria zegoela *Salmonella* Typhimurium-ren STM2758 genearekiko. Hain zuzen ere, genearen 85 eta 99 nukleotidoen artekoa eta 60 isolatuetan aztertutako delezioaren hasiera puntua zen (19. irudia). Delezioaren hasiera 60 isolatuetan STM2758 genearen 99. nukleotidoan hasten zen eta amaiera aldakorra zen.

```

> [db] | AY333434.1 | [D] Salmonella typhimurium plasmid pU302L, complete sequence
Length=84514
complement(26866..27685)
/mobile_element_type="insertion sequence:IS26"

26821 gcctgcaatc tgtgcgcca gttgcagggc cagcatggat ttaccggcac tgttgcaaaq
26881 ttacgqatga ggcagccttt tqtcttattc aaaggcctta catttcaaaa actctgctta
26941 ccaggcgcat ttgccccagg gqatcaccat aataaaatgc tgaggcctgg cctttgcgta
27001 gtgcacgcat cacctcaata cctttgatgg tggcgaagc cgtcttcacg gatttcaatc
27061 ccagcgtggc gccgattatc cgtttcagtt tgccatgac gcattcaatc acgttgctcc
27121 ggtacttaat ctgtcggtgt tcaacgtcag acgggcaccg gccttcgctg ttgagcagaq
27181 caagcgcgcg accatagggc ggcgctttat ccgtgttgat gaatcgcggg atctgccaat
27241 tcttcacggt gttgaggatt ttaccagaaa accgggatgc agctttgctg ttacgacggg
27301 aggagagata aaaatcgaca gtgcggcccc ggctgtgcac ggccccgtac agatcagccc
27361 agcggccatt gaccttcacg taggtttcat ccattgtcca cgggcaaaqa tcggaagggt
27421 tacgccagta ccagcgcagc cgtttttcca ttccaggcgc ataacgctga acccagcggt
27481 aaatcgtgga gtgatcgaca ttcactccgc gttcagccag catctctgac agctcagcgt
27541 aactgatgcc gtatttgcaq taccagcgtc cggcccacag aatgatgta cgtgaaatc
27601 gccgcgcttt gaatgggttc atgtcagctt ccattcagaa aaggggatga taagtttatc
27661 accaccgact atttgcaaca gtgcatatc aagcgacttc tcctatcccc tggsaacaca

TTCAGCGA ACTATA
| | | | |
AAGACGCTCTGA AT

> [db] | AF006468.1 | [D] Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str.
LT2, complete genome
Length=4857432
complement(2895879..2897428)
/locus_tag="STM2758"

2895841 aactcacgcy cttgccgctt tgctacaact cgaattatt agtqtatggg ttcacaatgt
2895901 ccggaaaccc gatgcgcttt aatcgcgcgg atcgcctctt tcagccggtc gqatttcatg
2895961 ccaagacgc tctgaatgt gttcccgacc tcaacgacgc ccgcccggcc aagctgtttc
2896021 agcagcgctt tgctccaccg cgtcttatcc gtcacgtcaa tgcgcagacg tgacatgcaq
2896081 gcttcgatgc tggctcatatt cccaatccg ccataggcca gaatgatgoc gctcaccagg
2896141 tcgtttctgt cgttttctcg ccccacagcg gtttcttga cttcacggcc cggcgtcagc
2896201 aaattccagc gacgggatgg aaaggtaaac aggacgtagt acaccggccc catcaccagc
2896261 ccgaccggga ataccatgta ccagtgaagc gctcgcggca gaaccgcaaa gaagagataq
2896321 tcgataagcc ccccggagaa agagagcccg atgtgcacgc tgaaccactc catcagcagg

```

**19.irudia.** NCBI-ko Blast-ean lortutako alineamendetan zehazten da *Salmonella* Typhimurium U302-ren pU302L plasmidoaren eta *Salmonella* Typhimurium LT2-ren STM2758 genearen inguruak, zeinak ikerketa honetan garrantzitsuak izan diren. Gorrian azpimarratzen dira 3 nukleotidoetan ezberdintzen diren 14 nukleotidoetako sekuentzia osagarriak (% 79ko antzekotasuna).

#### 1.4. pU302 plasmidoaren presentziaren azterketa IS26 insertzio-sekuentziaren zundarekin

Ikerketan aztertutako 60 isolatuetatik 11 aukeratu ziren teknika hau egiteko. Hamaika isolatuak *fljBA* operonaren delezio motaren arabera aukeratu ziren (15. taula). Kontrol-andui moduan U302 fagotipoko *Salmonella* Typhimurium andui bat aukeratu zen. Hamaika isolatueta tamaina handiko plasmido bat detektatu zen, 125 eta 180 kb artekoa. Bestalde, IS26-zundak

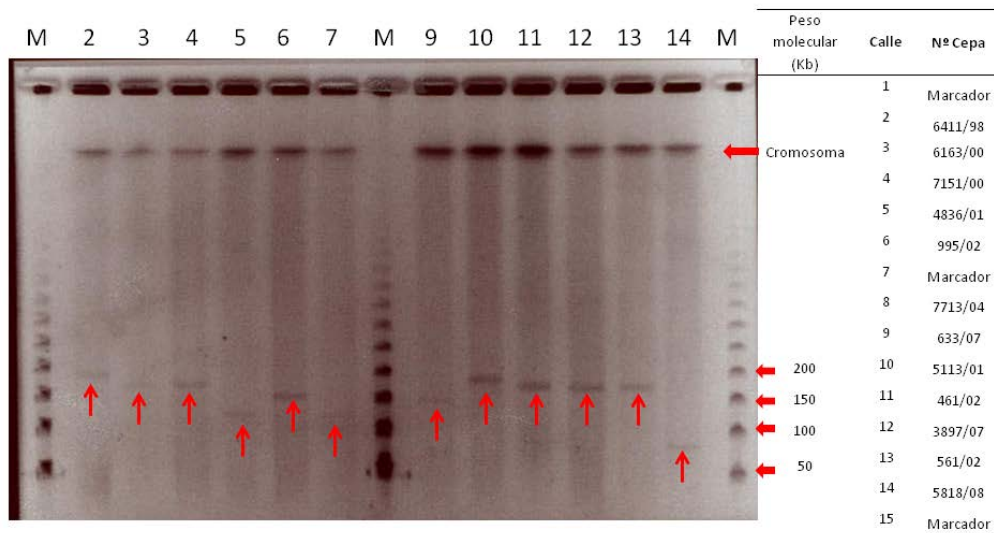
plasmido guztietan hibridatu zuen, bai kromosoman (PCR-z baieztatua) zein plasmidoetan (20. irudia).

**15. taula.** PFGE-S1 teknikaren bidez eta IS26-zundaren hibridazioan lortutako datuak aurkezten dira.

Isolatu Zbk	Delezio mota	Plasmido tamaina (kb)	IS26 plasmidoan	IS26 kromosoman
6411/98	1.ΔfljAB1	180	+	+
6163/00	1.ΔfljAB1	160	+	+
7151/00	1.ΔfljAB1	160	+	+
4836/01	1.ΔfljAB1	125	+	+
995/02	1.ΔfljAB1	150	+	+
7713/04	1.ΔfljAB1	125	+	+
633/07	1.ΔfljAB1	150	+	+
5113/01	1.ΔfljAB2	180	+	+
461/02	1.ΔfljAB2	160	+	+
3897/07	1.ΔfljAB2	160	+	+
561/02	1.ΔfljAB3	160	+	+
5818/08	ND	80	+	-

\*Kontrol anduia 5818/08, LNRS-k eskainitakoa.

\*ND: Delezio barik



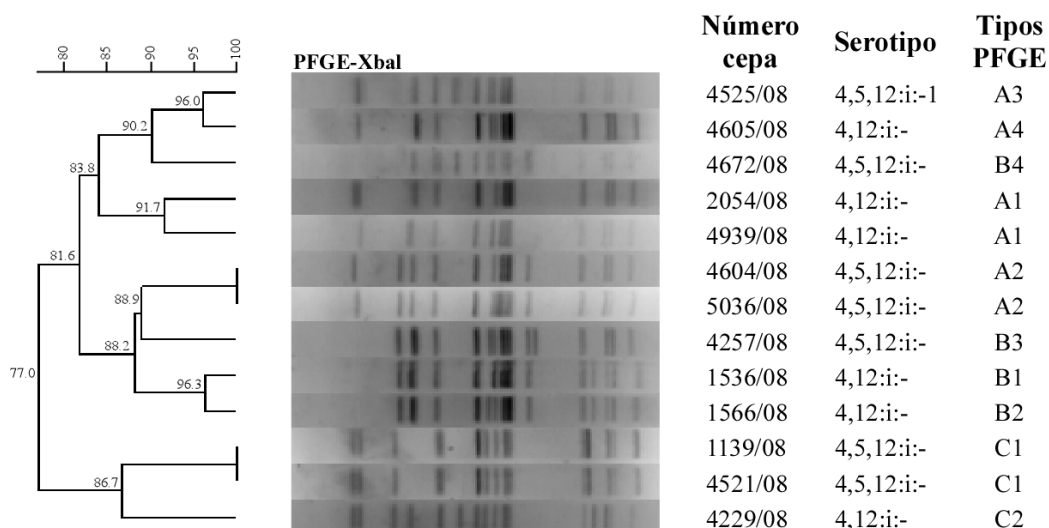
**20. irudia.** PFGE-S1 teknikaren bidez aplikatutako plasmidoak eta erabilitako markatzailea adierazten dira ( $\Lambda$  fagoaren konkatemeroak). Eskubian erabilitako isolatuak zehazten dira.



**2. Fagotipo ezberdineko *Salmonella enterica* subespecie *enterica* 4,[5],12:i:- bariante monofasikoa. II. bilduma**

**2.1. Elektroforesia eremu pulsatuko gelean (PFGE)**

PFGE datuek 13 isolatuentzako 10 profil ezberdinak azaldu zituzten (21. irudia). Profil ezberdinen artean ez zegoen 11 banda baino gutxiagoko ezta 13 baino gehiagoko isolaturik. Bandak tamaina ezberdinekoak ziren profilen artean.



**21. irudia.** Dendrograma Dice koefizientearen eta UPGMA taldekatzearen arabera eraikita.

Profilen artean 4 banda baino gehiagoko ezberdintasunak zeudenez isolatuak 3 pulstotipo ezberdinetan taldekatu ziren (A, B eta C). Bertan, 4 azpimota (A1-A4), 4 azpimota (B1-B4) eta 2 azpimotetan (C1-C2) banatu ziren hurrenez hurren (16. taula). Hamairu isolatuentzat 0,97 balioko Simpson-en dibertsitate indizea kalkulatu zen.

## 2.2. Errepikapen kopuru aldakorreko tandem-en multilocus analisisia (MLVA)

Bildumako 13 isolatuekin egin zen MLVA teknika, 11 profil ezberdin lortuz (16. taula).

**16. taula.** Tipifikatutako 13 isolatuentzat PFGE profila eta bakoitzean lortutako MLVA patroia zehazten da.

ISOLATUA	PFGE	MLVA STTR9-5-6-10-3
1139/2008	<b>C1</b>	13-14-NA-09-210
4521/2008	<b>C1</b>	13-14-NA-09-210
4229/2008	<b>C2</b>	08-09-NA-11-210
4939/2008	<b>A1</b>	07-13-12-NA-210
1536/2008	<b>B1</b>	07-12-08-NA-310
1566/2008	<b>B2</b>	07-16-12-NA-310
2054/2008	<b>A1</b>	07-14-10-NA-210
4605/2008	<b>A4</b>	07-11-08-NA-210
4257/2008	<b>B3</b>	07-11-09-NA-210
4672/2008	<b>B4</b>	07-14-08-NA-210
4525/2008	<b>A3</b>	07-11-08-NA-210
5036/2008	<b>A2</b>	NA-12-NA-NA-210
4604/2008	<b>A2</b>	07-13-10-NA-210

Isolatuen % 69ak, STTR9 hasleekin, 207 bp-ko zatia zuen (7. aleloa). Gainontzekoetan tamaina handiagoko zatiak anplifikatu ziren eta bakar batean

ez zen amplifikaziorik lortu (3. eta 16. taulak). STTR5 haslearekin isolatu guztietan lortu zen 253-277 bp arteko zatiren bat amplifikatzea. Larsson *et al.*-en (2009) izendapena jarraituz 09-16 bitarteko aleloak erantsi zitzaizkien. STTR6 hasleekin ez zen isolatuen % 30an amplifikaziorik lortu. Gainontzeko isolatuetan tamaina ezberdineko zatiak lortu ziren eta 08-12 aleloei egokituz. STTR10-aren kasuan % 23ko amplifikazioa lortu zen eta 2 tamaina ezberdineko zatiak lortu ziren, 09 eta 11 aleloei zegokienak. STTR3 aleloari dagozkion 2 VNTRen amplifikazioan 1. VNTRaren 2 eta 3 errepikapen lortu ziren, baina 2. VNTRrako isolatu guztiek errepikapen kopuru berdina zuten, 10 (aleloak 210 eta 310 izan ziren). Kasu guztietan STTR3 haslearekin lortu zen amplifikazioa (16. taula).



Zatien anplifikazioak 5 delezio mota azaldu zituen (17. taula). Lehenengo motan, 2.ΔfljAB1, 4 isolatuk STM2692 eta STM2772 geneen arteko delezioa aurkeztu zuten. Bigarren motan, 2.ΔfljAB2, 3 isolatuek *fljB* genea mantentzen zuten eta bakarrik *hin* genearen delezioa topatu zen bi isolatutan. Hirugarren motan, 2.ΔfljAB3, delezioak STM2759 genetik STM2773 (*iroB*) generaino luzatzen zen. Laugarren mota, 2.ΔfljAB4, bakarrik isolatu batean aurkitu zen, eta delezioa STM2767 eta STM2773 (*iroB*) geneen bitartekoa zen. Azkenik, bostgarren mota, 2.ΔfljAB5, 2 isolatuetan aurkitu zen STM2760 eta STM2773 geneen arteko delezioa ematen zen (17. taula).

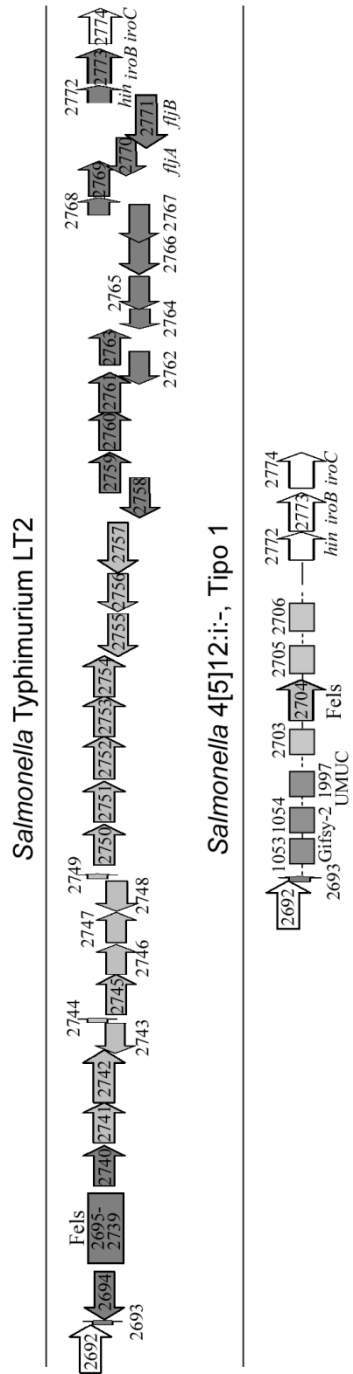
### 2.3.2. Polimerasaren kate-erreakzioa tamaina handiko zatiak lortzeko (*Long-PCR*)

Delezioak eragindako zonaldearen informazio gehiago lortzeko *Long-PCR*, teknika aplikatu zen tamaina handiko zatiak lortzeko. Lortutako PCR zatiak, tamaina ezberdinekoak izan ziren delezio mota ezberdinen artean, eta 5 hasle-bilduma erabili ziren delezio bakoitzean erabiltzeko espezifikoak (10. taula). Behin 13 isolatuak karakterizatu ondoren, hasle espezifikoak diseinatu ziren LNRSren bildumatik aukeratutako 202 isolatu karakterizatzeko. Bilduma berriko isolatuek hasierako 13 isolatuen ezaugarri berdinak zituzten. Bigarren bilduma honetan 55 isolatuk aurretik aipatutako 5 delezioetatik bat erakutsi zuten beraz lan honetan sakonki aztertutako 5 delezioetan guztira 68 isolatu topatu ziren. Dena den, aztertutako 202 isolatuetatik 5 delezio horiek ez izan arren, bigarren faseko flageloaren delezioa zuten eta gutxienez IS26 sekuentziaren insertzioa zuten.

Delezio ezberdinak mugatzen zituzten zatien anplifikazioak eta sekuentziazioak hurrengo 5 delezio-motatan bildu ziren:

1.mota: (2.ΔfljAB1) isolatu horien delezioak 77 gene hartzen zituen barne hasiera batean kokapen-mapan topatutako 79 geneen ordean. STM2693 genea ez zegoen delezionatuta (bakarrik 2 nukleotido zituen delezionatuta) eta STM2704 genea txertatutako zatiaren erdian aurkitzen zen. Tamaina handiko PCRaren bidez 8.827 bp-ko zatia lortu zen STM2692 genetik STM2773 genera eta zati honen sekuentziazioak erakutsi zuen txertatutako zatiaren tamaina 5.654 nukleotidoetako luzera zuela. Konparaketa-analisiaren bidez zati horrek antzekotasun handia zuten bi zati topatu ziren elkarren jarraian Estatu Batuetako jatorriko *Salmonella* Typhimurium 08-1736 anduian, zeinaren genoma osoaren sekuentzia duela gutxi argitaratua izan den (Strain *et al.*, 2013, sarbide zbk CP006602). Sekuentziaren gehiengoa *Salmonella* Typhimurium andui ezberdinetan aurkitzen diren geneen sekuentziez osatuta dago eta andui horien artean LT2 erreferentzia anduia aurkitzen da, baina ez dute % 100ko berdintasuna erakusten eta sekuentziaren zati batzuk gelditu ziren identifikatu gabe. 5.654 nukleotidoetatik lehenengo 4.769 nukleotido *Salmonella* Typhimurium 08-1736 anduiaren SE\_19925 genetik SE\_19950 gene arte egokitzen zen. Deskribatutako geneak sei proteina kodetzen dituzte: bi Gifsy-2 profagoaren proteinak dira (LT2 anduian STM1053 eta STM1054 geneak bezala izendatuak, baina ez daude osorik), beste proteina bat UmuC proteinari dagokio (STM 1997) eta azken hiru proteinak Fels-2 profagoari dagozkie (bi flageloaren mihiztaduran parte hartzen dutenak-*Tail fiber assembly protein*- eta hirugarrena izatzaren proteina-*Tail protein*-). Bestalde, gelditzen diren 885 nukleotidoak 5.654-etatik, *Salmonella* Typhimurium 08-1735 anduian ere

agertzen den DNA inbertasa batekin solapatzen zen, SE\_19950 genetik 83 nukleotidoko distantzian (*Tail protein*). Fels-2 profagoan aurkitutako azken hiru proteinak LT2 anduiak STM2703, STM2704, STM2705 eta STM2706 geneei dagozkie, non STM2703, STM2705 eta STM2706 patzialki delezionatuta agertzen diren. Delezioaren amaiera-muturra *fljB* - *hin* geneen arteko zonaldean aurkitzen zen, zehazki *fljB* genearen 3' muturraren 10 nukleotidoetara (22. irudia). Guztira 4 andui topatu ziren delezio mota horrekin.



**22. irudia.** 1. motako delezioaren eskema, *Salmonella* Typhimurium LT2 anduiaren genomarekin alderatuta.



2. mota: (2.ΔfljAB2) Delezio honetan *Long-PCR*-aren bitartez ezin izan zen amplifikaziorik lortu *fljA* eta *iroB* (STM2770-STM2773) geneen artean. Beste aldetik, PCR arruntaren bidez lortutako datuak *hin* (STM2772) genearen delezioa bakarrik aurkeztu zuten bi anduietan eta bere presentzia andui bakarrean (1536/08). Hala ere, *Long-PCR*-aren bidez STM2770 eta STM2774 geneetan kokatutako hasleen bidez fragmentu bat lortu zen eta honen sekuntziazioaz ikusi zen *hin* eta *iroB* (STM2773) geneen amaiera eta hasiera eta bien arteko zonalde ez-kodetzailean IS26 insertzio-sekuentzia agertzen zen (26. irudia). Bigarren faseko flageloaren adierazpenaren gabeziaren zergatia argitzeko, 2.ΔfljAB2 delezioa zuten 3 andui horien genoma guztiz sekuntziaziozera bidali zen (1536, 1566 eta 2054 anduiak). Lan honetan diseinatutako hasleekin ikerketa zabaldu zen LNRSko bildumatik aukeratutako zenbait isolatuekin (202) eta delezio mota hau aukezten zuten 23 isolatu gehiago topatu ziren.

3.mota: (2.ΔfljAB3) *Long-PCR* bidez tamaina ezberdineko bi zati topatu ziren. Beraz 3. mota bi azpitaldeetan zatitu zen A eta B. Bi azpitaldeetan delezioa nukleotido berdinean amaitzen zen, baina nukleotido ezberdinean hasten zen (23. irudia).

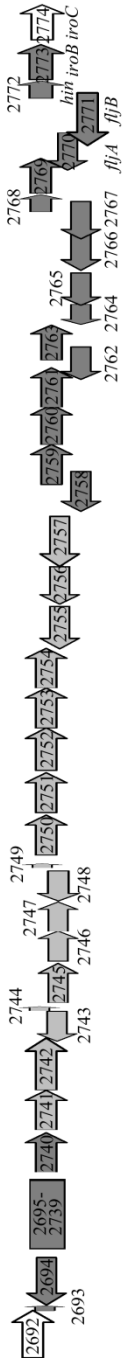
A bariantea: Delezioa STM2759 genearen 1.079 nukleotidoan hasten zen (1.679 bp luzerakoa). Jarraian IS26 sekuntziaren insertzioa topatu zen *hin* - *iroB* geneen arteko zona ez-kodetzailean amaitzen zen, zehazki *hin* genearen 3' muturraren 612 bp-ra eta 273 bp-ra *iroB* genearen 5' muturretik.

B bariantea: Azpitalde honetako delezioa zuten isolatuak tamaina laburragoko delezioa zuten. STM2759 geneak ez zuen deleziorik eta jarraian

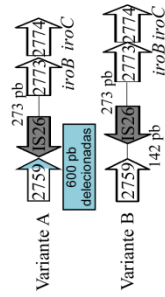
STM2759 genearen 5' muturretik 142 bp-ra IS26 sekuentzia zegoen eta insertzio-sekuentziaren amaiera-muturra A bariantean deskribatutako nukleotido berdinean zegoen.

Aurrez azaldu den moduan, isolatu gehiagorekin ikerketa zabaltzeko ezaugarri berdinak aurkezten zituzten LNRSko bildumako zenbait isolatu aukeratu ziren eta diseinatutako hasle espezifikoak erabili ziren. Horrela delezio mota hau zuten 25 isolatu topatu ziren: 24 B barianteari zegozkion zatien tamaina zuten (1.680 bp eta 550 bp), eta isolatu batek A bariantearena (220 bp eta 550 bp). Beraz guztira hirugarren motako delezioan 28 isolatu geneuzkan (2 isolatu 2.ΔfljAB3.A bariantekoak, eta 26 isolatu 2.ΔfljAB3.B bariantekoak).

*Salmonella* Typhimurium LT2



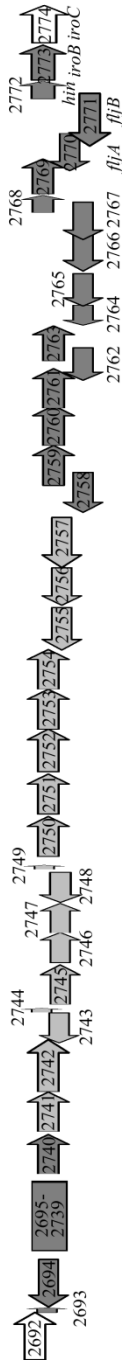
*Salmonella* 4[5]12:i:-, Tipo 3



**23. irudia.** 3. motako delezioaren eskema, *Salmonella* Typhimurium LT2 anduiaren genomarekin alderatuta.

4. mota: (2.ΔfljAB4) Bakarrik topatu zen delezio hau 4525/08 anduian. Kasu honetan delezioaren hasiera IS1 insertzio-sekuentziarekin hasten zen. IS1 kontrako zentzuan kokatuta zegoen STM2767 - STM2768 zonalde intergenikoan, zehazki STM2767 genearen 3' muturraren 118 bp-tara. IS1 insertzio-sekuentziak lehenengo 133 nukleotidoen gabezia zuen puntu horretan IS26 sekuentziaren insertzioa agertzen zelako. IS26 sekuentziaren amaiera berriz *hin* - *iroB* geneen artean zegoen, konkretuki 2.ΔfljAB3 delezio motan zehaztutako nukleotido berdinean (24. irudia).

*Salmonella* Typhimurium LT2



*Salmonella* 4,5,12:i:-, Tipo 4



**24. irudia.** 4. motako delezioaren eskema, *Salmonella* Typhimurium LT2 anduiaren genomarekin alderatuta.

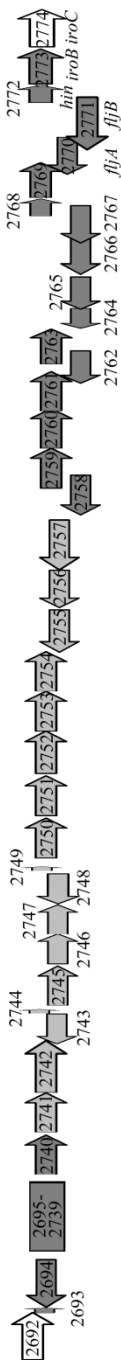
5. mota: 2.ΔfljAB5 delezioak insertzio kopururik altuena aurkeztu zuen. Delezioa STM2761 genearen 1.125 nukleotidoan hasten zen partzialki delezionatuta dagoen IS1 sekuentziaren insertzioagatik. Kasu honetan 2.ΔfljAB4 motarekin konparatuta, IS1 sekuentziak ez zegoen kontrako zentzuan kokatuta, beraz lehenengo *insB* genea agertzen zen eta jarraian *insA*. IS1 sekuentziaren azkenengo nukleotidoaren ostean 354 nukleotidoetako zatia agertzen zen 593 bp-ko gene batenak zeinak *S. Typhimurium* T000240 anduian deskribatzen dena (NCBI) transkripzioaren erregulatzailerik bat kodetzen duena. Zati honen jarraian *Salmonella* Typhimurium-en pSRC27-H plasmidoan deskribatutako zenbait geneen sekuentziak agertzen ziren: *tetA*, *tetR*, *jemC*, *jemB* eta *jemA*. Ondoren IS10 insertzio-sekuentziaren zati bat agertzen zen 973 nukleotido 1.238 bp-tik. Galera hau IS26 insertzio-sekuentziaren txertaketaren ondorioa da, zeinaren amaiera aurreko delezioetan gertatzen den nukleotido berdinean dagoen *hin* eta *iroB* geneen artean. Nabarmentzekoa da *tetA*, *tetR* eta *jemC* geneak *S. Typhimurium* T000240 anduian ere agertzen direla. Ondorioz, txertatutako zatiaren luzera 7.663 bp-koa da eta 12 generen delezioaren eragilea izan da eta bigarren faseko flageloa kodetzen duen genearen delezioarena ere (25. irudia).

Mota honetako isolatu gehiago lortzeko helburuarekin, LNRSko bilduman zeuden ezaugarri berdineko isolatu monofasiko gehiago aukeratu ziren eta 7 isolatutan delezio honi dagozkion zatiak topatu ziren (1. zatia 1.500 bp-koa eta 2.a 550 bp-koa), beraz guztira 9 isolatu topatu ziren delezio mota horrekin, 2.ΔfljAB5. NCBI-ko BLAST tresnaren bidez, aurkitu zen deskribatutako zonalde intergenikoan (*hin-iroB*) 14 nukleotidoetako sekuentzia bat zegoela pU302L plasmidoaren 3. IS26 kopiaren hasieran zeuden beste 14

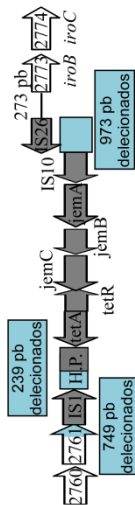
---

nukleotidoetako sekuentzia batekiko osagarriak zirenak (hau da 324-338 nukleotidoen artean *iroB* genearen hasiera baino lehenago).

*Salmonella* Typhimurium LT2



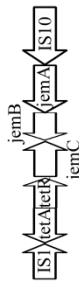
*Salmonella* 4,5,12:i:-, Tipo 5



*Salmonella* Typhimurium T000240



*Salmonella* Typhimurium plásmido pSRC27-H



**25. irudia.** 5. motako delezioaren eskema, *Salmonella* Typhimurium LT2 eta *Salmonella* Typhimurium T000240 anduien genomarekin eta pSRC27-H plasmidoarekin alderatuta.



### 2.3.3. Genoma osoaren sekuentziazioa (NGS)

II. bildumako 3 isolatuen genoma osoaren sekuentziazioa egin zen, hain zuzen ere hasiera batean 2.Δ*fljAB2* delezio motan sailkatu ziren anduiena. Sekuentzien analisiaren bidez hiru anduien artean aldakortasun txikia zegoela ikusi zen.

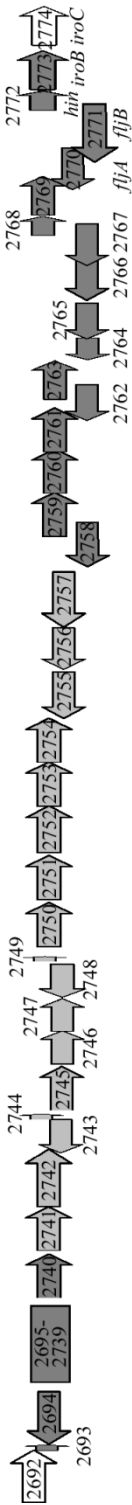
Hasiera batean, 1536/08 isolatuak *fljA*, *fljB* eta *hin* geneak zituela erakutsi zuen, beraz andui horrek ez zuen deleziorik. Dena den, *hin* genearen ostean, *hin-iroB* bitarteko zonalde ez-kodetzailean, (*iroB* aurreko 344 nukleotidoan) IS26 sekuentziaren hasiera detektatu zen, aldeztatik *Long-PCR* bidez aurkitu zen moduan. Mozte-puntu garbia erakusten zuen eta IS26 sekuentziaren ostean 344 nukleotido horiek jarraitzen ziren. Ondoren *iroB* eta *iroC* geneak agertzen ziren, bata bestearen atzean.

Ondoren, 1566/08 isolatuak *fljA* eta *fljB* geneak osorik zituen baina horien ostean *hin* geneak delezio partziala erakusten zuen, azkenengo 33 nukleotidoena hain zuzen ere. Delezioa IS26 sekuentzia batek eragindakoa zen, baina kasu honetan IS26 sekuentzia ez zegoen osorik, hasierako 300 nukleotidoak ez bait ziren agertzen. 60 nukleotidoetako teilakatzearekin beste IS26 insertzio-sekuentzia baten hasieraren 358 bp jarraitzen ziren, baina bigarren sekuentzia honen ostean ezin izan zen adostu zein izan litekeen jarraipena (falta zen *hin* genearen zatia eta beste zonalde hurbilen bat) (26. irudia).

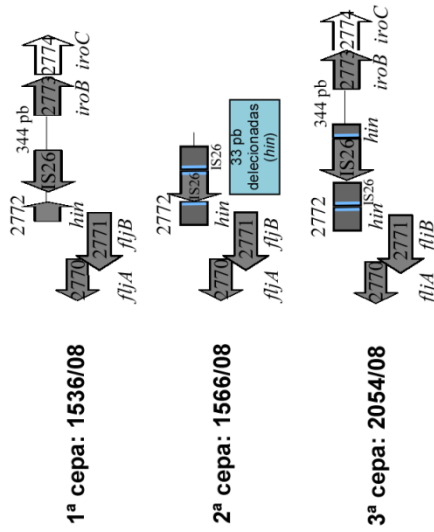
Azkenik, 2054/08 isolatuak baita *fljA* eta *fljB* geneak osorik zituen eta *hin* genearen erdian bi IS26 insertzio-sekuentziak agertzen ziren, 26. irudian aurkezten den moduan, *hin* genearen 374. nukleotidoan beste IS26 baten zati

bat zegoen, 339 bp-koa. Honen amaiera-muturrean beste IS26 sekuentzia oso bat zegoen 3'-5' zentzuan kokatuta. Azkenengo IS26 honen ostean *hin* genearen azkenengo 205 nukleotidoak zeuden eta ondoren *hin-iroB* zonaldean, 1536/08 isolatuan deskribatu den moduan, beste IS26 sekuentzia topatu zen (26. irudia).

*Salmonella* Typhimurium LT2



*Salmonella* 4[5]12:i-, Tipo 2

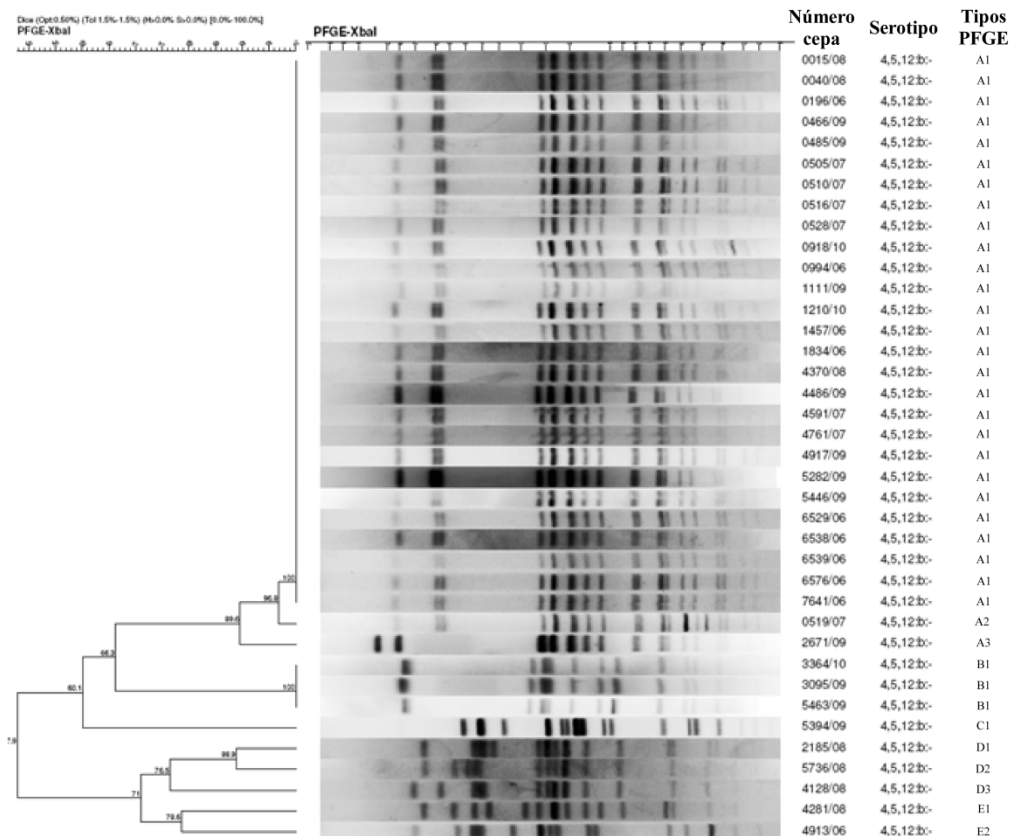


**26. irudia.** 2. motako delezioaren eskema, *Salmonella* Typhimurium LT2 anduiaren genomarekin konparatuta. Guztiz sekuentziazatutako 2 anduien delezioa irudikatu da.

### **3. *Salmonella enterica* subesp. *enterica* 4,5,12:b:- bariante monofasikoa. III. bilduma**

#### **3.1. Elektroforesia eremu pultsatuko gelean (PFGE)**

PFGE analisiak ikertutako 39 isolatuen artean 10 profil ezberdin azaldu zituen (27. irudia). Profilen artean ez zeuden 12 banda baino gutxiagokoak ezta 15 baino gehiagokoak. Dena den, profil ezberdinen artean 4 banda baino gehiagoko ezberdintasunak aurkitu zirenez isolatuak 5 pultsotipo ezberdinetan sailkatu ziren A, B, C, D eta E. A pultsotipoa 3 azpimotetan banatzen da A1 (28 isolatuekin), A2 (1 isolatu) eta A3 (1 isolatu). B pultsotipoan 3 isolatu sailkatu ziren profil berdinarekin. C pultsotipoan isolatu bakarra sailkatu zen eta D pultsotipoan 3 azpimota topatu ziren eta bakoitzean isolatu bakarrarekin (D1, D2 eta D3). Ezberdintasun gehien erakutsi zuten profilak profil nagusiarekiko E pultsotipoan batu ziren E1 eta E2 azpimotekiko, isolatu bat bakoitzean. 0,48 balioko SID kalkulatu zen.



27. irudia. Dice indizea eta UPGMA taldekatzearen bidez PFGE-ko datuentzat eraikitako dendograma.

### 3.2. Subespeziea determinatzeko PCRa

*S. enterica*-n *salamae* subespeziean (II) beste serotipo bat dago 4, 12:b:-formula antigenikoarekin, beraz bariante hau karakterizatzeko III. bildumako isolatuetan PCR bat egin zen subespeziea determinatzeko. Baieztatu zen isolatu monofasiko guztiak *Salmonella enterica*-ren *enterica* subespeziekoak (I) zirela.

### 3.3. Java barietatearen determinaziorako PCR espezifikoa

III. bildumako isolatuak *Salmonella* Paratyphi B-ren Java barietatekoak ziren frogatzeko, tartratoaren metabolismoarekin erlazionatutako geneekiko espezifikoa ziren hasleak erabili ziren PCR bat egiteko. Ondoren, 39 isolatuetatik 38-k positiboak izan ziren (esperotako tamainako zatiak zutelako). Beraz baieztatu zen 38 isolatu horiek *Salmonella* Paratyphi B Java barietateko isolatu monofasikoak zirela.

### 3.4. *fljB* genearen delezioaren ikerketa

#### 3.4.1. *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* eta *iroC* geneen detekziorako PCRak

5 PCR egin ziren *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* eta *iroC* geneen presentzia edo galera aztertzeko. Isolatu guztietan lortu zen amplifikazioa *iroB* eta *iroC* geneentzako. Beste aldetik *fljA*, *fljB* eta *hin* geneen delezioa baieztatu zen (18. taula).

#### 3.4.2. Geneen kokapen-mapa

4 PCR-ren bidez *Salmonella* Paratyphi B (dT-) SPB7 anduian (sarbide zbk CP000886) deskribatzen diren 4 geneen amplifikazioa lortzen saiatu ginen, isolatuetan *fljB* genearen inguruan agertzen ziren geneak ezagutu nahi genituen

eta (18. taula). NCBI plataforman eskura zegoen Paratyphi B serotipoko genoma dT (-) anduiarena bakarra zenez, hori aukeratu behar izan genuen, baina ez zen anplifikazioarik lortu III. bildumako isolatueta ezta kontrol moduan erabilitako Java barietateko dT(+) anduietan ere (LNRSkoak).

**18. taula.** Aztertutako geneen anplifikazioaren emaitzak isolatu monofasikoetan eta kontrol moduan erabilitako anduietan.

Geneak	III. bildumako isolatuak	S. Paratyphi B Java (dT+)
SPAB_3434	-	-
SPAB_3435	-	-
SPAB_3436	-	-
SPAB_3437	-	-
SPAB_3438	-	+
( <i>fljA</i> )		
SPAB_3439	-	+
( <i>fljB</i> )		
SPAB_3441	-	+
( <i>hin</i> )		
SPAB_3444	+	+
( <i>iroB</i> )		
SPAB_3448	+	+
( <i>iroC</i> )		

### 3.4.3. Alderantzizko PCRa eta sekuentziazioa

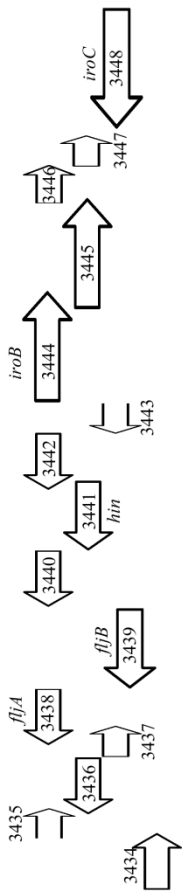
Delezioaren muturrak zehazteko orduan, zonalde horren inguruan zeuden geneen kokapena ezezaguna zenez, alderantzizko sekuentziazioaren teknika egitea erabaki genuen, ezaguna zen gene bakarretik hasita, *iroB*. Horretarako III. bildumako 3 isolatu aukeratu ziren, hain zuzen ere PFGE profil ezberdina zutenak. Isolatu batean (1111/09), A pultsotipokoa, 1.600 bp-ko zatia lortu zen eta sekuentziazioan *iroB* eta *iroC* geneak elkarren jarraian agertzen zirela ikusi zen *Salmonella* Typhimurium-ean deskribatzen zen moduan (28. irudia). Sekuentziazioak erakutsi zuen *iroB* genearen aurretik *hin - iroB* arteko zonalde intergenikoaren 396 nukleotidoak, ondorioz bi geneen arteko gertutasuna frogatuz. Ondoren, 183 bp-ko sekuentzia osagarria topatu zen *api81* genearekiko. Horrek, *Yersinia pseudotuberculosis* 32777 anduiaren patogenizitate uharte batean agertzen da, YAPI izenekoa (sarbide zbk, NCBI AJ627388.1). Gene horrek transposasa bat kodetzen du *Y. pseudotuberculosis*-en deskribatzen dena eta osagarria zena, 66 nukleotidoetan, IS1351 eta IS200 sekuentziekin. Azken IS horiek *Salmonella* Enteritidis-en agertzen dira (sarbide zbk, Z83734). 183 bp-ko sekuentzia honen ostean, *Salmonella* Typhimurium LT2 anduaren STM2745 genearen sekuentzia zegoen. Bertan, genearen lehenengo 215 nukleotidoak agertzen ziren. Azkenik, STM2744 eta STM2743 geneak zeuden delezio edo insertziorik gabe (28. irudia).

Teknika honekin erabilitako beste bi isolatuetan bakarrik ikusi zen *iroB* eta *iroC* geneak jarraian zeudela, baina ezin izan zen *fljB* genearen delezioaren zergatia eta beraren muturrak determinatu. Beraz, andui monofasikoetan, 28. irudian azaltzen den moduan, guztiz sekuentziazioa

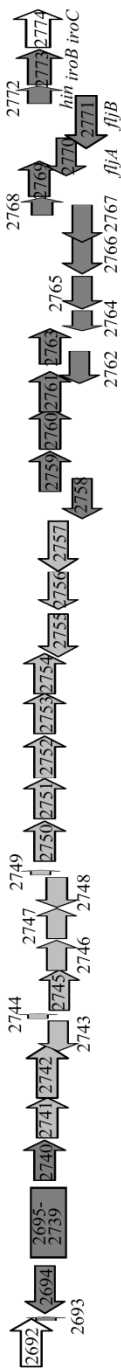


*Salmonella* Paratyphi B (dT<sup>-</sup>)-aren geneen kokapena ezberdina da *fljB* genearen aurreko geneen kokapenari dagokionez. Lan honetan delezioa karakterizatua izan den isolatueta (39tik 30 isolatu), nabaritzen da DNAREN transposizio elementuen seinale egon dela (transposasa bat *Yersinia pseudotuberculosis*-ekoa) delezioaren erdialdean. Baita delezioaren bi muturretan *Salmonella enterica*-ren geneak agertzen dira bere ohiko kokapenean, gainontzeko insertziorik gabe (28. irudia).

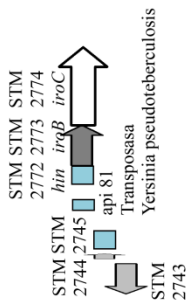
*Salmonella* Paratyphi B, SPB7 CP.000886



*Salmonella* Typhimurium LT2



*Salmonella* enterica 4, 12:b:-



**28. irudia.** Ikerketagai izan diren isolatu talde nagusian aurkitutako delezioaren eskema, *Salmonella* Paratyphi B (dT-) eta *Salmonella* Typhimurium LT2-rekin alderatuta.

### 3.5. PCR eta sekuentziazioa.

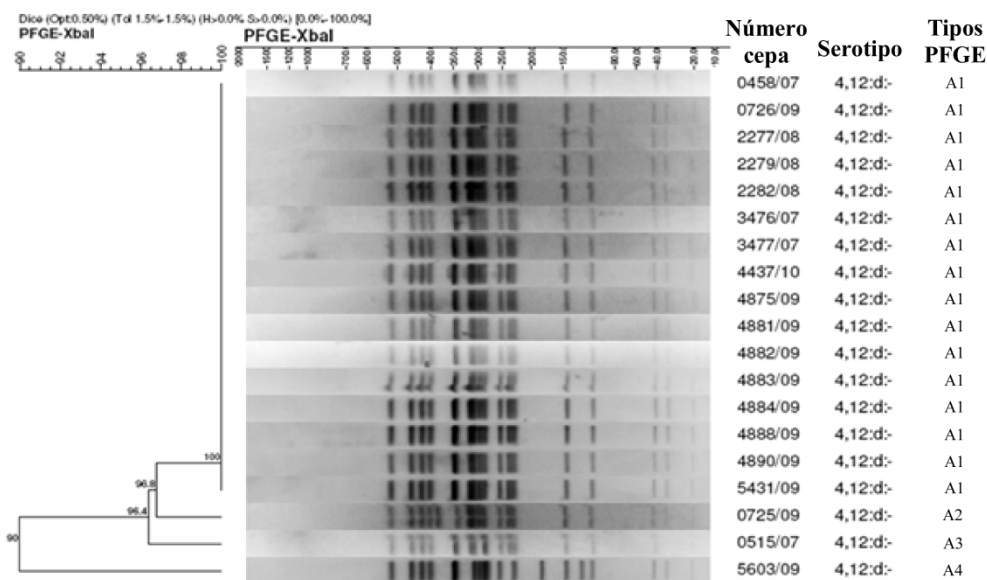
Alderantzizko sekuentziazioan lortutako datuak frogatzeko helburuarekin STM2744 eta STM2773 (*iroB*) geneen arteko zonaldea amplifikatu zen PCR bidez. 39 isolatu monofasikoen artean espero zen tamainako zatia (737 bp) lortu zen A pultsotipoko 30 isolatuetan. Gainerako 9 isolatuetan (PFGE profil ezberdinak zutenak) ez zen zatirik lortu baita kontrol moduan erabilitako LNRS-ko *Salmonella* Paratyphi B Java (dT+) anduian ere ez.

Lortutako zatien artean, guztiak berdinak izanda, bakarrik 3 sekuentziatu ziren eta berriz konprobatu zen delezioa STM2745 genearen 215 bp-an hasten zela, jarraian *Yersinia pseudotuberculosis*-aren 183 bp-ko sekuentzia zegoen eta atzetik *hin-iroB* arteko zonaldearen 396 nukleotidoak (28. irudia). Amaitzeko, LNRS-ko *Salmonella* Paratyphi B Java-ko kontroleko 6 anduian PCR arrunta egin zen *fljB-iroB* geneen arteko gertutasuna konprobatzeko. Guzietan lortu zen amplifikazio egokia erabilitako hasleekin. Horrek frogatu zuen bi gene horien arteko gertutasuna, *Salmonella* Typhimurium LT2 anduian deskribatzen den moduan, eta ez NCBI-n sekuentziatuta dagoen *Salmonella* Paratyphi B (dT-) anduian (ezin izan zen Java barietatean aztertu datubaseetan ez zeudelako genomak guztiz sekuentziatuta).

#### 4. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 4,5,12:d:- bariante monofasikoa. IV. bilduma

##### 4.1. Elektroforesia eremu pulsatuko gelean (PFGE)

PFGE analisiak 19 isolatuentzat 4 profil mota ezberdinak azaldu zituen (29. irudia). Profilak 14-16 banda bitartekoak ziren eta haien artean ez zuten 3 banda baino gehiagoko ezberdintasunik, profil guztiak pulstotipo bakarrean taldekatu ziren (A) eta 4 azpimotatan banatuz (A1, A2, A3 eta A4), 16, 1, 1 eta 1 isolatuekin hurrenez hurren eta 0,3 balioko SID-arekin.



29. irudia. Dice indizearen eta UPGMA taldekatzearen bidez PFGE-rentzako eraikitako dendograma.

## 4.2. *fljB* genearen delezioaren ikerketa

### 4.2.1. *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* eta *iroC* geneen detekziorako PCRak

IV. bildumako isolatueta 5 PCR egin ziren *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* eta *iroC* geneen presentzia edo galera aztertzeko. Guztietan *iroB* eta *iroC* detektatu ziren eta *fljA*, *fljB* eta *hin* geneen galera baieztatu zen.

### 4.2.2. Geneen kokapen-mapa

Formula antigenikoa eta PFGE profilen arabera, isolatu monofasikoek *Salmonella* Schwarzengrund-ren jatorrikoak izan zitekeen. Horregatik, *Salmonella* Schwanzengrund-ren (CP001127.1) genomaren oinarrituz 8 hasle bikote diseinatu ziren, *fljB* genearen inguruko 9 geneen kokapen mapa lortzeko (SesA\_A2901 eta SesA\_A2914 geneen artean). Era horretan delezioaren muturrak zehazteko. PCR emaitzen arabera SesA\_A2901 eta SesA\_A2904 geneen arteko geneen presentzia baieztatu zen. Beste aldetik, SesA\_A2905 eta SesA\_A2913 (*hin*) geneen arteko galera ere.

*Long-PCR* bidez saiatu ginen SesA\_A2904 eta SesA\_A2914 geneen arteko zatia amplifikatzea, baina ezinezkoa izan zen.

#### 4.2.3. Alderantzizko PCRa eta sekuentziazioa

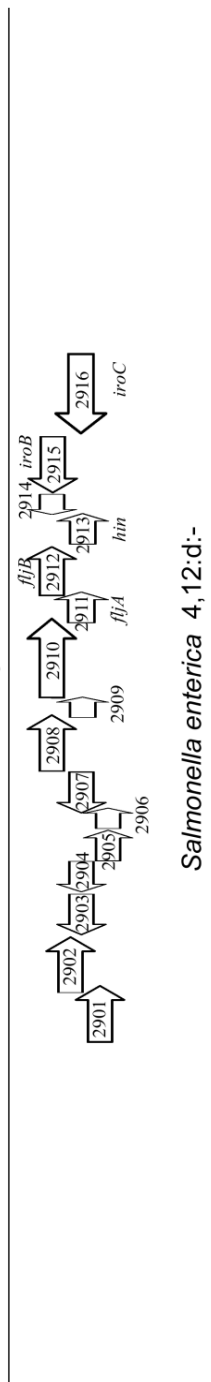
Aztergai ziren bi isolatu aukeratu ziren teknika hau egiteko, biak emaitza berdinak eman zituzten. Hirugarren bilduman erabilitako gene berdinetik hasita, *iroB* (SesA\_A2915), 5.000-6.000 bp bitarteko zatia lortu zen. Zati honen sekuentziazioak hurrengoa eskaini zuen: lehenengo *iroC* (SesA\_A2916), *iroB* (SesA\_A2915) eta SesA\_A2914 geneak daude eta jarraian *iroB-hin* (SesA\_A2913) arteko zonalde intergenikoaren 396 bp-ak. Ondoren, agertu zen identifikatu gabeko zatia 153 bp-koa eta jarraian 400 bp-ko beste sekuentzia bat *Enterobacter aerogenes* (nº acceso CP002824) bakterioan identifikatua. Sekuentzia, karakterizatu gabeko 228 bp-ko proteina bat da bere mutur ez kodetzaileekin, 90 eta 82 bp-koak. Honen ostean, identifikatu gabeko 1.982 bp-ko sekuentzia zegoen eta jarraian beste 620 bp-ko zatia. Azken horrek *Enterobacter aerogenes* genomaren ere agertzen zen eta 596 bp-ko IS30 insertzio-sekuentziaren azkeneko muturrari zegozkien eta 24 bp-ak zonalde ez-kodetzailearen 5' muturrari (IS30-ren luzera 998 bp) (30. irudia).

#### 4.2.4. Long-PCR eta sekuentziazioa

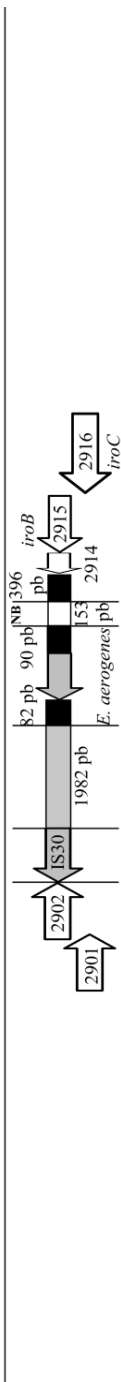
Alderantzizko sekuentziazioaren bidez lortutako emaitzak baieztatzeko eta delezioaren hasiera muturra identifikatzeko, SesA\_A2902 eta SesA\_2915 (*iroB*) geneen artean *Long-PCR*a egin zen. Emaitzek baieztatu zuten aurreko atalean deskribatutako sekuentziak, baita horien ordena. Gainera delezioaren hasiera-muturraren sekuentzia lortu zen. Kasu honetan IS30 insertzio-sekuentziaren jarraipena ikusten

zen eta beraz, IS30-a osorik zegoen (1.022 bp: IS30-ren 998 bp-ak eta 24 bp-ak zona ez-kodetzailearenak). IS30-aren hasieraren ostean *Salmonella* Schwanzengrund-ren SesA\_A2902 genea zegoen (30. irudia). Era berean datu hauei esker ikusi zen SesA\_A2903 eta SesA\_A2904 IV. bildumako isolatueta agertzeaz gain, ez zeudela kokapen horretan eta ziurrenik beste zonalde ezberdin batean egon zitezkeen.

*Salmonella* Schwarzengrund 4,12,27:d:1,7



*Salmonella enterica* 4,12:d:-



**30. irudia.** IV. bildumako isolatuen delezioaren barruan aurkitutako sekuentzien kokapena azaltzen da eta *Salmonella* Schwarzengrund-en genomarekin aldaratzen da.



***EZTABAIDA***

---



Berezko mutazioak, hautespena eta isolamendua elementu gakoak dira eboluzio biologikoan (Arber, 1991). Gene bateko funtzioen garapena da DNAREN berrordenamendu prozesuen eta sekuentzia nukleotidikoen alterazioen ondorioa. Azken hauek eraginda daude nukleotidoen ordezkapenez, delezio txikiez, txertaketa- eta bikoizketa- prozesuez, sarritan eraginda daudela elementu genetiko mugikorren transposizioagatik (Arber, 1990 eta 1991). Eboluzioaren funtsezko oinarri bezala, aldatzeko eta bere ingurunerako era eraginkorragoan moldatzeko gai den organismoa abantaila ebolutiboak lortuko dituen da eta bere espeziearen biziraupenari lagunduko dio.

Gaur egun, Kauffman eta White-ko eskeman, 2007an argitaratuta, *Salmonella*-ko 2.579 serotipo jasotzen dira guztira, artean Typhi edo Dublin bezalako 350 serotipo monofasiko baino gehiago deskribatzen diren, edo Gallinarum bezala flagelo gabekoak (Grimont eta Weill, 2007). Bestalde, badaude Kauffman eta White-ko eskeman jasotzen ez diren 2.500 serotipoetatik sortutako barianteak, baina mundu osoko hainbat argitalpenetan deskribatzen direnak (Barco *et al.* 2014, Prendergast *et al.* 2013, Mandilara *et al.* 2013, Gallati *et al.* 2013, Bugarel *et al.* 2012, Wasyl *et al.* 2012, Hopkins *et al.* 2012, Hernández *et al.* 2012, Gossner *et al.* 2012, Laorden *et al.* 2010, Hauser *et al.* 2010). Mutazio hau izan dezakeen abantaila ebolutiboari dagokionez, bariante hauek desagertu daitezke, edo aitzitik egonkor daitezke eta bere arbasoaren nitxoan partekatzea edo arbasoa lekutik aldentzera helduz. Azken hau da **oraingo** doktorego-tesi honetan deskribatutako lehenengo bi bildumen kasua. Bilduma horietako isolatuak aurkitzen dira ohikoenen artean herri desberdinetan (EFSA, 2010).

1997an Espainian isolatu zen lehen aldiz *Salmonella enterica*-ko andui monofasikoa 4,5,12:i:- formula antigenikoarekin, 1998an gure herrian maizago isolatzen ziren laugarren serotipoa izatera pasatuz (Echeita *et al.*, 1999). Gehikuntza honengatik, ikerketa desberdinak burutu ziren bere jatorri posiblea ezartzeko asmoz (Echeita *et al.* 1999, Echeita *et al.* 2001, Garaizar *et al.* 2002, Guerra *et al.* 2000). Echeita-k egindako ikerketan, 2001ean, *Salmonella* Typhimurium-en eta *Salmonella*-ren ezohiko serotipo berriaren arteko erlazioa frogatu zen. Aipaturiko lanean ikertu ziren *Salmonella* Typhimurium DT104 eta U302 fagotipoen espezifikoak diren bi sekuentzia. Horiek *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- bariante monofasikoan detektatu zirenn, bi serotipoen arteko lotura ebolutiboa frogatuz (Echeita *et al.* 2001). Bariante honen ezaugarri nagusia bigarren faseko flageloareno sintesiaren arduraduna den operonaren delezioa da eta andui monofasikoetan bihurtzen dituen eta formula antigenikoan erreakzioaren absentsia azaltzen duena da.

1997an agertutako bariante monofasikoaren beste ezaugarrien bat izan zen anpizilinara, kloranfenikolera, sulfonamidara, gentamizina, estreptomizina, tetraziklinara eta sulfametoxazole-trimetoprimera azaldutako erresistentzia anitza (R-ACSuGSTSxT), eta kasuen % 55 baino gehiagotan U302 fagotipodunak zirela (de la Torre, 2006, Usera *et al.*, 2001). Andui hauetako erresistentzia gentamizinarekin aurrean nabarmentzekoa da, LNRS-ean jasotako giza-jatorriko anduien artean ez bait da ohiko erresistentzia (Echeita *et al.*, 2005). 2004an (Gerra *et al.*, 2004) ikerketa bat egin zen antimikrobianoen aurkako erresistentzietako mekanismo molekularrak zehazteko *Salmonella* Typhimurium-en erresistentzia anitzeko anduietan eta zeinen artean lehenengo bilduma osatzen duen bariante monofasikoaren anduiak aurkitzen ziren ere.

Egiaztatu zuten bariante honek dituen erresistentziako determinanteak aurkitzen direla antibiotikoen aurkako erresistentziako plasmido desberdinetan. Lanean 200 kb-eko plasmido hibridoa detektatu zuten (pUO-St-VR3), antibiotikoen aurkako erresistentzia eskaintzen duten geneekin, *dfrA12* eta *aadA2* bezalakoak, trimetoprimaren aurkako erresistentziarako eta estreptomizinarako besteak beste, eta bariante monofasiko emergente honetan soilik deskribatu ziren. Ikerketan ondorioztatzen dute, multirresistentzia-profilen eta biruletzia-determinanteen lokalizazioak kromosoman edo plasmidoetan baimentzen dutela lerro ebolutibo desberdinetakoak diren anduien artean taldekatzeak egitea. Baita, lortzen diren taldekatzeak PFGE-aren bitartez egindako taldekatzeekiko erlazio estua erakusten dute. Seinalatzen dute ere, 90eko hamarkadan detektatu zela *S. Typhimurium* DT104 fagotipoko leinua, R-ACSuST tetrarresistentzia profilarekin eta oso hedatuta. Bost erresistentzia determinanteak (pentarresistentzia) *Salmonella*-ren kromosomako SGI-patogenizitate uhartearen parte ziren, 1. klaseko bi integroi duazkala (Guerra *et al.*, 2004). Lehenengo bildumako U302 fagotipoko andui monofasikoetan ikusienez gero, gentamizinarene eta sulfametoxazol-trimetoprima aurkako erresistentziak dituzte. Azken horrek deskribatutako eta detektatutako plasmido berrian agertzen da eta bakarrik bariante monofasikoan aurkituta. Leinu klonal honetan, erresistentzia-determinanteak plasmidoetan aurkitzen dira, 1. motako integroiak ere daramatenak. Datu honek, batetik 4,5,12:i:- bariante monofasikoaren jatorri ebolutibo posiblea *Salmonella* Typhimurium-en aurkitzen dela zehazten du eta bestalde baimentzen digu 1. bildumako isolatu guztien jatorri komunaren alde agertzea erresistentzietako baten galera detektatu izan arren 13 isolatuetan. Plasmidoak bakterioari gehitutako ezaugarriak ematen diote baina ez dira

ezinbestekoak bizirik irauteko edo bakterioaren erreplikazioan zehar. Horregatik, hautatze-presioaren eraginez gal daitezke edo daukaten geneek mutazioak edo delezioak erraztasun handiagoarekin meta ditzakete. Honela, analizatutako *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- eta U302 fagotipoko 60 isolatuetatik 47-k bariante honen berezko erresistentzia-profila erakusten zutela antzeman ondoren eta aipatutako 13 isolatuetatik 9-k erresistentzia bakarreko galera zutela ikusita, baimentzen digu talde honen homogeneousaren alde egotea eta Guerra-k planteatutako teoriaren alde agertzea, non isolatu hauen arteko jatorri hurbil eta komuna, eta lerro ebolutibo eta klonal bereko kideak bezala seinalatuz.

Organismo mota desberdinak espezie baten barruan identifikazeari tipifikazioa deitzen da (Sabat *et al.*, 2013). Espezie bereko isolatu bakteriano desberdinen artean bereizten duten tipifikazioko metodoak, funtsezko erreminta epidemiologikoak dira prebentziorako eta infekzioaren kontrolerako. Fenotipoan oinarritutako tipifikazioko metodo tradizionalak, serotipoa, biotipoa, fagotipoa edo antibiograma bezala, urte askotan zehar erabiliak izan dira. Hala ere, metodo berriagoek maila molekularrean isolatuen artean dagoen erlazioa aztertu dute, zeinek, bakterio mota eta azpimoten artean bereizteko trebetasuna hobetu duen. Nabarmentzekoa da, metodo molekular berrien garapenak erreminta berriez hornitu gaituela agerraldien zaintza eta detekziorako (Sabat *et al.*, 2013). Tipifikazio molekularreko metodo egoki baten aukera, ebatzi nahi den kontuaren eta erabiliko den metodoaren testuinguru epidemiologikoaren mendean dago. Hoberena izango litzateke metodo bakoitzak baztertu ahal izatea hertsiki erlazonatutako anduien artean, euren transmisioa erakusteko. Horrek, garrantzi handikoa da

mikroorganismoaren hedapena ekiditeko estrategiak diseinatzeko. Hala ere, gaurko metodoetako batzuek ez dituzte, egoera guztietan, baldintza guztiak betetzen. Tipifikazioa zainketa jarraiturako ematen denean, aukeratutako metodoak urteetan zehar egonkorak diren emaitzak eskaini behar ditu, infekzioaren kontrolerako neurri eraginkorrak ezartzeko. Gainera, nazioarteko lanetan erabiltzen den tipifikazioko metodo ona, datu-base batera erraz transferi daitezkeen emaitzak produzitu behar izango lituzke eta plataformen edo internet-web-en bitartez eskuratzen errazak ere izan ahal daitezken, eta metodoaren nomenklatura nazioartean estandarizatu behar izango litzateke (Sabat *et al.*, 2013).

Datara arte, *Salmonella*-ren tipifikaziorako erabili den tipifikazio molekularreko metodoa elektroforesia eremu pulsatuko gelean (PFGE) da, zein *Gold standard* teknika bezala kontsideratua den, ordezkatzeko metodoen aukera ugari egon arren (Belkum, 2006.). Urte askotan zehar, PFGE-a erabili da ikerkuntza epidemiologiko ugarietarako arrakasta handiarekin. Teknika honen arrakasta handia errotzen da bere diskriminazio-botere bikainean eta bere konkordantzia epidemiologiko garaian (Sabat *et al.*, 2013). Nahiz eta diskriminazio-botere hau serotipoaren mendean egon, *Salmonella* Typhimurium-en balio altukoa da eta egokia da karakterizaziorako eta 1. bildumako isolatuen arteko dibertsitatea aztertzeko. 33 kb-eko banda txikiagorik kontuan ez hartzeko PulseNet-eko arauari jarraituz, 60 isolatuen DNAREN makroerrestrikzioak mota bakarra (A) sortu zuen. Aipaturiko pultsotipoaren barruan 19 azpimota desberdin zehaztu ziren, 0,89ko Simpson-en diskriminazioaren indizearekin. Lortutako profilen artean, geleko goiko eskualdeak desberdintasunak nekez erakutsi zituen, beraz, profil desberdineko

sailkapena egiteko geleko beheko eskualdean lortutako desberdintasunetan oinarritu zen, 190 kb-eko pisu molekularreko zati txikiagoekin. 60 isolatuak A pultsotipo beraren barruan sailkatu izateak, eta isolatuen % 46,7 bi azpimota handitan elkartuta egotearekin batera, eta 10 urtetan zehar eta estatuaren eskualde ezberdinetatik isolatutako isolatuak izanda, aurkezten duten aldaketa gutxiekin batera argi eta garbi erakusten du *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- U302 fagotipoko andui monofasikoen klonaltasun handia.

Bakterio-genomek eskualde nukleotidiko ugariak dauzkate errepikapenekin DNAREN zonalde kodetzailerik eta ez-kodetzailerik. Errepikapen hauek bata bestearen alboan daudenean eta errepikatzen diren kopurua isolatu batetik bestera aldatzen denean, genomako eskualde hauei kopuru aldakorreko tamden eran errepikatutako *loci*-ak bezala izendatzen dira (VNTR) (Sabat *et al.*, 2013). Azken urtetan, zenbait ikerkuntza-taldeek MLVA izendatutako tipifikazio-teknika berria garatu dute (Lindstedt *et al.* 2003, van Belkum 2006, Laarson *et al.* 2009). MLVA-k bakterio-genomako loci ezberdinetan dauden VNTRen kopurua zehazten du. Tipifikazio-metodo berri hau, garatu da ia garrantzi klinikoko bakterio-espezie guztietarako eta sekuentziazioaren laguntzaz edo laguntza gabe egin daiteke, nahiz eta sekuentziazioak teknikaren ebazpena nabarmen handitzen duela egiaztatuta egon (van Belkum, 2006). Locus espezifikoko DNAREN sekuentziazioaren bitartez errepikapen unitateetan dauden mutazioen kokapena ezar daitezke (Belkum, 2006). Teknika hau deskribatzen den lan ugarietan (van Belkum 1997 a-b, Laarson *et al.* 2009, Sabat *et al.* 2013), egileek MLVA-ren aurreko PFGE-aren konparaketa sakona egiten dute. Aipaturiko ikerketetan MLVA aurkezten da langile gutxiago eta espezifikoagoa den teknika bezala mikroorganismo desberdinen ikerketa



epidemiologikorako, *Salmonella* Typhimurium DT104-ren kasuan bezala (Lindstedt *et al.* 2003 y 2004, Torpdahl *et al.* 2007). Lindstedt *et al.*-ek argitaratutako lanean, 2004an, lortu zuten DT104 fagotipoko anduien arteko diskriminazio handiagoa PFGE-aren teknikaren bitartez baino. Nahiz eta 4,5,12:i:- bariante monofasikorako deskribatutako MLVA-ko inongo protokolorik ez egon, aipatutako artikuluan lortutako konklusioetan oinarrituz eta Echeita *et al.*-ek lortutako (2001) emaitzetan oinarrituz, non *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- eta *Salmonella* Typhimurium DT104 eta U302 fagotipoen arteko erlazio estua frogatzen den, egokia iruditu zitzaigun teknika hau erabiltzea ezohiko serotipoko anduien artean bereizkuntza handiagoa lortzen zen aztertzeke eta espezifikotasun handiagoa bere karakterizazioan, PFGE-aren bitartez baino. Lindstedt *et al.*-ek 2004an *Salmonella* Typhimurium-erako deskribatutako MLVA-protokoloari jarraitzea erabaki zen. Talde daniarrak deskribatutako metodoa aplikatu zen 60 isolatu monofasikoetan, eta kontrol bezala erabilitako beste serotipoetako anduietan. Emaitzek pSLT plasmidoaren absentsia konfirmatu zuten 1. bildumako isolatu guztietan, ez bait zen STTR10pl haslearekin anplifikaziorik lortu. STTR3-ko VNTR-ari buruzko datuak aztertzean, Laarson *et al.*-en gomendioak jarraitu ziren (2009), zeinen lanean antzeman zuten loci honetarako diseinatutako haslea elkarren artean hurbil dauden bi VNTRak anplifikatzen zituztela (Lindstedt *et al.*-ek 2004an deskribatu gabeko datua). Isolatu guztiek errepikapen-kopuru bera erakutsi zituzten, lehen VNTR-rako lau eta bigarren VNTR-rako hamar errepikapen. Isolatu guztiek STTR9-ren kasuan aniztasun urriaren adierazgarria den zati bera eskaini zuten. STTR5-ean, 21 isolatuetan eta 19 isolatuetan tamaina berdineko zati bat erakutsi zuten.

Batera bilduma osoaren % 67a dira, beraz bilduma honen klonaltasunaren hipotesia indartzen duen. STTR6 loci-a aniztasun handiena erakutsi zuena da. Beraz metodoa osatzen duten bost aldagaietako, hiru berdin-berdinak dira isolatu guztietarako, aldaketak bakarrik 5 eta 6 VNTR-etan egonez. Azkenik, 32 profil lortu ziren, 0,97ko SID balioarekin. Emaitza hauek beste talde batzuek ikusitakoen antzekoak dira, zeinekin bat gatozen MLVA-ren datuak PFGE-koak baino diskriminatzaileagoak direla esatean, eta bakterioen genotipifikazioan txandakatu litezkeen (van Belkum *et al.* 1998, Lindstedt *et al.* 2003, Laarson *et al.* 2009, Wuyts *et al.* 2013, Boland *et al.* 2014). PFGE-ko eta MLVA-ko datuek 1. bildumako isolatuen homogeneotasuna frogatzen dute.

Duela gutxi, *Salmonella*-ko 1.400 andui baino gehiagorekin egindako lana argitaratu da, MLVA-ren bideragarritasuna egiaztatzeko (Wuyts *et al.*, 2013). Aipaturiko ikerketan, ikusi zuten VNTR-en erreproduzigarritasun- eta egonkortasun-saiakeran, MLVA-ren teknikan erabilitako bost VNTR-etatik STTR6-a aldakorrena zela eta errepikapen-kopuru desberdina izan zituen andui berean, zeinak denbora-tarte konkretuan zehar zenbait ereinketa-pausuak jasan zituen. Hala ere, STTR6-a ez zen izan errepikapen kopuruaren bariazioa izan zuen VNTR bakarra, saiakera honetan, STTR3-a izan ezik VNTR guztiak errepikapen kopuruaren aldortasuna zuten andui desberdinetan. Horregatik, MLVA-k, PFGE-a edo ATB-a baino diskriminazio botere handiagoa eskaini arren, ikerketaren egileek nabarmentzen dute azpitipifikazio-metodo baten diskriminaziorako ahalmenaz gain, ebaluatutako markatzaileen egonkortasuna kontuan izan behar dela. Wuyts-ek bestalde azpimarratzen du, MLVA-ko loci-etako batzuk ezegonkorak direla erakutsi zuten, azpitipifikaziorako erabiliak diren markatzaile genetiko hauen interpretazioa kontuarekin egin behar dela eta

ereinketa-esperimentu hauek erakusten dute ezin dugula baztertu MLVA profil ezberdina duten isolamenduak, baina hertsiki erlazionatuta daudenak, ez daitezela klonalak izan.

Lortutako datuetan oinarrituz, egiazta dezakegu analizatutako *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- U302 fagotipoko isolatuak beste herrialde batzuetan isolatutako taldeak baino homogeenagoak direla (Soyer *et al.* 2009), bere jatorriaren hipotesia indartuz klon bakarrean. Beraz antibiogramaren (ATB-aren), PFGE-a eta MLVA bitartez burututako isolatu hauen karakterizazioa, seinalatzen du jatorri komuna andui batean edo klon batean. Honek urteen igarotzearekin eta banaketa geografiko zabalean eboluzionatu zuen bere genomaren aldaketa batzuk barneratuz, nahikoak bilduma honetako isolatuak genetikoki bereizi ahal izateko eta haiek 55 anduitan sailkatu ahal izateko. Ezaugarri nagusia erresistentzia anitzeko profila (R-ACSuGSTSxT-etako) izaten jarraitzen du, U302 fagotipoa, PFGE A pulstotipokoa, pSLT plasmidoaren galerarekin eta MLVA patroian VNTR 9 eta 3-erentzako 3 eta 410 aleloekin hurrenez hurren.

2002an gure ikerkuntza-taldeak serotipo honetako hainbat andui bereizi zituen DNAREN mikromatritzeen (*microarray*) teknologiaren bitartez, LT2 *Salmonella* Typhimurium-en genomarekin alderatuta (Garaizar *et al.*, 2002). Ikerketan, Mikrobiologia Zentro Nazionaleko (CNM) lau isolatu erabili ziren, 4,5,12:i:- formula antigenikodunak. Laurek emaitza berak erakutsi zituzten, pSLT plasmidoaren delezio partziala eta bost gene kromosomikoen taldeen delezioak, zeinen artean bigarren faseko flageloaren sintesiaren arduraduna den zonaldearen delezioa zegoen. Gainera, lan honetan *fljAB* operonaren

delezioaren zonaldea PCR-aren bitartez amplifikatu zen eta geroago sekuentziatua izan zen. Aipaturiko sekuentziek lan honen oinarria izan dira. Bertan egiaztatu zenez gero delezionatutako 16 geneko zatian IS26 insertzio-sekuentzia agertzen zela. IS26-a bezalako insertzio-sekuentziak, DNAREN segidak dira DNATik banatzeko ahalmenarekin eta zelulen artean edo DNAko molekulen artean migratzeko ahalmenarekin. Ez diote **izaera** fenotipikorik ematen bakterioari eta insertzio-sekuentzien artean egitura-aldaketa asko daude, baina normalean muturretan alderantzikatutako errepikapenak izatea dute ezaugarri bereizgarri moduan. Insertzio-sekuentzia askok transposasa bat eta bere erregulazioa kodetzen duten geneak dituzte. Genomaren zati mugikorrek izatetik, delezioak, bikoizketak, inbertsioak, etab. eragin ditzakete, azken finean genomaren aldaketak, mikroorganismoen arteko geneen transferentzia horizontalerako garrantzi nabarmenekoak. IS26 insertzio-sekuentzia bakterio ugurietan aurkitzen da, baina *Salmonella Typhimurium* U302 fagotipoan 84,5 kb-eko plasmidoa dago pU302L izenekoa, non insertzio-sekuentzia honen bost kopia aurkitzen diren (Chen *et al.*, 2007). Horregatik da Barton *et al.*-ek deskribatutako teknika burutu zela, (1995), tamaina handiko plasmidoen lorpenerako, PFGE-S1-a. Teknika burutu zen 1. bildumako 11 isolatuekin, zeintzuek *fljB* genetik hurbil dauden geneen delezio desberdinak aurkezteagatik aukeratu ziren. Lortutako emaitzek erakutsi zuten aztertutako 11 isolatuetan tamaina handiko plasmido bat aurkitzen zela, txikiena 125kb-etakoa eta handiena 180kb-etakoa izanez. Geroago egiaztatu zen hibridazioaren bitartez, IS26 sekuentziaren detekzioarako espezifikoki egindako zunda batekin, isolatuetan detektatutako tamaina handiko plasmido guztietan, IS26 sekuentzia zegoela, transposizio erreplikatioaren seinale izan litekeen (Turlan y Chandler

1995). Aipatu beharra dago, delezioaren karakterizazioan lortutako sekuentzien analisisian zehar, isolatu monofasikoetan 14 bp-eko sekuentzia motza detektatu zen (5'- AAG XCG CTX TGA AT -3') STM2758 genearen hondarretan. Sekuentzia hau delezioaren 5' muturraren albokoa da (STM2758 genearen 85 nukleotidotik 99-ra). 14 nukleotido hauek IS26 insertzio-sekuentziare hasiera ematen diote, 1. bilduman deskribatutako delezio guztietan. Jakinguraz, Chen *et al.*-ek deskribatutako pU302L plasmidoan, IS26-ren 3. kopiaren amaieraren ostean 14 nukleotido hautzat osagarria zen (3 *mismatch*-ekin) sekuentzia detektatu zen, hala ere sekuentzia honek homologoa zen ere R46 edo pSTMDT12\_L bezalako Typhimurium-en beste plasmido batzuetan. Sekuentzia motz honetako presentziak insertzio-sekuentziaren txertaketa lekua kontserbatuta egotearen arrazoia izan lezake, eta lau delezio-motetan IS26-a hasiera-posizio berean txertatu izateak. Hala ere, delezioaren amaierako nukleotidoen sekuentzien analisiak ez zuen inongo homologiarik erakutsi IS26-aren beste muturrarekin. Honek plazaratzen du beraz berrordenamenduak hasierako transposizioarekin erlazionatuta egon daitezkeela edo beste IS26-elementuen birkonbinazioaren seinale izatea. Cooper *et al.*-en eta Schneider *et al.*-en arabera gertaera genetiko desberdin hauek (transposizio eta birkonbinazio) aldi berean edo elkarren segidan gerta litezke. Eskualde hau delezioetarako itu-zona izatearen mekanismoa ezezaguna izaten jarraitzen du. Hala ere, posiblea da bigarren faseko flageloaren zona hau insertzioetarako puntu-beroak izatea IS26 sekuentzien bidezkoak.

Laburtuz, 1. bildumako *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- anduietan aurkitutako plasmidoa, pU302L plasmidoa izan liteke, baina IS26-aren banaketa zabala *Salmonella* Typhimurium-ean dela eta, honen baieztapena

detektatutako plasmidoaren azterketa sakonagoaren beharra dauka. Esparru honetan, garrantzi handikoa da Patricia García Fernández-en doktorego-tesian lortutako konklusioa, non proposatzen duen andui hauen arbaso probableena bezala pUO-STmRV1 plasmidodun anduia, non IS26-aren 10 kopia dauden eta plasmido hura ere ikerketa-taldeaz deskribatua izan zela aldeztu aurretik isolamendu mota hauen erresistentzia anitzen eragilea bezala (Guerra et al., 2004). Dena den, ezin izan da baieztatu 14 nukleotidoetako sekuentziaren osagarria den sekuentziarik pUO-STmRV1 plasmidoan dagoen edo ez.

IS26 insertzio-sekuentzia, 820 bp-ko luzera dauka eta bere osotasunean ordezkatu ditu U302 fagotipoko 4,5,12:i- barianteko isolatu guztietan delezionatutako geneak. Emaiza hauek egiaztatu ziren delezioaren bi muturren amplifikazioaren bitartez. Lehen zatia delezioa hasten den STM2758 genetik igarotzen da IS26 insertzio-sekuentziaren erdira arte. Zati hau 1. bildumako isolatu monofasiko guztietan 705 bp-ekoa da, hasle hauek (4512F eta 4512R) erabilgarritasun handia izan dezakete bariante monofasiko honen detekzio azkarrerako (Álvarez *et al.* 2004). Bigarren zatia, tamaina handiagokoa eta aldakorra da. IS26 sekuentziaren erdialdetik hasita, delezioaren amaierara arte. Amaiera muturraren kokapena aldakorra da eta 4 aldaera lortu ziren (1.ΔfljAB1, 1.ΔfljAB2, 1.ΔfljAB3 eta 1.ΔfljAB4). Lehenengo bi motak bakarrik delezioaren tamainan desberdintzen ziren, *iroB* genearen delezioan 232 bp-eko desberdintasunarekin, 1.ΔfljAB1 mota (52 isolatu) eta 1.ΔfljAB2 mota (5 isolatu) bildumaren % 95a osatzen zuten. Hirugarren mota (1.ΔfljAB3) delezio handiagoa erakutsi zuen, non *iroB* genea guztiz delezionatuta zegoen eta *iroC* genea partzialki (236 pb) (2 isolatu). Hala ere, 4. motaren karakterizazioak amplifikazio gehiago behar izan zituen, delezioaren amaiera STM2814 genean

aurkitzeko. Horrela mota honetan dagoen andui bakarra 1.Δ*fljAB4* motan sailkatuz. Laburbilduz, IS26 insertzio-sekuentziak 4 delezio motak eragin zituen, STM2758 genearen 99. bp-an txertatzean eta 4 puntu ezberdinetan amaitu zuen txertaketa, *iroB* (STM2773) eta *emrA* geneen (STM2814) artean. Sekuentziak eskuragarria daude NCBI-aren zerbitzuan, GenBank-en (GQ402163.1, GQ402164.1, GU939595.1 y HM595411). Bigarren hasle-bikote honekin lortutako aniztasunagatik (IS26-3F, 2774-2R), serotipo honen anduien bereizkuntzarako markazaile epidemiologiko bikaina bezala proposatzen dugu, baina ez detekzio azkarrerako lehen hasle-bikotearen kasuan gertatzen den bezala.

*Salmonella* generoan, maila molekularra doitutako mekanismo paregabea dago, bi gene flagelarren adierazpenaren txandaketa baimentzen duena, *fljC* eta *fljB*. *FljB* genearen adierazpenak *fljC* geneak kodetutako flageloaren adierazpena galarazten du. Bi antígeno flagelarrak historikoki, “faseak” bezala izendatuak izan ziren eta bi flagelo-motak aurkezten zuten anduei bifasikoak deitu zitzairen. Aurretik plazaratutako lanetan (Burnens *et al.* 1996, Garaizar *et al.* 2002), serotipo honen jatorria azalduko luketen bi teoria formulatu dira, zeinen artean, *Salmonella*-ko andui monofasikoak bifasikoen arbasoa izan litezkeen edo bestalde, bifasikoen mutante bat izan litezkeen bigarren antígeno flagelarra adierazteko trebetasuna galdu dutenak. Lortutako emaitzekin egiazta dezakegu *fljAB* operonaren hainbat geneen delezioa IS26 sekuentziaren txertatzearen emaitza dela. Beraz, planteatutako hipotesia sostengatuz, gertaera hau andui batean gertatu zela ondorioztatzen dugu, bifasikoa, *Salmonella* Typhimurium U302 fagotipokoa, pU302L plasmidoarekin eta R-ACSSuT-a erresistentzia profilarekin, zeinek, IS26

insertzio-sekuentziaren birkokapena baimenduz, eboluzionatu zuen. Aitzitik, 1.ΔfljAB1 delezioa beste 3 moten jatorria izan litekeen edo egiaztatzeko ikerketa gehiago beharrezkoak izango lirateke, lau gertaera genetikoak era independentean agertu ziren zehazteko.

*Salmonella enterica* 4,5,12:i:- bariante monofasikoaren agerpena, frogatu zuen bere arrakasta ebolutiboa, herrialde ugarietan pertsonengan isolatutako serotipo nagusien batean bihurtzerakoan (EFSA, 2010). Espainian, 1. bilduman karakterizatutako anduien agerpenaren eta 1998an izan zuten hedapen azkarraren ondoren eta 2006ko jaitsieraren ondoren, beste bariante monofasikoaren agerpena detektatu zen, zeinek hainbat desberdintasun aurkezten zituen aurretik deskribatutako bariante monofasikoarekin. 2000. urtetik artikulu desberdinak argitaratu dira, tetraerresistenzia profiladun (R-ASSuT-etako) bariante monofasikoa deskribatuz, zeinen formula antigenikoa (4,[5],12:i:-a), aldakorra zen O5 antigeno somatikoaren presentziari dagokionez, eta fagotipoa ez zen U302a eta gainera aldakorra zen (195 104b, 18, 193, 7, 138...). Elikadura-Segurtasuneko Agentzia Europarrak idatzitako iritzi zientifikoan jasotzen den moduan (EFSA, 2010), bariante honek banaketa geografiko handiagoa aurkezten du klon espainiar deitutakoa baino. Gainera, iritzian, lerro ebolutibo desberdinak daudela zehazten du eta bigarren faseko flageloaren galerak ez zuen *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:i:- bariantearen agerpena eta munduan zeharreko hedapena galarazi, baina hala ere ez zuten bereizi bariante multirresistentearen (1. bilduma) eta bariante tetrarresistentearen (2. bilduma) artean.



Flageloa (H antigenoa), *Salmonella* Typhimurium-en azalean kokatuta birulentzia faktore bezala karakterizatua izan da, zeinak bakterioari mugitzen eta zelula ostalariei atxikitzen laguntzen dion (Lockman eta 1990 Curtis). Hala ere, Lockman-ek eta Curtis-ek ondorioztatzen dute *Tn10* transposasaren insertzio independenteak flageloaren sintesiarekin eta higikortasunarekin erlazionatutako gene desberdinetan, ez dutela eragin *Salmonella* Typhimurium-en birulentzian saguengan, beraz proposatzen dute higikortasuna garrantzirik gabekoa izan daitekeela birulentzia faktore bezala zelula barneko patogeno hautakor eta inbaditzaile honetarako.

2010ean, Hopkins *et al.*-ek, *S.* Typhimurium 4,[5],12:i:- andui monofasikoen isolatuen gehikuntza ikusi zuten anpizilinarekin, estreptomizinarekin, sulfonamidarekin eta tetraziklinarekin (R-ASSuT-aren) aurkako erresistentziarekin. Igoera hau bera beste herri europar batzuetan eta Espainian ere ikusi zen. Horregatik *Salmonella enterica* 4[5]12:i:- isolatu monofasikoekin ikerketa bat burutzea erabaki zen, 13 isolatu monofasikoen bildumarekin, LNRS-ean detektatutako ohikoenekin: 18 104b, 193, 195, 138 eta 7. Ikerketaren amaieran, handitu zuen bilduma 215 isolatuetara arte, lagin handiagoa aztertzeko eta isolatu monofasiko tetraerresistenteen populazioan detektatuako delezioaren prebalentziaren ideia izateko diseinatutako hasle espezifikoekin bitartez.

Bilduma honetan hasi zen lehen aipatutako 13 isolatuekin, PFGE-teknika berak eta 1. bilduman deskribatutako MLVA-k aplikatu zitzaizkien. PFGE-ren kasuan profilen arteko desberdintasunek 4 desberdintasun-banda baino gehiago erakutsi zituzten beraz guztira 10 profil desberdin lortu ziren,

0,97ko SID balioa kalkulatu zen. Profilen barruan aurkitutako azpimota desberdinak elkartu ziren, 3 pulсотipos desberdinetan (A, B eta C). MLVA-ren kasuan guztira 11 patroi desberdin lortu zituzten. Oraingo honetan MLVA-k errepikapen-aldiera zabala erakutsi zuen teknika osatzen duten 5 VNTR-etan. Isolatuena % 23tan lortu zen 10pl VNTR-eko anplifikazioa, zein pSLT plasmidoan aurkitzen dena eta 1. bilduman ez zena detektatu, bi bildumen artean eta beraz, bi barianteen artean dagoen desberdintasuna berriro nabarmenduz. Gainerako errepikapenei dagokionez, bi bildumen arteko desberdintasunak oso adierazgarriak izan ziren eta isolatuena arteko heterogeneotasun handiagoa erakutsi zuten, 1. bildumako anduiekin konparatuz. Beraz, kasu honetan MLVA-tik lortutako datuak erabilgarritasun handiagokoak izan ziren bi bildumen arteko bereizketan eta bigarren talde honen karakterizazioan. Bigarren bilduma honen karakterizazioan burututako teknikei esker, egiaztatu ahal izan dugu tetrarresistentzia-profila duten andui monofasikoek, ATB-rako, PFGE-rako eta MLVA-rako profiletan, aldakortasun handiagoa erakusten dutela. Bestalde, bigarren bilduma honetan isolatuena aukeraketa irizpidea tetrarresistentzia-profilean oinarritu zen bakarrik eta ez guztiak fagotipo bera izatean, irizpideak horiek lehenengo bilduman kontuan izan zirelarik, multirresistentzia eta U302 fagotipokoak bait ziren guztiak. Bigarren bilduma honetan, 13 isolatuetatik 11 PFGE-profil desberdin antzeman ziren eta PFGE bera erakutsi zuten isolatuena bi bikoteen artean, bakarrik bikote batek erakutsi zuen MLVA-patroi bera. Beraz egiazta dezakegu 2. bildumako lehen 13 isolatuena artean genetikoki diferentziagarriak diren 12 andui kontabilizatu ziren, gure estatuan tetrarresistenteak diren anduena

heterogeneotasuna seinalatzen duen datua. Ondoren jasotako datuek informazio osagarria eskaini zioten karakterizazio honi.

*FljB* genearen delezioan parte hartutako gertaera genetikoaren ikerketan, zona honetako presentzia/absentzia mapa bat egin zen, STM2692 geneen eta STM2775-en artean. Honela elkartu ziren 13 isolatuak 5 delezio-motetan eta mota hauen artean aldaerak ere detektatu ziren. Ondoren, delezio-mota bakoitzerako espezifikoak ziren 5 hasle-bikoteen bitartez, 5 delezio-motetatik 4ren hasiera eta amaiera muturrak zehaztu ahal izan ziren, eta era berean, delezio bakoitzean insertzio ezberdinak zeudela ikusi zen. 2009an, Soyer *et al.*-ek argitaratutako ikerketan gure bilduman detektatu eta  $2.\Delta fljAB1$  bezala izendatutako oso delezio antzekoa aurkezten zuten. Bi lanetan, delezioak eragiten die *hin* genearen aurreko 77 generi. Gure kasuan delezioaren lekuan sartutako zatia 5.654 bp-ekoa da, Soyer-ek deskribatutako 7 kb-eko fragmentuarekin konparatuz. Guk sekuentziatutako 5.654 nukleotidoetako zati hau osagarria da Estatu Batuetako *Salmonella* Typhimurium 08-1736 anduiaren bi sekuentziekin eta zeinen genoma oraintsu argitaratu dena. Fragmentuaren azterketa eta konparaketa erakutsi zuen hasierako zatia 08-1736 anduiarekin osagarria zena, 5 proteina kodetzen zituen Gyfsi-2 eta Fels-2 profagoei zegozkien, eta haien artean UmuC proteina zegoen, Soyer *et al.*-ek deskribatutakoa. Fragmentuaren bigarren partea ere 08-1736 anduiarekin bat zetorrela, DNA-inbertasa batekin erlazionatuta zegoen, buztanaren sintesiarekin lotuta zegoena (*tail protein*). Soyer *et al.*-en lanean lehenengo zatiari “STM1053-1997 eskualdea” izena ematen diote. Hala ere bi taldeen arteko desberdintasun txikiak antzematen ditugu, hasiera batean txertatutako fragmentuaren luzerari dagokionez, eta bigarren lekuan, identifikatutako

sekuentziei dagokionez, zeren eta andui amerikarretan Soyer-ek STM2704 genearen delezio partziala seinalatzen du “STM1053-1997 eskualdearen” hasieran eta gure bilduman STM2704 genea osorik zegoen, deleziorik gabe eta beraren alboan, STM2703, STM2705 eta STM2706 geneen sekuentzia partzialak detektatu ziren. Ikerketa honetan ATB, PFGE, MLVA, PCR eta sekuentziazioaren bidez 3 anduietan sailkatutako 4 isolatuetan antzemandako desberdintasunetan oinarrituz, ondorioztatzen dugu, Espainian delezio mota honekin detektatutako anduiak Soyer-ek deskribatutako andui amerikarrekin lerro ebolutibo komuna osatu lezakete. Beraz, kasu honetan insertzio eta ondoko delezio prozesuak era berean gertatuko ziren eta urteen joan etorriarekin dibergentzia ebolutiboak pairatuko zuten detektatutako fragmentuaren berrantolamenduen eta aldaketen bidez, baina delezioaren amaiera eta hasiera mantenduz.

Soyer *et al.*-en, 2009ko ikerketan ondorioztatzen da, 4,[5],12:i:- andui monofasikoak klon anitzak direla eta gertaera independenteen bidez agertu ziren banaketa geografiko desberdinekin. Gure datuek hipotesi hau sostengatzen dute eta Soyer-ek emandako informazioa andui monofasiko espainiarrei buruz zabaltzen dute, zeren eta 1. bildumako anduiek klon bera osatzen dutela egiaztatu ahal izan dugunez gero, eta geroago 2. bildumako anduien artean, 2.  $\Delta$ fljAB1 delezio-motakoak izango lirakeke Estatu Batuetako anduien lerro ebolutibo bera. Orduan, *Salmonella* Typhimurium tetrarresistenteen andui monofasikoen arteko 2. lerro ebolutiboa osatuko lukete.

Doktorego-tesi honetan zehar, 2. $\Delta$ fljAB2 motako delezioa karakterizatu ahal izan zen delezio-mota hau aurkezten zuten hiru isolatuen genomaren

sekuentziazioari esker. Karakterizazio molekularrerako metodo konbentzionalatik aldenduz, genoma osoaren sekuentziazioak (*whole genome sequencing*, WGS) potentziala du genoma desberdinak nukleotido bakarreko ezberdintasunarekin konparatzeko (Sabat *et al.*, 2013). Honek beharrezko karakterizazioa baimenduko luke transmisio gertaeretan eta agerraldietan, baita lan honetan gertatu den bezala, PCR-aren bitartez lortutako datuen berrespenean, ere. PCR-aren bitartez 2.Δ*fljAB2* delezio-mota hau zuten 2 isolatueta *hin* genearen amplifikaziorik lortu ez izan arren, genoma osoaren sekuentziazioari esker egiaztatu zen presente zegoela, baina IS26 sekuentziaren hainbat insertzio genearen erdian aurkezteagatik partzialki delezionatuta zegoen. Bestalde, sekuentziatutako hirugarren isolatuaren kasuan (1536/08), PCR konbentzionalaren bidez ez zuen erakutsi inongo deleziorik, geroago, bere genomaren sekuentziazioan emaitza hauek egiaztatu ziren. Batetik, *hin* genean eman diren insertzio hauek genearen amplifikazioari PCR-aren bitartez eragin diotela egiaztatu dezakegu eta eragin dute ere *fljB* geneak kodetutako bigarren faseko flageloaren adierazpenean. Hin geneko recombinaesak ez kodetzerakoan ez du *fljBA* operonaren sustatzailearen inbertsioa katalizatzen eta *fljB* eta *fljA* geneko kodifikazioa oztopatzen da, eta beraz *fliC* geneko errepresioegilea ez da kodetzen, lehen faseko flageloaren adierazpena erraztuz. Lortutako sekuentzien analisiak erakutsi zuen nahiz eta IS26-a *hin-iroB* zona intergenikoaren aurrean egon (*iroB* genetik 344 bp-etara) ere, IS26-ren kopia-kopurua desberdina zen haien artean. Horrela lehen isolatuan hau izan zen detektatutako IS26 bakarra, bigarren isolatuan detektatu ziren gutxienez bi IS26 *hin* genearen azken 33 nukleotidoak delezionatuz, eta hirugarrenean IS26-ren 3 kopia gutxienez antzeman ziren, haietako bi *hin* genearen erdian eta azkena zona intergenikoan.

Sekuentziatutako lehen isolatuan (1536/08), *fljBA* operonaren gene guztiak detektatu ziren eta batek ere ez zuen aurkezten bere sekuentzian inongo aldaketarik, detektatutako mutazio bakarra IS26-aren txertatzea izan zen *hin-iroB* zona intergenikoan. Kasu honetan, lortutako emaitzek ez dute fenotipo monofasikoaren inongo azalpenik eskaini. Antzemandako anormaltasun bakarra *hin* genearen ondorengo zona intergenikoan emandako txertatzea izan zen, beraz, ikerketa gehiago beharrezkoak dira ezagutzeko ea IS26-aren txertatze bakar horrek zona ez kodetzailean, benetan eragina izan dezakeen bigarren faseko flageloaren adierazpenean. Lan honetan ondorioztatzen dugu zonalde horrek transposizioaren edo txertatze desberdinen ekitaldietarako zona beroa dela.

Kasu honi dagokionez, Boland *et al.* -ek oraintsu argitaratutako (2014) lanean, 4,[5]:i- bezala serotipatutako 253 anduien ikerketa aurkezten da, bigarren faseko flageloaren delezioarekin. Hala ere PCR bat egin zitzaizen *fljB* genearen delezioa egiaztatzeko eta 59 anduietan (% 23,3tako) anplifikazioa positiboa izan zen, genearen presentzia frogatuz. Aipaturiko lanean ez zuten sekuentziatu *fljAB* operona osatzen duten gainerako geneak, beraz ezin izan zuten gure kasuan bezala *fljAB* operoneko IS26-ren insertzioak detektatzea, eta insertzio hauek bigarren faseko flageloaren adierazpenaren oztopatzean eragin dutelarik. Hala ere, ikerketan ondorioztatzen dute *fljB* genearen presentzia animaliangandik isolatutako andui monofasikoetan (% 43tatik) pertsonengandik (% 5etatik) datorren laginetan baino handiagoa dela. Gure anduiak isolamendu klinikoetatik datozela kontuan izanez azal dezake lan honen 4 bildumen artean bakarrik 3 andui monofasiko detektatzea *fljB* genearen presentziarekin.

Hiru isolatuen arteko desberdintasun genetikoak ikusita, zehaz dezakegu haietako bakoitza genetikoki diferentziagarria den anduiak direla eta lau desberdintasun-zati baino gehiagorekiko PFGE-etako profilak dute eta MLVA teknika osatzen duten bost markagailuetatik hiru desberdinak dute. Bigarren faseko flageloaren formula antigeniko-erreakzioan detektatutako absentsia, eta ikerketan zehar oso antzeko emaitzak lortu direla ikusita, hiru andui hauek hertsiki erlazionatuta daudela ondoriozta dezakegu eta jatorri komun hurbilagoa izan lezakete 1. eta 2. bildumetako gainerako anduiekin konparatuz.

2.ΔfljAB3 delezioarekin sailkatutako isolatuek *iroB* genearen aurreko 14 generen absentsia aurkezten zuten. Delezioa kasu honetan puntu berean bukatzen zen baina hasten bi zona desberdinetan zen (2.ΔfljAB3-A, 2.ΔfljAB3-B), bi kasuetan IS26-kopia bateko txertatzeak delezioa sortu zuen. Lucarelli *et al.* -k 2012an argitaratutako ikerketan, deskribatzen dute antzeko tamainako delezioa. Hala ere bi IS26-kopiako presentzia antzeko anduian antzeman zuten, tetraerresistenteak eta monofasikoak. Ikerketan ondorioztatzen dute IS26-a bezalako insertzio-sekuentziek genomako leku desberdinetan txertatzea direla binaka, baina sekuentziak haien artean pixkat urrunduta. Aitzitik 2.ΔfljAB3 delezioan bakarrik IS26 bat detektatu genuen, beraz, bi sartu ziren eta bat geroago alde egin zuen, edo prozesuak lehenengo IS26 bateko txertatzea behar du, ondoren bigarren IS26 bat sartzeko, edo 2.ΔfljAB2 delezioan gertatu den bezala guztira 3 kopia txertatzea. Delezio-mota honen karakterizaziorako diseinatutako hasleen bitartez, 2. bildumako 215 isoltuetatik 28 isolatu detektatu ziren delezio honekin. Honela estatuan, 2.ΔfljAB3-B delezioa A aldaera baino ohikoagoa dela egiaztatu ahal izan genuen, 28 isolatuetatik 26tan aurkeztuz. ATB-ko, PFGE-ko, MLVA-ko eta delezio-motako emaitzak ikusita,

3 isolatuek andui bana izango lirateke, zeintzuek arbaso komuna partekatuko lukete.

2.ΔfljAB4 delezio-motaren ezaugarri nagusia IS1 baten presentzia da partzialki delezionatuta dagoena, IS26 txertatzearen ondorioz. Delezio-mota hau aztertutako 215 isolatuetatik, batean antzeman zen soilik, zeinek mota honen beherezko prebalentziaren seinale dela. Prebalentzia baxua azaltzeko planteatutako hipotesia, bi ekitaldi genetiko independente, denboran bakanduta, gerta daitezelaen beharra da. Lehenengo IS1-a sartuko litzateke, eta geroago IS26 sekuentzia txertatzean delezionatuko zuen partzialki IS1-a. Gertaera hauek oraintsu gertatu balira, bariante honek ez zuen denbora nahikorik izango hedatzeko, baina aldaketa hauek lan honetan detektatu ez diren beste aldaketekin gertatuko balira, zeintzuek desabantaila ebolutiboa ekarri zuten andui honetarako, prebalentzia baxuaren arrazoia azalduko luke.

Azkenik, 2.ΔfljAB5 delezio-mota 215 isolatuetatik 12 isolatuetan detektatu zen. Mota honen ezaugarri nagusia 7.663 bp-eko zati baten insertzioa zen STM2761 eta *iroB* geneen artean, 3 insertzio-sekuentzia ezberdinekin, tetraziklinaren aurkako erresistentziaematen duen geneekin eta zehaztu gabeko beste proteinen sekuentziekin. Chalmers *et al.*-ek 2000an argitaratutako lanean, 9.147 bp-eko Tn10 transposona sekuentziatu zen eta bereizi ziren bederlatzi ORF, datu-baseetako hainbat sekuentzietarako homologiarekin. Bederlatzietako, hiru ezezagunak ziren eta izendatu zuten *jemA*, *jemB*, eta *jemC* bezala, 2.ΔfljAB5 motan agertzen direnak. *Salmonella* Typhimurium-en PSRC27-H plasmidoan eta *Salmonella* Typhimurium-en (T000240 anduiaren) andui bateko genomak deskribatutako antzeko konposizio genetikoak emanda, pentsatzen



dugu IS1 insertzio-sekuentzia bat sartuko zela T000240 anduian eta detektatu diren geneak harekin eramaten. Geroago IS10 sekuentziak, seguraski pSRC27-Ha plasmidoan aurkituta, ezagutuko zuen *tetA*, *tetR* eta *jemC* geneetako sekuentzia bertan txertatuz eta zehaztutako gabeko eta T000240 anduian deskribatutako proteinaren zati bat delezionatuz, eta berarekin *jemB* eta *jemA* geneak eta IS10 sekuentzia sartuz. IS26 insertzio-sekuentzia sartuko zen genomako zona bero honeta, partzialki delezionatuz IS10 sekuentzia. IS26 2.ΔfljAB3 delezioan, 2.ΔfljAB4-an eta 2.ΔfljAB5-ean *hin-iroB* geneen arteko eskualde intergenikoko nukleotido berean amaitu izanak, eta 2.ΔfljAB2 delezioan agertzen den zonatik hurbil egonda, gertaera genetiko hauetarako zona beroa edo genomako itu-puntua dela seinalatzen du. Azken delezio-mota hau detektatzeko hasleen bitartez, 2008 eta 2010 urteetako 12 isolatu detektatu ziren guztira, gainera txertatutako fragmentuaren berezitasunak bide, delezio-mota honen hedapen klonala iradokitzen dute.

Azken finean, *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- U302 fagotipo eta erresistentzia anitzetako lehen lerro klonaleko existentzia planteatzeak baimentzen du, bigarren lerroa *Salmonella enterica* 4[5]12:i:- PNR eta R-ASuST-a erresistentzia profilarekin, C pultsotipoarekin eta *hin* genearen aurreko 77 generen delezioarekin, eta zeinen jatorria Estatu Batuetako anduiekin partekatuko luketen, eta beste lau lerro ebolutibo gehiago, bigarren bilduman bereizitako beste lau delezio-moota bakoitzagatiko lerro bana. Azken lau hauek haien artean, elkarrengandik estuago lotuta egongo lirateke hasieran deskribatutako bi lerroekin konparatuta.

Urteetan zehar, transposonen genesiaren jatorria azaltzen duten ereduak oso eztabaidatuta izan dira IS elementuen alderantzikatutako sekuentziei dagokionez, baita ere mekanismo hauen inplikazio ebolutiboari dagokionez (Iida *et al.*, 1981). Halling-ek eta Kleckner-ek 1982an argitaratutako ikerketan, esaten zen Tn10 transposona hainbat lekutan sartzen zela bakterioen kromosoman, baina ahal zuenean hotspots zehatzetan sartzen zen (puntu beroetan). Gaurko lanean aurkezten ditugu bigarren antigeno flagelarraren gene desberdinak delezionatzeko insertzio-sekuentzien ahalmena eta berrordenamenduak eta gene-txertatzeak eragiteko gaitasuna. Insertzio hauek hasiera eman diote *Salmonella* Typhimurium-en anduien eboluzioari, andui monofasikoko abaniko zabala lortuz eta genomaren sartutako gene desberdinekin normalean *Salmonella* Typhimurium-en plasmidoetan aurkitzen diren.

Aurkeztutako lanean islatzen da insertzio-sekuentziak bakterioen eboluzioan jokatzen duten paper garrantzitsua. Bereziki kasu honetan aldaketa hauek ez dute desabantaila ebolutiborik ekarri bakterio honi, munduko herri desberdineko pazienteengan isolatuak izan direlako eta kasuetako gehikuntza nabarmena detektatu delako. Hala ere, ez dago argi IS26 insertzio-sekuentziak jokatzen duten papera andui-mota hauetan, U302 fagotipoko andui monofasikoetan puntu zehatza ezagutzen dutela dirudenez gero (Laorden *et al.*, 2010) STM2758 genean, baina 2. bilduman lortutako datuetan ikusi den bezala, ere *hin-iroB* geneen arteko eskualde intergenikoan beste puntu espezifiko bat ezagutzen du. Honek *fljBA* operonean gutxienez bi puntu beroen presentzia planteatzen du, non urteetan zehar *Salmonella* Typhimurium-en genomako zona zehatz honetan emandako insertzioen, delezioen eta berrantolaketa genetikoaren arrazoi izan den. Bestalde antzeko ezaugarriekin anduiak detektatu dira eta

herrialde ugari lanetan argitaratu dira, baina delezioaren arrazoia ez da zehaztu, beraz doktorego-tesi honetan deskribatutako arrazoi berengatik sor zitezkeen edo beste arrazoi batzuegatik. Horregatik guztiagatik, Salmonella-ko itu-puntu honen eta gertaera hauen maiztasunaren ikerketa interes handikoa izan liteke.

Beraz, iradokitzen dugu insertzio-sekuentziak Salmonella Typhimurium-en andui monofasikoen agerpena eragin dutela, baina ez dira izan Estatu Batuetako *Salmonella* Typhimurium-en andui monofasikoen jatorri nagusia, azken honetan inongo IS-rik ez detektatzean. Ikerketa gehiago garrantzitsuak izango lirateke sekeuntzia-mota honen txertatze mekanismoa zehaztu ahal izateko eta IS26 sekuentziena bereziki.

Bestalde eta lehen esan den bezala, mutazioek eboluzioaren erreminta gako bezala, populazio batzuegako aldaketak eragin ditzakete bariante berriak agertuz, baina bakterio berriari abantaila eza desabantaila ebolutiboa eskaintzean, ez da hedapen ezta isolatuen kopuruaren gehikuntza izugarria eman eta horregatik oraindik ez dira detektatu. Halakoa da doktorego-tesi lan honetan aztertutako beste bi bariante monofasikoren kasua, zeinetan sartzen dira bariante monofasikoko bi bilduma nahiz eta gure herrialdeko giza salmonellosiren kasuetan maiztasun txikiarekin isolatuak izan arren, bigarren faseko flageloaren delezioaren arrazoia detektatzeko eta bere jatorri ebolutibo posiblea egiaztatzea saiatur bi bilduma hauek arreta handiagorekin aztertzea erabaki genuen.

*Salmonella* Paratyphi B *S.* Paratyphi A eta C-rekin batera elkartzen da *Salmonella* paratifoideoen barruan, zeinek sukar paratifoidea eragiten duten. Bere detekzioa eta kasuen informazioa betetzekoa da bere patogenizitatea dela eta. *Salmonella* Paratyphi B-ren barruan **aldaera** bat ezagutzen da Java izenekoa eta d-tartrato-a metabolizatzekeo (dT +) ahalmena dauka beste ezaugarri batzuen artean eta pertsonentzat d-tartrato-a metabolizatzen ez duen (dT-) aldaera baino birulentzia baxiagokoa da. Nahiz eta gehienetan kasu gastrointestinalak izan, infekzio erasotzailearen kasuak pertsonengan detektatu izan dira (Denny *et al.*, 2007). *S.* Paratyphi B (DT+) organismo konplexua da eta genetikoki desberdinak diren lerro klonal kopuru zabala barneratzen ditu (Denny *et al.*, 2007). Azken urteetan, bi lerro klonal eta antimikrobianoen aurkako erresistentziarekin karakterizatu dira eta geografikoki oso zabalduak daude. Haietako bat maiz detektatzen da Herbehereetako hegazti-ustiapeneko ukuiluetan, eta 2000-2004 urteen artean infekzioetako kausa nagusien bat izan zen herri honetatik datorren esportazioen ondorioz hainbat herri europarretako pertsonengan (Denny *et al.*, 2007). Bigarren lerro klonala, *Salmonella*-ko SGII uharte-genomikoa edukitzea bereizgarri izanda, zabal banatu da mundu guztian. Gehienetan andui hauek aurkezten dute anpizilina-ren, kloranfenikol-aren, estreptomizina-ren, espektinomizina-ren, sulfonamida-ren eta tetraziklinaren aurkako erresistentzia eta erlazionatu ohi dira akuarioekin eta akuario partikularretako arrain tropikalekin (Denny *et al.*, 2007). Azken urteetan hainbat lan argitaratu dira *S.* Paratyphi B (dT+)-rengatiko salmonellosiren kasuen igoera bati buruz informatzen. Bereziki umeengan, zeinen artean arrain tropikalak edo dortokak aurkitzen duten maskota desberdinekiko kontaktuaren ondorio bezala (Musto *et al.* 2006, Harris *et al.* 2009, Hernández *et al.* 2012).

Nabarmentzekoa da dortokak salmentarako debekatu zirela 1975an FDA-gatik dotokekin erlazionatutako salmonelosien kopurua txikiagotzeko (Harris *et al.*, 2009), 2001-2006ren artean hala ere, maskota bezala erabilitako dortoken kopuruak Estatu Batuetan % 86 handitu zen. Geroago, 2007an, CDC informatu zuen salmonellosietako agerraldi garrantzitsu bati buruz, Europan zehar hedatuta, Java biotipoakeraginda, maskota-dendetan erositako dotokekiko lotua. Azken urteetan, hazkuntza baserrietan *Salmonella* dortokengandik eta urmaeletatik kanporatzeko, antibiotikoez abusatu da, *Salmonella* Paratyphi B-ren andui erresistenteen agerpena bultzatuz (CDC, 2008). CDC gomendioak eman ditu *Salmonella*-ren kutsatzea narrastiengandik ekiditeko arrakasta askorik gabe, beraz dortoken salmentan eta banaketan debekuek dirudite kutsatze hau aurrez ikusteko modurik eraginkorrena dela. Hala ere, gure herrian inongo debekurik ez da islatzen indarreko legerian maskota-mota honen merkaturatzean. Doktorego-tesi honetan zehar, CNM-ak **igoera** bat antzeman zuen 4,5,12:b:- formula antigenikodun isolatuen **kopuruan eta** PFGE-ko profilak *S. Paratyphi B (dT+)*-ren profilen antzekoak ziren. Horregatik, andui honen jatorria *Salmonella Paratyphi B (dT+)*-n egon daitekeela hipotesi bezala izanda doktorego-tesi honetan bariante monofasiko berri hau sartzea erabaki genuen.

4,5,12:b:- formula antigenikoa zuten 39 isolatu aukeratu ziren, eskualde desberdinetatik zetozenak eta 2006–2010 urte bitartekoak. Bere erresistentzia-profila zehazteko asmoz, beste bildumetan aztertutako 12 antibiotikoen aurrean testatu ziren eta guztiak sentiberak izan ziren. Beraz, Denny *et al.*-ek argitaratutako datuak ezagututa, Paratyphi B(dT+)-ren bi lerro klonalei buruz, bultzatu gintuen bariante monofasiko hau erresistentziarik gabeko Paratyphi B

(dT+)-ren hirugarren lerro klonala izan litekeela planteatu genuen hipotesi moduan. Kauffmann eta White-ren eskemaren arabera, 4,5,12:b:- formula antigenikoko anduiak, Paratyphi B serotipokoak izan litezke, baina Abonyrenak ere (4,[5],12,[27]:b:e,n,x-a edo II. subespeziearenak (1,4,[5],12,[27]:b:[e,n,x-a]). Egiaztatzea edo gure bariantearen arbasoa bezala azken serotipo hau baztertzeko, *phoE* genearen sekuentziaren konparaketa analisia burutu zen (McQuiston *et al.*, 2008). Emaitzek isolatu guztiak *Salmonella enterica*-ren I subespeziekoak zirela egiaztatu zuten. Ondoren, *Salmonella*-ren tipifikaziorako erreferentzia teknika bezala, PFGE-a egin zen 3. bildumako 39 isolatuetan, Paratyphi B (dT+)-rekiko antzekotasuna analizatzeko asmoz. Nabarmentzekoa da 39 isolatutik 30ek (% 88,3) pulstotipo bera aurkeztu zutela, bilduman detektatutako 5 pulstotipoetatik kopuru altua pulstotipo batean taldekatzeak bilduma honen homogeneotasun altua frogatzen du. Pulstotipo hauen konparaketa egiaztatu zuen jatorriari buruz genuen hipotesia eta beste serotipoak alde batera utzi ahal izan genituen, jatorria *Salmonella* Paratyphi B dt(+)-an egongo zelaren alde jarritz. Andui monofasikoen karakterizazio hobea lortzeko helburuarekin tartratoaren metabolismoarekin inplikaturako gene baten anplifikazioa lortzen saiatu ginen PCR bidez. Emaitzak genearen presentzia baieztatu zuen 38 isolatuetan. Gainera emaitza hauek Java jatorrikoak izatearen aldekoak ziren ere eta PCR-an negatiboa izan zen anduiaren arbasoa *Salmonella* Paratyphi B dt(-) izango zen, beraz 4. lerro ebolutibokoa izango litzateke. Datuak laburbilduz, bariante monofasiko berria 4,5,12:b:- formula antigenikoa izateaz, antimikrobianoen aurkako sentikortasuna aurkezteaz, tartratoa metabolizatzeko gaitasuna izateaz, eta *Salmonella enterica*-ko I. subespeziekoa izateaz karakterizatzen da. Datu hauek

kontuan izanda, 39 isolatuen artean PFGE-ren bidez 5 andui talde ezberdintzen dira eta 1. pultsotipoko 30 isolatuen artean genetikoki ezberdingarriak diren 3 andui daude, baina haien artean estuki erlazionatuta. Beste lau pultsotipoen artean 7 andui ezberdintzen dira 9 isolatuen artean, non isolatu edo andui batek ez lirateke Java biotipokoa izango.

Bariante monofasiko honen karakterizazioarekin amaitzeko, *fljB* genearen delezioaren arrazoa determinatu behar zen. Horregatik, PCR bidez *fljA*, *fljB* eta *hin* geneen galera eta *iroB* eta *iroC*-ren presentzia aztertu zen. *fljB* genearen delezioaren jatorria aztertzeko zailtasunak izan genituen arbaso posiblearen genomaren sekuentzia osoa eskuragarri ez izateagatik. Orduan tartratoa metabolizatzen ez duen genoma aukeratu behar izan genuen, sekuentziatutako bakarra zelako (*S. Paratyphi B* dT-), baina emaitza negatiboak izan ziren. Dena den, emaitza hauek nahiz eta negatiboak izan ondorioztatzen dute andui monofasiko hauen jatorria berriz ere *S. Paratyphi B* dT(+)-an daudela eta ez *S. Paratyphi B* dT(-)-an.

Orduan, alderantzikatutako PCR-a egin zen hasiera puntu bezala *iroB* genea erabiliz. Oso teknika luzea zenez 3. bildumako isolatu batean egin zen bakarrik, PFGE profil nagusienekoa (A1). Alderantzikatutako PCR-ren bidez lortutako fragmentua delezioaren hasiera STM2745 genean zegoela erakutsi zuen (partzialki delezionatuta) eta amaiera *hin-iroB* zonalde intergenikoan, hain zuzen ere *iroB* genearen aurreko 396 bp-an. Delezioaren erdian bakarrik 183 bp-ko sekuentzia bat topatu genuen. Sekuentzia horrek *Yersinia pseudotuberculosis* (YAPI)-en deskribatutako gen bati dagokio (*api81*), zeinak transposasa bat kodetzen du eta osagarria dena *Salmonella* Enteritidis-en

IS1351 eta IS200 sekuentziekin. Beraz STM2745 eta *iroB* (STM2773) geneen arteko delezioaren arrazoia ezin izan dugu determinatu. Andui hauetan *hin-iroB* arteko zonaldea aurkitu izanagatik eta *iroB* eta *iroC* geneen arteko gertutasuna aztertu ondoren, baieztatu dezakegu genoma honen zonaldea ezberdina dela *Salmonella* Paratyphi B dT(-)-rekiko, beraz andui monofasikoen jatorria *Salmonella* Paratyphi B dT(+)-an egongo lirateke. Andui mota hauek duten garrantzia ikusita, beste ikerketa bat beharrezkoa izango lirateke lan honetan karakterizatu gabeko 9 anduien delezioa aztertzeke.

Lehen aipatu denez gero, bariante monofasikoak daude, une jakinean arrakasta ebolutiboa izan dutenak pertsonengan salmonellosiren kasuetako kopuruaren igoerari bide eman diotela. Halakoa da doktorego-tesi lan honetan aztertutako lehenengo bi barianteen kasua. Bestalde, daude beste bariante batuzk, ez direnak modu hain eztrandagarrian agertu, urteetan zehar maiztasun txikiarekin isolatuak izan direnak, baina bere ikerketa eta karakterizazioa garrantzi zientifiko handikoa izan daiteke. Karakterizatutako azken bariante monofasikoa (4. bilduma), 4,12:d:- formula antigenikoduna, detektatzen hasi zen bai giza jatorriko laginetan bai txerri-jatorriko laginetan 2007an. Harrezkero LNRS-ak kopurua mugatuta jasotzen du urtero. Kauffmann eta White-ko eskemaren arabera, 4,12 antigeno somatikodun anduiak eta 1. faseko d antigeno flagelarduna, *Salmonella enterica* I subespeziearen hainbat serotipo-etakoa izan zitezkeen, hala nola Stanley (4,[5,]12,[27]:b:1,2), Eppendorf (4,12,[27]:d:1,5), Sarajane (4,[5]12,[27]:d:e,n,x), Duisburg (4,12,[27]:d:e,n,z<sub>15</sub>), Chennai (4,12:d:z<sub>35</sub>), Brezany (4,12,27:d:1,6), Schwarzengrund (4,12,27:d:1,7), Mons (4,12,27:d:l,w), Ayinde (4,12,27:d:z<sub>6</sub>) eta II. subespeziekoa 4,12:d:e,n,x. Bestalde, 27. antigenoaren detekzioa ez da egiten erreferentzia-laborategietako



errutinazko lanean bere kostu garaia dela eta. Beraz, ez genuen ezagutzen 4. bildumako isolatuek 27. antigenoa ere izan lezaketen bere formula antigenikoan. Horregatik ez genituen baztertu beste lau serotipo horiek bariante monofasiko berri honen jatorriaren azterketan.

Hasiera batean 19 isolatu aukeratu ziren 4,12:d:- formula antigenikoarekin eta 2007–2010 urteak bitartean LNRS-ari igorrita izan zirenak. Bariante berri honen karakterizazioan bildumako isolatu guztietan erakutsitako ATB-eko profil berdin-berdina eta PFGE-aren bitartez 27 isolatuak pulsotipo berdina erakutsi izanak, haien arteko homogeneotasun handiaren seinale ematen digu. Beraz, genetikoki diferentziagarriak diren anduiak dira, baina hertsiki erlazonatuak. Hogeita zazpi isolatuen artean lau andui genetikoki diferentziagarriak daude, zein PFGE-profilekiko banda bakarragatik soilik bereizten diren. Bestalde, PFGE-aren datuek bariante berri honen jatorriaren gaineko hipotesia bota zuten, *Salmonella* Schwarzengrund-en serotipoarekiko PFGE patroia antzekoak izateagatik. Gure herrialdearen datu epidemiologikoak emanda ere, serotipo horrek Espainian pazienteen isolamenduetatik sarritan detektatuetakoa serotipoetako bat da, formula antigenikoarekin bat egin litzaketen beste serotipoekin ez bezala. Berririo *Salmonella* Schwarzengrund arbasoa bezala agertuz.

Aurrez bariante monofasikoen karakterizazioan lortutako esperientziaren ondoren, bigarren antigeno flagelarraren delezioaren analisiak eskaintzen zituen emaitzen garrantzia ezagutzen genuen anduien jatorri ebolutiboaren ezagupena lortzeko. Horregatik PCR bitartez, *fljA* (SesA\_2911), *fljB* (SesA\_2912) eta *hin* (SesA\_2913) geneen galera eta *iroB* (SesA\_2915) eta

*iroC* (SesA\_2916) geneen presentzia baieztatu zen. *Salmonella* Schwarzengrund-ekiko bariante honen erlazioa egiaztatzeko asmoz *S. Schwarzengrund*-en delezioaren zonaldeko geneak anplifikatzea erabaki zen, *fljB*-ren aurrekoak. Emaitzek erakutsi zituzten SesA\_2901, 2902, 2903, 2904 eta SesA\_2914 geneen presentzia, eta SesA\_2905-en eta SesA\_2910-en arteko geneen absentsia. Datu hauek bariante monofasiko honen jatorriaren gaineko hipotesia indartu zuten, SesA\_2901, 2902, 2903 eta 2904 bezalako geneak, *Salmonella* Schwarzengrund-en soilik agertzen direnez, beren detekzioak bariante berriaren eta aipatutako serotipo-aren arteko hurbiltasuna egiaztatzen zuten. Datuen arabera, delezioa SesA\_2904 gene atzean has liteke eta SesA\_2914 genean amaitu. Horregatik saiatu zen Long-PCR-aren bitartez, *fljBA* operoneko 9 geneen delezioa argituko zuen fragmentua lortzeko, aipatutako bi geneen muturrak anplifikatzen. Alferrikako saioen ondoren hala ere, ekin zitzaion *iroB* (SesA\_2915) genetik abiatuz alderantzizko sekuentziazioko teknika erabiltzeari. Metodologia honen bitartez lortu zen 5 kb-eko fragmentua delezioan txertatuta eta zeinen sekuentziazioan *Enterobacter aerogenes*-en deskribatutako bi zona identifikatu ziren eta beste bi zati oraindik gaur egun identifikatu gabe daudenak eta zeinen jatorria zehaztu ezin izan zena. Identifikatutako sekuentzietatik, bigarren zatian, IS30 insertzio-sekuentzia zen. Nahiz eta 5 kb-tako fragmentua delezioaren hasiera muturra ez erakutsi, amaiera muturra azaltzen zuten. Zehazki, delezioaren amaiera *hin* (SesA\_2913) eta SesA\_2914 geneen arteko zonalde intergenikoan zegoen, eta zona hau oso antzekoa da beste bildumetan deskribatutako *hin-iroB* artekoa. Beraz zonalde horretako 396 bp-ak zehazten dute berriz ere delezioaren amaiera puntua, insertzioetarako puntu beroa bezala seinalatuz.

Delezioaren hasiera determinatzeko, beste *Long-PCR* bat egin zen, baiian kasu honetan SesA\_2902 eta SesA\_2915 (*iroB*) geneen artekoa. Lortutako 6.000 bp-ko fragmentua azaldu zuen delezioaren hasiera SesA\_2902 genearen ondoren ematen zela eta IS30 insertzio-sekuentziaz eraginda izan zela. Fragmentu honek baieztatu zuen ere SesA\_2903 eta SesA\_2904 geneak ez zeudela zonalde horretan eta probableena IS30 sekuentziak bi gene hoi berrantolamendua zuzentzeak beste leku batera mugituz.

Berriro, insertzio-sekuentzia baten txertatzeak (IS30), bigarren antigeno flagelarraren sintesian parte hartzen duten geneen delezioa eragin du. IS30-a txertatzean, 9 gene delezionatu ditu eta translokatu ditu beste bi gene gehiago. Bestealde, identifikatutako sekuentzien artean, 1.982 bp-eko eta 153 bp-ko bi sekuentzia ezezagunak, ez dute baimendu, bere jatorriaren gaineko datu gehiago edo fragmentuan IS30-ren ondoan agertzeko eman den mekanismoaren ideia lortzea. Puntu honetan bi hipotesi plazaratzen ditugu; lehenengo *Enterobacter aerogenes*-etik dator IS30, genoma bereko proteinarekin batera, sartuko zen oraindik ez identifikatutako mikroorganismo batean, bi sekuentzia ezezagun hauen jabea izango liratekeena eta ondoren *Salmonella* Schwarzengrund-en anduietan *fljBA* operonaren puntu bero honetan sartzea delezioa eraginez, edo beste aldetik, bi gertaera genetiko hauek elkarren arteko erlaziorik gabeko mikroorganismoetatik etortzea eta independienteki txertatu izatea genoma honetan. Hala ere, bilduma honetako azkeneko konklusio bezala esan badezakegu, CNM-ean 4,12:d:- formula antigenikoarekin antzemandako anduiak, antimikrobianoen aurkako erresistentziarik gabe, *Salmonella* Schwarzengrund-etik datozela. Nahiz eta azken urteetan *Salmonella* Schwarzengrund buruz bibliografia zabala ez egon arren, hainbat lanek serotipo

honek sortutako salmonelosiren kasu kopuruaren igoera bati buruz informatu dute (Chen *et al.* 2010, Aarestrup *et al.* 2007). Igoera honek erraztu zitzakeen serotipo honetako anduiek izandako bilakaera eta, zeinen arbasoa serotipo honetan aurkitzen den, baina aldaketa desberdinak jasan ondoren bariante monofasiko hauetan eboluzionatu du eta modu berean mundu guztian zehar sakabanatzea.

Azkenik, oraingo doktorego-tesian zehar, bigarren faseko flageloaren zonan ematen diren mutazio-tasa garaiak konklusio aipagarri bezala agertzen da. Gertaera honek errazten du insertzio bakar batetik hasita bariante monofasiko ugarien lorpena. Horregatik oso probablea da, urteetan zehar, bariante monofasiko ugari sortzea eta oraindik ez direnak detektatu, edo aitzitik sortu dituen mutazioak desabantaila ebolutibo handia ekar dezan bere desagertzea eraginez. Azkenik, lan honen amaira konklusio bezala, lan honetan frogatu da lehenengo bi bildumen anduien arbasoa *Salmonella* Typhimurium dela, baina transposizio elementu desberdinak andui horien hedapena eta banaketa eragin dute bi lerro ebolutibo bereiztuz, baina bi klon bezala sailkatu ahal direnak. Lehenengo lerroa klon espainiarrari dagokio, U302 fagotipoko anduiekin, erresistentzia anitzekoa eta A pultsotipokoa eta delezioa IS26 bakar batez eraginda. Bigarren lerro ebolutiboa andui tetraerresistenteak, C pultsotipokoak eta amerikako anduien bezalako 77 genen delezioarekin. Bestalde, 3. lerro bat proposatzen dugu 2. bildumako gainontzeko anduiak batzeko, baina fagotipo ezberdinetakoak direla kontuan izanda eta delezio mota ezberdinekoak. Dena den, ATB, PFGE eta MLVA datu oso natzekoak erakutsi dituzte eta haien artean estuago lotuta daude lehenengo bi lerro ebolutiboekin baino. Gainera 3. lerro honetako anduien delezioaren sorrera antzeko

mekanismoen bidez sortuak izan ziren eta Europan zehar detektatuak izan dira. Doktorego-tesi honetan 3. eta 4. bildumetako anduien jatorria zehaztu ahal izan da eta delezioaren mekanismoaren determinazioa egin ahal izan da anduien gehiengoan. *Salmonella* Paratyphi B dT(+)-tik eratorriak diren anduien kasuan A pultsotipoaren barruan sailkatutako isolatu homogeneousak bereizten dira bildumako beste 7 anduietatik. Azken hauen delezio-mekanismoa zehaztu gabe gelditu dena da eta ikerketa gehiago behar izango lirateke hurrengo lan baterako. Azkenik, *Salmonella* Schwarzengrund-en anduien monofasikoak bezala karakterizatutakoak 4. bildumako 27 isolatuak dira eta haien artean homologia handiagoa aurkeztu dute 1. bildumako anduien artean aurkeztutakoa baino. Beraz, azken bildumako anduiak, 4,12,27:d- formula antigenikoko andui monofasikoen klona izan daiteke.

Bestalde, insertzio-sekuentziek delezioak, bikoizketak eta transposizioak ragiteko duten ahalmena aztertuta eta argitaratuta izan da aurretik, baina hala ere lan honetan ikusi da IS-ek sortutako efektuen garrantzia mikroorganismo berrien agerpenean eta nola heldu dezaketen mila nukleotidoetako delezioak eragitera eta, desabantaila ebolutiboa ez izatea pairatzen duen bakterioarentzat, doktorego-tesi honetan aurkeztu bezalako bariantetan.

Bibliografian, *Salmonella*-ko flageloei buruzko jarrera ezberdinak daude, bere antigenoen adierazpena aldatzeko ahalmenak ostalariaren erantzun immunea saihestu ahal izateko aukera eskaintzen diotelaren aldekoak eta aurkakoak. Lan honen ondoren nire jarrera flagolen fase aldaketaren mekanismo horrek abantaila bezala kontsideratzearen aurkakoa da, ikerketa honetan aztertutako 4 barianteen arrakasta ebolutiboa ikusi ondoren. Ezin

dutelako fase aldaketarik izan eta horrek ez die eragozpenik jarri hedatzeko, sakabanatzeko eta gizakiak erasotzeko unean.

## ***KONKLUSIOAK***

---





1. Lan honetan aztertutako bildumak frogatu duten bezala, *Salmonella enterica*-ren bariante monofasikoen agerpena prozesu jarraia eta dinamikoa da eta serotipo ezberdinetatik eratorriak dira eta gertaera genetiko ezberdinen ondorioz sortu dira.
2. *Salmonella* Typhimurium-eko andui monofasikoak Europan zehar zirkulatzailerak direnak bi lerro multierresistentetik eratorriak dira: espainiar-klona eta europear-klona bezala karakterizatuak. Hirugarren lerro ebolutibo bat identifikatu da *Salmonella* Typhimurium andui monofasikoen artean, Amerikako Estatu Batuetan zirkulatzailerak dena eta gure estatuan ere detektatu dena.
3. Teknika molekular ezberdinen bidez baieztatu da 4,5,12:b:- isolatuak Paratyphi B dt (+)-ko isolatu bifasikoekin genetikoki erlazionatuta dauden bariante monofasikoak direla eta serotipo horrek da bere arbaso posiblea.
4. Teknika molekular ezberdinen bidez baieztatu da 4,12:d:- isolatuak Schwarzenrund serotipoko isolatu bifasikoekin genetikoki erlazionatuta dauden bariante monofasikoak direla eta serotipo horrek da bere arbaso posiblea.
5. Inertzio-sekuentziak dira bariante monofasikoen sorrera eragin duten mekanismo ohikoenak.
6. Bigarren faseko flageloaren sintesiaren zonaldeak, hain zuzen ere de *fljB-iroB* zonalde intergenikoak, inertzio-sekuentziak edo transposonak txertatzeko puntu beroak ditu.

7. Hala ere, delezioak eragiten duen urritasun hori ez da desabantail ebolutiboa izan mota horretako barianteentzat: erakutsi dute jatorriko txoko ekologikoetan bizinaurazteko gai direla eta batzutan bere arbaso bifasikoa ordezkatzeko gaitasuna izan dute.
8. Fenotipo monofasikoaren karakterizazio molekularrak hasle espezifikoen diseinua ahalbidetzen du eta hasle horiek markatzaile epidemiologiko ezinhobeak dira populazio monofasiko hauen detekziorako eta kontrolerako.

## ***BIBLIOGRAFIA***

---



1. Aarestrup F.M., Hendriksen R.S., Lockett J., Gay K., Teates K., McDermott P.F., White D.G., Hasman H., Sørensen G., Bangtrakulnonth A., Pornreongwong S., Pulsrikarn C., Angulo F.J., Gerner-Smidt P. **2007**. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. *Emerg Infect Dis.* 13: 726-31.
2. Ahmer B.M., Tran M., Heffron F. **1999**. The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol.* 181: 1364-8.
3. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, Garaizar J. **2004**. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J Clin Microbiol.* 42: 1734-8.
4. Anderson E. S., Ward L. R., De Saxe M. J., and De Sa J. D. H.. **1977**. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. Camb.* 78: 297–300.
5. Andreoletti O., Budka H., Buncic S., Collins J. D., Griffin J., Hald T., Havelaar A., Hope J., Klein G., McLauchlin J., Müller-Graf C., Nguyen-The C., Noerrung B., Peixe L., Prieto Maradona M., Ricci A., Sofos J., Threlfall J., Vågsholm I. and Vanopdenbosch E.. **2010**. Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal.* 8: 1826.
6. Angulo F. **1997**. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium definitive type 104. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 414.

7. Arber W. **1990**. Mechanisms in microbial evolution. *J Struct Biol.* 104: 107-11. Review.
8. Arber W. **1991**. Elements in microbial evolution. *J Mol Evol.* 33: 4-12. Review.
9. Armengaud J. **2013**. Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds!. *Envirom. Microbiol.* 15: 12-23.
10. Bahnson P. B., Fedorka-Cray P. J., Ladely S. R., and Mateus-Pinilla N. E.. **2006**. Herd-level risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in U.S. market pigs. *Prev. Vet. Med.* 76: 249–262.
11. Barco L., Ramon E., Cortini E., Longo A., Dalla Pozza M.C., Lettini A.A., Dionisi A.M., Olsen J.E., Ricci A. **2014**. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- DT193 ASSuT Strains from Two Outbreaks in Italy. *Foodborne Pathog Dis.* 11:138-44.
12. Barton B. M., Harding G. P., and Zuccarelli A. J. **1995**. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 226: 235-240.
13. Bäumlér A. J., Tsohis R.M., Ficht T.A., Adams L.G. **1998**. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun.* 66: 4579-87. Review.
14. Bergmire-Sweat D., Schlegel J., Marin C., Winpisinger K., Perry C., Sotir M., Harris J. **2008**. Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Infections Associated with Exposure to Turtles. United States, 2007-2008. *CDC.* 57: 69-72.

15. Boland C., Bertrand S., Mattheus W., Dierick K., Wattiau P. **2014**. Molecular typing of monophasic *Salmonella* 4,[5]:i:- strains isolated in Belgium (2008–2011). *Vet. Microbiology*. 168: 447–450.
16. Bone A., Noel H., Le Hello S., Pihier N., Danan C., Raguenaud M. E., Salah S., Bellali H., Vaillant V., Weill F. X., and da Silva J. **2010**. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. *Euro Surveill*. 15(24).
17. Bourgeois C. M., Mescle, J. F., Zucca, J. **1995**. Las salmonellas. *Microbiologia Alimentaria*. Ed. Acribia, S. A. pag: 53-66
18. Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B. **2000**. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*. 38: 2465-7.
19. Brenner F. W., McWhorter-Murlin A. C. **1998**. Identification and serotyping of *Salmonella*. *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga*.
20. Brown D., Mather H., Browning L., Coia J. **2003**. Investigation of human infections with *Salmonella enterica* serovar Java in Scotland and possible association with imported poultry. *Euro Surveill*. 8: 35-40.
21. Bugarel M., Vignaud M.L., Moury F., Fach P., Brisabois A. **2012**. Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiologyopen*. 1:481-9.

22. Burnens A., Stanley J., Sechter I., Nicolet J. **1996**. Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12:l,v:–, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene. *J. Clin. Microbiol.* 34:1641-1645.
23. Caporale L.H. 2003. Natural selection and the emergence of a mutation phenotype: an update of the evolutionary synthesis considering mechanisms that affect genome variation. *Annu Rev Microbiol.* 57: 467–485.
24. Carter P.B., Collins F.M. **1974**. The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med.* 139: 1189-203.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **2007**. *Salmonella* Schwarzengrund Outbreak Investigation, August 2007. <http://www.cdc.gov/salmonella/schwarzengrund.html>
26. Chalmers R., Sewitz S., Lipkow K., Crellin P. **2000**. Complete Nucleotide Sequence of Tn10. *J Bacteriol.* 182: 2970–2972.
27. Chan K., Baker S., Kim C.C., Detweiler C.S., Dougan G., Falkow S. **2003**. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol.* 185: 553-63.
28. Chen M. H., Wang S. W., Hwang W. Z., Tsai S. J., Hsieh Y. C., Chiou C. S. and Tsen H. Y. **2010**. Contamination of *Salmonella* Schwarzengrund cells in chicken meat from traditional marketplaces in Taiwan and comparison of their antibiograms with those of the human isolates. *Poultry Science.* 89: 359–365.



29. Chen C-Y., Nace G. W., Solow B., Fratamico P. **2007**. Complete nucleotide sequences of 84.5- and 3.2-kb plasmids in the multi-antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U302 strain G8430. *Plasmid*. 57: 29-43.
30. Cunha B. A., **2004**. Osler on typhoid fever: differentiating typhoid from typhus and malaria. *Infect Dis Clin North Am*. 18: 111-25.
31. Daniels E.M., Schneerson R., Egan W.M., Szu S.C., Robbins J.B. **1989**. Characterization of the *Salmonella* paratyphi C Vi polysaccharide. *Infect Immun*. 57: 3159-64.
32. Davis M.A., Hancock D.D., Besser T.E. **2002**. Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: The importance of dissemination. *J Lab Clin Med*. 140:135-41. Review
33. De la Torre Martinez S. **2006**. Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de *Salmonella* de origen porcino. *Tesis Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona.
34. Denny J., Threlfall J., Takkinen J., Löfdahl S., Westrell T., Varela C., Adak B., Boxall N., Ethelberg S., Torpdahl M., Straetemans M., van Pelt W. **2007**. Multinational *Salmonella* Paratyphi B variant Java (*Salmonella* Java) outbreak, August – December 2007. *Euro Surveill*. 12: 3332.
35. Desenclos J.C., Bouvet P., Benz-Lemoine E., Grimont F., Desqueyroux H., Rebierel A. **1995**. *Salmonella enterica* serotype paratyphi B in goat milk cheese, France, 1993. *BMJ*. 311: 91-4.

36. Didelot X., Bowden R., Wilson D., Peto T., Crook D. **2012**. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature Rev. Gen.* 13: 601-612.
37. Dionisi A.M., Graziani C., Lucarelli C., Filetici E., Villa L., Owczarek S., Caprioli A., Luzzi I. **2009**. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and Monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. *Foodborne Pathog Dis.* 6: 711-7.
38. Dorn C., Schroeter A., Miko A., Protz D., Helmuth R. **2001**. Increasing number of *Salmonella* Paratyphi B isolates from slaughtered poultry sent in to the national *Salmonella* reference laboratory. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 114:179-83.
39. Echeita M. A., Aladueña A., Cruchaga S., and Usera M. A. **1999**. Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3425.
40. Echeita M. A., Herrera S., and Usera M. A.. **2001**. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* 39. 2981-2983.
41. Echeita M.A., Aladueña A.M., Díez R., Arroyo M., Cerdán F., Gutiérrez R., de la Fuente M., González-Sanz R., Herrera-León S., Usera M.A. **2005**. Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano

- aislados en España en 1997-2001. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 23:127-134.
42. Edwards R.A., Olsen G.J., Maloy S.R. **2002**. Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends Microbiol.* 10: 94-9. Review.
43. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). **2010**. Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal.* 8:1826-1874.
44. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). **2012**. Scientific Opinion on a review on the European Union Summary reports on trends and sources zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009 and 2010 – specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks. *EFSA Journal.*10: 2726-2751.
45. Ellermeier, C. D. y Slauch J. M. **2006**. The Genus *Salmonella*. The Prokaryotes. 3ª Edición. Ed: Springer. 123-148.
46. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST. [www.eucast.org](http://www.eucast.org)
47. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). **2008**. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control. [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/0812\\_sur\\_annual\\_epidemiological\\_report\\_2008.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/0812_sur_annual_epidemiological_report_2008.pdf)

48. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). **2011**. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2011. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control. [http://ecdc.europa.eu/es/publications/Publications/1111\\_SUR\\_Annual\\_Epidemiological\\_Report\\_on\\_Communicable\\_Diseases\\_in\\_Europe.pdf](http://ecdc.europa.eu/es/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf)
49. European Food Safety Authority (EFSA). **2012**. EFSA and ECDC zoonoses report: *Salmonella* in humans continues to decrease, *Campylobacter* increasing. *Press Release*.
50. Euzéby J.P. **1999**. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 927-30.
51. Evans S. J., Davies R. H. **2005**. "Multiple antimicrobial resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B variant Java in cattle: a case report." *Vet Rec.* 156:343-6.
52. Feasey N.A., Dougan G., Kingsley R.A., Heyderman R.S., Gordon M.A. **2012**. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet.* 379: 2489-99. Review.

53. Fleischmann R.D., Adams M.D., White O. **1995**. Whole genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* 269: 496–512.
54. Frenay H.M., Bunschoten A.E., Schouls L.M. **1996**. Molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 60–64.
55. García 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.
56. Gallati C., Stephan R., Hächler H., Malorny B., Schroeter A., Nüesch-Inderbinnen M. **2013**. Characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,[5],12:i:- clones isolated from human and other sources in Switzerland between 2007 and 2011. *Foodborne Pathog Dis.* 10:549-54.
57. Garaizar, J., Porwollik S., Echeita A., Rementería A., Herrera S., Wong R. M-Y., Frye J., Usera M. A., and McClelland M. **2002**. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2074-2078.
58. Gardiner K. **1990**. Pulsed field gel electrophoresis and investigations into mammalian genome organization. *J. cell science.* 96: 5-8.
59. Gatto A.J., Peters T.M., Green J., Fisher I.S., Gill O.N., O'brien S.J., Maguire C., Berghold C., Lederer I., Gerner-Smidt P., Torpdahl M., Siitonen A., Lukinmaa S., Tschäpe H., Prager R., Luzzi I., Dionisi A.M., Van der Zwaluw W.K., Heck M., Coia J., Brown D., Usera M., Echeita A.,

- Threlfall E.J. **2006**. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000-2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiol Infect.* 134: 729-36.
60. Gaulin C., Vincent C. **2002**. "Outbreak of *Salmonella paratyphi* B linked to aquariums in the province of Quebec, 2000." *Can Commun Dis Rep.* 28:89-93.
61. Glynn M. K., Bopp C., Dewitt W., Dabney P., Mokhtar M., Angulo F. J. **1998**. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med.* 338: 1333-1338.
62. Gossner C.M., van Cauteren D., Le Hello S., Weill F.X., Terrien E., Tessier S., Janin C., Brisabois A., Dusch V., Vaillant V., Jourdan-da Silva N. **2012**. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Euro Surveill.* 2: 20071.
63. Grimont P. A. D., Weill F. X. **2007**. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9<sup>th</sup> edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
64. Guard-Petter J. **2001**. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol.* 3: 421-30. Review.
65. Guerra B., Laconcha I., Soto S. M., Gonzalez-Hevia M. A., Mendoza M. C. **2000**. Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella*

- enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 341-347.
66. Guerra B., Junker E., Miko A., Helmuth R., Mendoza M. C. **2004**. Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug Res.* 10: 83-91.
67. Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P.I., Bockemühl J., Grimont P.A., Weill F.X. **2010**. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 161: 26-9.
68. Halling S.M., Kleckner N. **1982**. A symmetrical six-base-pair target site sequence determines Tn10 insertion specificity. *Cell. Jan.* 28: 155-63.
69. Han K. H., Choi S. Y. **2006**. "Isolation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B dT+, or *Salmonella* Java, from Indonesia and alteration of the d-tartrate fermentation phenotype by disrupting the ORF STM 3356." *J Med Microbiol.* 55: 1661-5.
70. Harker K.S., Lane C., De Pinna E., Adak G.K. **2011**. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT191a associated with reptile feeder mice. *Epidemiol Infect.* 139: 1254-61.
71. Harris J., Bergmire-Sweat D., Schlegel J., Winpisinger K., Klos R., Perry C., Tauxe R., Sotir M. **2009**. Multistate Outbreak of *Salmonella* Infections Associated With Small Turtle. *Pediatrics.* 124: 1388 -1394.

72. Hauser E., Tietze E., Helmuth R., Junker E., Blank K., Prager R., Rabsch W., Appel B., Fruth A., Malorny B. **2010**. Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl Environ Microbiol.* 76:4601-10.
73. Hernández E., Rodríguez J.L., Herrera-León S., García I., de Castro V., Muniozgunen N. **2012**. *Salmonella* Paratyphi B var Java infections associated with exposure to turtles in Bizkaia, Spain, September 2010 to October 2011. *Euro Surveill.* 21: 20201.
74. Herrera-León S., McQuiston J.R., Usera M.A., Fields P.I., Garaizar J., Echeita M.A. **2004**. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol.* 42:2581-6.
75. Hopkins K.L., Kirchner M., Guerra B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., Jakubczak A., Threlfall E.J., Mevius D.J. **2010**. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain?. *Euro Surveill.* 15: 19580.
76. Hopkins K.L., de Pinna E., Wain J. **2012**. Prevalence of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in England and Wales, 2010. *Euro Surveill.* 13:20275.
77. Hueck C.J. **1998**. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 379-433. Review.
78. Iida S., Meyer J., Arber W. **1981**. Genesis and natural history of IS-mediated transposons. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 45: 27-43.
79. Kauffmann F. **1971**. On the classification and nomenclature of the genus *Salmonella*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 79: 421-2.



80. Kauffmann F. **1941**. A Typhoid Variant and a New Serological Variation in the *Salmonella* Group. *J Bacteriol.* 41: 127-40.
81. King D.G., Soller M., Kashi Y. **1997**. Evolutionary turning knobs. *Endeavour* 21: 36-40.
82. Kingsley R.A., Humphries A.D., Weening E.H., De Zoete M.R., Winter S., Papaconstantinou A., Dougan G., Bäumlér A.J. **2003**. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun.* 71: 629-40.
83. Kleckner N. **1977**. Translocatable elements in procaryotes. *Cell.* 11: 11-23.
84. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G. **1971**. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 56: 341-361.
85. Klug W.S., Cummings, M.R., Spencer, C. A. **1999**. Conceptos de genética. 8a ed.
86. Lafuente S., Bellido J B., Moraga F A., Herrera S., Yagüe A., Montalvo T., de Simó M., Simón P., Caylà J A. **2013**. *Salmonella paratyphi* B and *Salmonella litchfield* outbreaks associated with pet turtle exposure in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 31: 32-35.
87. Laorden L, Herrera-León S, Martínez I, Sanchez A, Kromidas L, Bikandi J, Rementeria A, Echeita A, Garaizar J. **2010**. Genetic evolution of the

- Spanish multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- monophasic variant. *J Clin Microbiol.* 48: 4563-6.
88. Larsson J. T., Torpdahl M., Petersen R. F., Sorensen G., Lindstedt B. A., Nielsen E. M.. **2009**. Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill.* 14: 19174.
89. Le Minor L, Véron M, Popoff M. **1982**. A proposal for *Salmonella* nomenclature. *Ann Microbiol (Paris)*. 133: 245-54.
90. Le Minor L., Popoff M.Y., Laurent B., Hermant D. **1986** .Characterization of a 7th subspecies of Salmonella: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 137B: 211-7.
91. Le Minor L., Popoff M. Y. **1987**. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. 37: 465-468.
92. Lilleengen K. **1948**. Typing of *Salmonella* Typhimurium by means of bacteriophage. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* 77: 11-125.
93. Limawongpranee S., Hayashidani H., Okatani A.T., Ono K., Hirota C., Kaneko K., Ogawa M. **1999**. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. *J Vet Med Sci.* 61:255-9.
94. Lindstedt B. A., Vardund T., Aas L., Kapperud G. **2004**. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp.

- enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolour capillary electrophoresis. *J. Microbiological Methods*. 59: 163-172.
95. Lindstedt B.A., Heir E., Gjernes, E., Kapperud, G., **2003**. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1469– 1479.
96. Lockman H.A., Curtiss R. 3rd. **1990**. *Salmonella* Typhimurium mutants lacking flagella or motility remain virulent in BALB/c mice. *Infect Immun.* 58: 137-43.
97. Low J. C., Angus M., Hopkins G., Munro D., Rankin S. C. **1997**. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 isolates and investigation of strains with transferable apramycin resistance. *Epidemiol. Infect.* 118: 97-103.
98. Lucarelli C., Dionisi A.M., Filetici E., Owczarek S., Luzzi I., Villa L. **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: 111-4.
99. Lüderitz O., Staub A.M., Westphal O. **1966**. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. *Bacteriol Rev.* 30: 192-255. Review.
100. Luk J.M., Kongmuang U., Reeves P.R., Lindberg A.A. **1993**. Selective amplification of abequeose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase

- chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). *J Clin Microbiol.* 31: 2118-23.
101. Madigan M. T., Martinko J.M. Parker J. **2009**. Brock, Biología de los microorganismos. 12ª edición. Editorial Pearson Education Ltd.
102. Mahillon J., Chandler M. **1998**. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 725-74. Review.
103. Mandell G. L., Bennet J. E. Dolin R. **2006**. Especies de *Salmonella* incluida *Salmonella typhi*. Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica vol 3. Agentes Etiológicos de las Enfermedades Infecciosas. 6ª edición.
104. Mandilara G., Lambiri M., Polemis M., Passiotou M., Vatopoulos A. **2013**. Phenotypic and molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) in Greece, 2006 to 2011. *Euro Surveill.* 18(22).
105. Mayer H., Bhat U. R., Masoud H., Radziejewska-Lebrecht J., Widemann C. Krauss J. H. **1989**. Bacterial lipopolysaccharides. *Pure & App. Chern.* 61: 1271-1282.
106. McClelland M., Sanderson K.E., Spieth J., Clifton S.W., Latreille P., Courtney L., Porwollik S., Ali J., Dante M., Du F., Hou S., Layman D., Leonard S., Nguyen C., Scott K., Holmes A., Grewal N., Mulvaney E., Ryan E., Sun H., Florea L., Miller W., Stoneking T., Nhan M., Waterston R., Wilson R.K. **2001**. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 413: 852-6.

107. McQuiston J.R., Herrera-Leon S., Wertheim B.C., Doyle J., Fields P.I., Tauxe R.V., Logsdon J.M. Jr. **2008**. Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *J Bacteriol.* 190: 7060-7.
108. Mejía W. J. **2003**. Epidemiología de la salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. *Tesis Doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona.
109. Miller S. I., Pegues D. A. **2000**. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. (Eds.) Mandell D.L., Bennett J. E., Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5: 2344-2363.
110. Mollet B., Iida S., Shepherd J., Arber W. **1983**. Nucleotide sequence of IS26, a new prokaryotic mobile genetic element. *Nucleic Acids Res.* 11: 6319-6330.
111. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. **1992**. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*. 24: 17-27.
112. Musto J., Kirk M., Lightfoot D., Combs B.G., Mwanri L. **2006**. Multi-drug resistant *Salmonella* Java infections acquired from tropical fish aquariums, Australia, 2003-04. *Commun Dis Intell Q Rep.* 30: 222-7.
113. Parkhill J., Dougan G., James K.D., Thomson N.R., Pickard D., Wain J., Churcher C., Mungall K.L., Bentley S.D., Holden M.T., Sebahia M., Baker S., Basham D., Brooks K., Chillingworth T., Connerton P., Cronin

- A., Davis P., Davies R.M., Dowd L., White N., Farrar J., Feltwell T., Hamlin N., Haque A., Hien T.T., Holroyd S., Jagels K., Krogh A., Larsen T.S., Leather S., Moule S., O'Gaora P., Parry C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. **2001**. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 413: 848-52.
114. Parra M., Durango J., Máttar S. **2002**. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ Córdoba*, 7: 187-200.
115. Penner J. L. **1988**. International Committee on Systematic Bacteriology, Taxonomic Subcommittee on *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 223-224.
116. Perry M. B. **1992**. Some structural aspects of the antigenic O-polysaccharide components of *Salmonella* somatic lipopolysaccharides. (Eds.) Cabello F., Hormaeche C., Mastroeni P., Bonina L. **1993**. Biology of *Salmonella*. *Editorial Plenum Press*. 63-77.
117. Popoff M. Y., Le Minor L. **1997**. Antigenic Formulas of the *Salmonella* serovars, 7<sup>th</sup> revision. World Health Organization Collaborating for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur. Paris, France.
118. Popoff M.Y., Bockemühl J., Brenner F.W., Gheesling L.L. **2001a**. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* 152: 907-9.

119. Popoff M. Y. **2001b**. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8<sup>th</sup> edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, France.
120. Poppe C., Irwin R.J., Messier S., Finley G.G., Oggel J. **1991**. The prevalence of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* sp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. *Epidemiol Infect.* 107:201-11.
121. Porwollik S., Wong R.M., McClelland M. **2002**. Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 8956-61.
122. Prendergast D.M., Hand D., Ní Ghallcháoir E., McCabe E., Fanning S., Griffin M., Egan J., Gutierrez M. **2013**. A multiplex real-time PCR assay for the identification and differentiation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic serovar 4,[5],12:i:-. *Int J Food Microbiol.* 166:48-53.
123. Pulsenet USA. The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance, CDC. One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).
124. Reeves M.W., Evins G.M., Heiba A.A., Plikaytis B.D., Farmer J.J. 3rd. **1989**. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other

- salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol.* 27: 313-20.
125. Rivas J.M., Speziale P., Patti JM & Hook M. **2004**. MSCRAMM targetted vaccines and immunotherapy for staphylococcal infection. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 7: 223–227.
126. Sabat A. j., Budimir A., Nashev D., Sá-Leao R., van Dijn J. M., Laurent F., Grundmann H., Friedrich A. W. **2013**. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveil.* 18: 20380.
127. Sánchez L., Rodríguez M., Garrido E. **2006**. Infecciones por *Salmonella*. Fiebre tifoidea y salmonelosis no tifoideas. *Medicine*, 9(53). Enfermedades infecciosas (V): Infecciones por gérmenes gramnegativos (II), págs. 3439-3448.
128. Salyers A, Whitt D. Bacterial Patogénesis: a molecular approach. **2002**. *ASM press, Washinton.2nd edition.* 681-695.
129. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M.. **2011**. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17: 7-15.
130. Schwartz D., Cantor C. R. **1984**. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67-75.



131. Selander R. K., Li J., Nelson K. **1996**. Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. Neidhardt F.C. (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular Mol. Biology*. 2691-2707.
132. Shelobolina E.S., Sullivan S.A., O'Neill K.R., Nevin K.P., Lovley D.R. **2004**. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. *Apl Environ Microbiol*. 70: 2959-65.
133. Soto González, S. **2002**. Evaluación de métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de tipos genéticos y estudio de resistencia a antimicrobianos en *Salmonella*. *Tesis Doctoral*, Universidad de Oviedo.
134. Soyer Y., Moreno A., Davis M. A., Maurer J., McDonough P. L., Schoonmaker-Bopp D. J., Dumas N. B., Root T., Warnick L. D., Gröhn Y. T., Wiedmann M. **2009**. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J. Clin. Microbiol*. 47: 3546-3556.
135. Staff M., Musto J., Hogg G., Janssen M., Rose K. **2012**. Salmonellosis outbreak traced to playground sand, Australia, 2007-2009. *Emerg Infect Dis*. 18: 1159-62.
136. Stager C.E., Davis J. R. **1992**. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev*. 5: 302-327.

137. Sundeep K. G., Medalla F., Omondi M. W., Whichard J. M., Fields P. I., Gerner-Smidt P., Patel N. J., Cooper K. L. F., Chiller T. M., Mintz E. D. **2008**. Laboratory-Based Surveillance of Paratyphoid Fever in the United States: Travel and Antimicrobial Resistance. *Clin. Infect. Dis.* 46: 1656–63.
138. Swaminathan B., Barrett T.J., Hunter S.B., Tauxe R.V., and the CDC PulseNet Task Force. **2001**. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis.* 7:382-389.
139. Teeling H., Glöckner F.O. **2012**. Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis-a bioinformatic perspective. *Brief. Bioinform.* 13: 728-742.
140. Threlfall E.J., Frost J.A., Ward L.R., Rowe B. **1994**. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT 104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet. Rec.* 134: 577.
141. Threlfall E.J. **2005a**. *Salmonella*. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th Edition*, part VI. (Eds): Borriello, SP, Murray PR, Funke G. Publishers: Hodder Arnold (London). 1398-1434.
142. Threlfall J., Levent B. **2005b**. Multidrug-resistant *Salmonella* Java. *Emerg Infect Dis.* 11: 170-1.
143. Torpdahl M., Sørensen G., Lindstedt B.A., Nielsen E.M. **2007**. Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella* Typhimurium infections. *Emerg Infect Dis.* 13: 388-95.

144. Turlan C., Chandler M. **1995**. IS1-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replicative deletions. *EMBO J.* 14: 5410-5421.
145. Uzzau S., Brown D.J., Wallis T., Rubino S., Leori G., Bernard S., Casadesús J., Platt D.J., Olsen J.E. **2000**. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect.* 125: 229-55. Review.
146. Usera M. A., Aladueña A., Diez R., De la Fuente M., Gutierrez F., Cerdán R., Echeita A. **2001**. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen no humano en España en el año 2000. *Bol. Epidemiol. Semanal.* 9: 281–288.
147. van Belkum A., Melchers W. J., IJsseldijk C., Nohlmans L., Verbrugh H., Meis J. F. **1997a**. Outbreak of amoxicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b: variable number of tandem repeats as novel molecular markers. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1517–1520.
148. van Belkum A., Scherer S., van Leeuwen W., Willemse D., van Alphen L., Verbrugh H. **1997b**. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 65: 5017–5027.
149. van Belkum A., Scherer S., Van Alphen L., Verbrugh H. **1998**. Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 275–293.
150. van Belkum A. **2006**. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49: 22-7.

151. van Pelt W., van der Zee H., Wannet W.J., van de Giessen A.W., Mevius D.J., Bolder N.M., Komijn R.E., van Duynhoven Y.T. **2003**. Explosive increase of *Salmonella* Java in poultry in the Netherlands: consequences for public health. *Euro Surveill.* 8:31-5.
152. Wasyl D., Hoszowski A. **2012**. Occurrence and characterization of monophasic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) of non-human origin in Poland. *Foodborne Pathog Dis.* 9:1037-43.
153. Weill F. X., Fabre L. **2005**. "Multiple-antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B isolates collected in France between 2000 and 2003 is due mainly to strains harboring *Salmonella* genomic islands 1, 1-B, and 1-C." *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2793-801.
154. Wise K.S., Foecking M.F., Roske K. **2006**. Distinctive repertoire of contingency genes conferring mutation-based phase variation and combinatorial expression of surface lipoproteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* of the *Mycoplasma mycoides* phylogenetic cluster. *J Bacteriol.* 188: 4926–4941.
155. Wuyts V., Mattheus M., De Laminne de Bex G., Wildemauwe C., Roosens N. H., Marchal K., De Keersmaecker S. J. C., Bertrand S. **2013**. MLVA as a tool for public health surveillance of human *Salmonella* Typhimurium: prospective study in Belgium and evaluation of MLVA loci stability. *PLoS ONE.* 8(12): e84055

***ARGITARATUTAKO LANAK***

---



Doktorego-tesi honek hurrengo ikerketa-proiektuetatik jasotako finantziarioari esker egin da:

1. Subvención General a Grupo de Investigación de la UPV/EHU: GIU05/42.(2006-2008) y GIU08/20 (2009-2011).
2. Nuevas aproximaciones a la detección de patógenos mediante el uso de la genómica microbiana, la microbiología molecular y la inmunología. Convocatoria Saiotek 2009. Proyectos de Incubación Científico-Tecnológicos. Gobierno Vasco: S-PC09UN04 (2009-2011).
3. Microbiología molecular: desarrollo de metodologías diagnósticas para bacterias y hongos basadas en el uso de herramientas bioinformáticas y técnicas moleculares. Grupos de Investigación Consolidados del Sistema Universitario vasco financiado por el Gobierno Vasco: IT-343-10 (2010-2012).
4. Detección de *Salmonella* en alimentos de forma rápida y específica mediante técnicas genéticas. Acciones Destinadas a la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica de productos industriales en Álava. UPV/EHU-Dpto. de Educación, Universidades e Investigación de Gobierno Vasco: PFA07/07 (2008).
5. UFI multidisciplinar sobre el estudio de las enfermedades microbianas para la promoción de una vida y un envejecimiento saludable. UFI11/25. Universidad del País Vasco 2011-2013.
6. Nuevas aproximaciones genómicas y de microbiología molecular para la detección de patógenos. Convocatoria Saiotek 2009. Proyectos de Incubación Científico-Tecnológicos. Gobierno Vasco: S-PC11UN007.

7. Vigilancia Sanitaria en el Marco de los programas de I+D entre grupos de investigación de la Comunidad de Madrid. Comunidad de Madrid-S2009/AGR-1489.

Doktorego-tesi honetan aurkeztutako lana hurrengo argitalpenak izan ditu:

1. L. Laorden, L. Kromidas, J. Bikandi, S. Herrera, A. Echeita, A. Rementeria, J. Garaizar. “Estudio de las delecciones de *Salmonella enterica* serotipo [4, 5,12: i:-] mediante técnicas de PCR y secuenciación”. XXI Congreso Nacional de Microbiología. ISBN: 978-84-96377-98-9). Sevilla 2007.
2. L. Laorden, L. Kromidas, J. Bikandi, S. Herrera, A. Echeita, A. Rementeria, J. Garaizar. “Development of epidemiological markers for the detection and monitoring of *Salmonella enterica* [4, 5, 12: i:-] serovar by PCR techniques”. 8th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers. ISBN: 978-83-923731-2-4). Zakopane, Polonia 2008.
3. J. Garaizar, L. Laorden, L. Kromidas, J. Bikandi, S. Herrera, A. Echeita, A. Rementeria. “Estudio evolutivo y caracterización de *Salmonella enterica* serotipo [4,5,12:i:-] mediante diversas técnicas de PCR”. XVI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. ISBN: 978-84-691-5094-8). Córdoba 2008.
4. L. Laorden, L. Kromidas, J. Bikandi, S. Herrera, A. Echeita, A. Rementeria, J. Garaizar. “*Salmonella enterica* [4, 5, 12: i: -]”



- serotipoaren jatorri ebolutiboaren ikerketa eta karakterizazioa PCR teknikaren bidez”. 18. Osasun jardunaldiak. Infekzioak. ISBN: 978-84-934137-2-9). Bilbao 2008.
5. L. Laorden, J. Bikandi, S. Herrera-León, A. Sanchez, A. Echeita, A. Rementeria, J. Garaizar. “Study of evolution and characterization of *Salmonella enterica* 4, 5, 12: i:- serotype by PCR”. 5th Annual Scientific Meeting, MedVetNet. El Escorial, Madrid 2009.
  6. L. Laorden, J. Bikandi, S. Herrera-León, A. Sanchez, A. Echeita, A. Rementeria, J. Garaizar. “Characterization and evolutionary study of *Salmonella enterica* 4, 5, 12: i: - using PFGE, MLVA, PCR, and sequencing techniques”. 3rd ASM Conference on Salmonella: Biology, Pathogenesis & Prevention. ISBN: 978-1-55587-544-8). Aix-en Provence, Francia 2009.
  7. L. Laorden, J. Bikandi, S. Herrera-León, A. Sanchez, A. Rementeria, A. Echeita, J. Garaizar. “Six types of deletions detected in monophasic *Salmonella enterica* 4[5]12:i:- strains”. 9th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers. Wernigerode, Alemania 2010.
  8. L. Laorden, J. Garaizar, L. Herrera-León, I. Martínez, J. Bikandi, A. Rementeria, A. Echeita, S. Herrera-León. “Elementos móviles, causantes del incremento de variantes monofásicas de *Salmonella* Typhimurium”. XVIII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Logroño, La Rioja 2012. ISBN: 978-84-695-4093-0).



## Genetic Evolution of the Spanish Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- Monophasic Variant<sup>†</sup>

Lorena Laorden,<sup>1</sup> Silvia Herrera-León,<sup>2</sup> Ilargi Martínez,<sup>1</sup> Ainhoa Sanchez,<sup>2</sup> Lefteris Kromidas,<sup>1</sup> Joseba Bikandi,<sup>1</sup> Aitor Rementeria,<sup>1</sup> Aurora Echeita,<sup>2</sup> and Javier Garaizar<sup>1\*</sup>

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, Campus de Álava, Vitoria-Gasteiz, and Campus de Bizkaia, Leioa, Spain,<sup>1</sup> and Sección de Enterobacterias, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Spain<sup>2</sup>

Received 19 February 2010/Returned for modification 19 May 2010/Accepted 4 October 2010

We analyzed a collection of 60 *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- phage type U302 multidrug-resistant monophasic variant strains, isolated in Spain between 2000 and 2007. Most strains showed resistance to ampicillin (A), chloramphenicol (C), sulfamethoxazole (Su), gentamicin (G), streptomycin (S), tetracycline (T), and co-trimoxazole (SxT) (an ACSuGSTSxT resistance pattern). Only one pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) type was detected, with 19 subtypes (Simpson's index of diversity [SID] = 0.89). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) showed more variability, with 32 profiles (SID = 0.97), but only showed diversity at the STTR5 and STTR6 loci. PCR and sequencing demonstrated all strains contained the same allantoin-glyoxylate pathway deletion. Four types of deletions were detected in the *fljAB* operon, all starting at the same position, at the STM2758 gene, and followed by an IS26 insertion. Furthermore, a representative set of strains of the four deletion types harbored plasmids with IS26. We propose that a *Salmonella enterica* serotype Typhimurium U302 multidrug-resistant (ACSuGSTSxT) strain, defective for the allantoin-glyoxylate pathway and containing IS26 at plasmid pU302L, could be the ancestor of the variant in Spain.

In 1997 the Spanish National *Salmonella* Reference Laboratory (SNSRL) detected that a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* multidrug-resistant strain had emerged with an atypical antigenic formula (4,5,12:i:-) and phage type U302 (7). Several studies found this strain to be a monophasic variant of *S. enterica* serovar Typhimurium (7, 8). Compared to the *S. Typhimurium* LT2 strain, the monophasic variant contained five major deletions in the allantoin-glyoxylate operon, the *fljAB* operon, and three prophages, Fels-1, Fels-2, and Gifsy-1 (9). Similar *Salmonella* monophasic strains have increasingly been detected in human clinical cases and food-related sources around the world (4, 17). The aim of this research is to determine the molecular characterization and genetic evolution of a representative collection of isolates of this Spanish monophasic *Salmonella* variant.

### MATERIALS AND METHODS

To determine the genetic evolution of this monophasic variant, we studied 60 strains of *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- phage type U302, voluntarily submitted to the SNSRL over an 8 year period (2000 to 2007), and the first food isolate from 1998 (Fig. 1). Five *S. Typhimurium* strains, including the LT2 strain (Spanish Culture Cell Type CECT722) and an *S. enterica* serovar Enteritidis strain, were used as controls.

The phage type was defined according to Anderson et al. (2). The susceptibilities to 13 antimicrobial agents were determined by the disk diffusion method according to the 2007 guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; <http://www.clsi.org>). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

was performed following the PulseNet International protocol (<http://www.pulsenetinternational.org/protocol/pge.asp>) using the XbaI restriction enzyme. Dice index and UPGMA were used to obtain a dendrogram (Fig. 1). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) was carried out by following the protocol described for *S. Typhimurium* (12, 13). Simpson's index of diversity (SID) was used to calculate the discrimination of techniques (11). PCR and sequencing were used to study the allantoin glyoxylate and *fljAB* operon deletions. The allantoin-glyoxylate operon deletion was studied using previously described primers (9). Two contiguous PCRs were designed to delineate the *fljAB* operon deletions. The first PCR amplified the region from the STM2757 gene to the IS26 insertion sequence (1). The second PCR amplified the region from IS26 (5'-TTG CAA ATA GTC GGT GGT GA-3') to the *iroC* gene (5'-CCC AGG GGA TCA CCA TAA TA-3') or from IS26 (5'-CGC CTG GTA AGC AGA GTT TT-3') to the STM2815 gene (5'-CAC CCC GAA AGA GGT GAT AA-3'). PFGE-S1 nuclease and hybridization assays were performed to detect whether the monophasic strains contained large plasmids with IS26 (3).

### RESULTS AND DISCUSSION

The *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- U302 strains analyzed in this study had very similar antibiotic resistance profiles, which indicates the homogeneity of this group. Although there was some variation compared to the typical "Spanish clone," the main pattern was still resistance to ampicillin (A), chloramphenicol (C), sulfamethoxazole (Su), gentamicin (G), streptomycin (S), tetracycline (T), and co-trimoxazole (SxT) (ACSu GSTSxT) (Fig. 1). The PFGE-XbaI profiles showed 12 to 15 bands, with no more than 4 band differences. The 60 *Salmonella* 4,5,12:i:- U302 strains all had the same PFGE type, A, and 19 different subtypes (A1 to A19) were detected (Fig. 1), with a SID value of 0.89. Over the 8 years these strains were isolated from all over the country, only a few changes accumulated, which demonstrates the high clonality of these strains in Spain, a finding which is consistent with previous reports (10, 17). MLVA showed 32 profiles, although only the STTR5 and

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Immunology, Microbiology, and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain. Phone: 34 945 013912. Fax: 34 945 013014. E-mail: javier.garaizar@ehu.es.

<sup>†</sup> Published ahead of print on 13 October 2010.

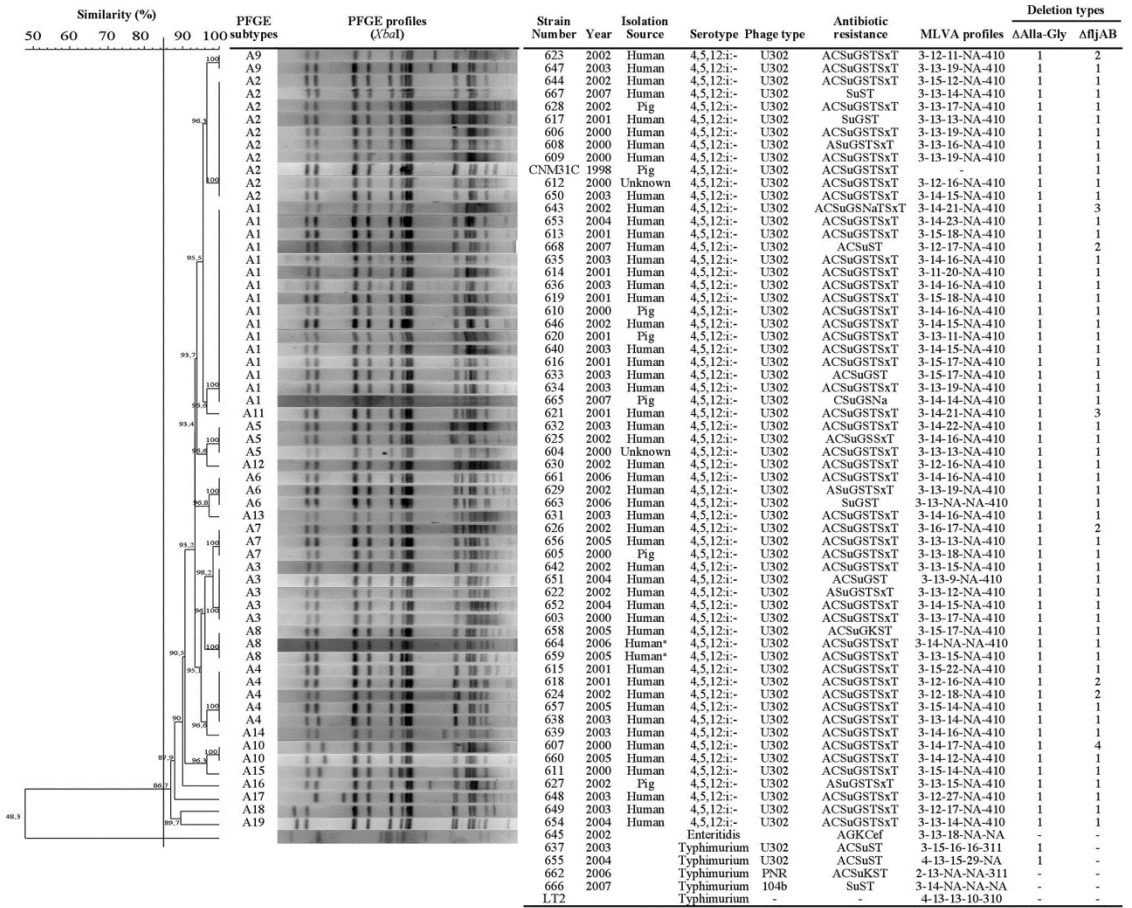


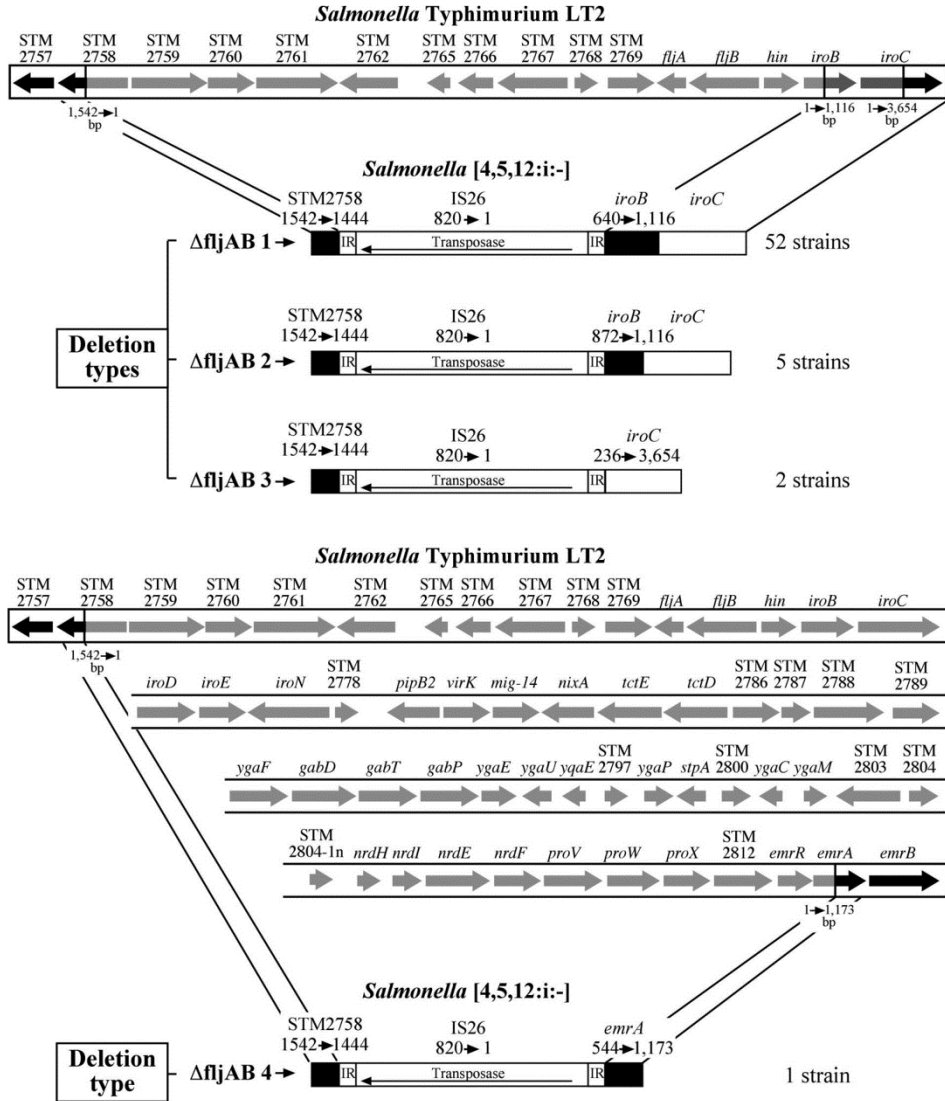
FIG. 1. Results of PFGE typing, characteristics of the strains used in this study, and type assignment by different typing methods. PFGE dendrogram, types, and profiles obtained with XbaI restriction enzyme following the PulseNet International protocol using Dice and UPGMA (optimization, 0.50%; tolerance, 1.5%). Strain numbers from *Salmonella* laboratory of Faculty of Pharmacy, UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz, Spain. CNM3IC, strain code of Microbiology National Centre (CNM, Majadahonda, Madrid); LT2, *Salmonella* LT2 strain obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT no. 722); \*, human blood source; other human isolates were obtained from stools. Antibiotic resistance: A, ampicillin; C, chloramphenicol; Su, sulfamethoxazole; G, gentamicin; K, kanamycin; S, streptomycin; Cef, cephalothin; Na, nalidixic acid; T, tetracycline; SxT, cotrimoxazole. MLVA profiles are composed of five numbers indicating repeat unit for each locus, with the following order: STTR9-STTR5-STTR6-STTR10-STTR3 (11). Deletion type assigned by PCR and sequencing of allantoin-glyoxylate ( $\Delta$ Alla-Gly) operon or *fljAB* ( $\Delta$ *fljAB*) operon deletions.

STTR6 loci presented variability (6 and 16 allele numbers, respectively) (Fig. 1), with a SID value of 0.97. These results are consistent with observations by others that the MLVA method is more discriminative than PFGE and a possible alternative to PFGE for genotyping highly clonal groups of bacteria (12, 13). Based on PFGE and MLVA techniques, the Spanish *Salmonella enterica* 4,5,12:i- phage type U302 strains studied are more homogeneous than groups isolated in other countries (17), supporting a clonal origin.

Two of the major deletions previously detected in the Spanish monophasic strains, in the allantoin-glyoxylate and *fljAB* operons (9), were studied by PCR and sequencing. We confirmed the deletion of the allantoin-glyoxylate operon in all

*Salmonella* 4,5,12:i- strains and in the two *S. Typhimurium* U302 strains. Sequencing revealed that the deletion always spanned the STM0517 and STM0529 genes (GenBank accession no. EU265823.1, EU265824.1, and EU265825.1). A similar deletion in this gene region was described by Reen et al. (15) for *S. Typhimurium*.

In the present study, we detected variations in the *fljAB* operon deleted gene region (Fig. 2). The start of the deletion was well conserved in all 60 *Salmonella* monophasic strains studied. This deletion affected 93.6% of the STM2758 gene and began at the same nucleotide in all cases (Fig. 2). The end of the deletion showed more variability. We identified four different deletion types:  $\Delta$ *fljAB1*,  $\Delta$ *fljAB2*,  $\Delta$ *fljAB3*, and



Downloaded from <http://jcm.asm.org/> on November 20, 2013 by guest

FIG. 2. Structure of the different *fljAB* operon deletion types and the insertion of IS26 detected in Spanish *S. enterica* serovar [4,5,12:i:-] monophasic variant strains observed by PCR and sequencing, compared with the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 genome (GenBank accession no. AE006468.1).

*ΔfljAB4* (Fig. 2). *ΔfljAB1* was the most common deletion, ending at nucleotide 639 of the *iroB* gene (STM2773); this sequence is available from GenBank (accession no. GQ402163.1). The *ΔfljAB2* deletion ended at nucleotide 871 of the *iroB* gene (accession no. GQ402164.1); the *ΔfljAB3* deletion ended at nucleotide 235 of the *iroC* gene (STM2774) (accession no. GU939595.1); and *ΔfljAB4* was a larger deletion, which ended at nucleotide 543 of the *emrA* gene (STM2814) (accession no. HM595411) (Fig. 2). No amplification occurred with the control strains.

Previous studies revealed IS26 was inserted in the *fljAB* operon deleted region (9); this finding was confirmed here. Other authors (6) have shown similar mutations in the *rhs* operon of *Escherichia coli*, with the end point of the deletion always precisely located at the end of IS150 and with different extents of the deletion. In our study, all the deletion types of the genes were replaced by an inverted IS26 sequence. IS26 is a member of a family of transposable elements with a possibly wide host range and of considerable importance for horizontal gene transfer between microorganisms (14). IS26 has been

described for many bacteria, including the *S. Typhimurium* U302 G8430 strain, which harbors a large plasmid (pU302L) with 5 copies of this insertion sequence (5, 14). To detect whether the monophasic strains in our study contained large plasmids with IS26, a selection of 13 strains with different  $\Delta$ fljAB deletion types were assayed by PFGE-S1 and hybridization. The result was positive in all strains. IS26 was present in the chromosomally deleted region and in the large plasmid, which could involve a replicative transposition event (18). Furthermore, when analyzing the start and end of the deleted regions, we detected a short sequence of 14 nucleotides (5'-AAG ACG CTC TGA AT-3') in the sequence, left-adjacent to the conserved fragment of the STM2758 gene in the chromosome, upstream from the start of all  $\Delta$ fljAB-type deletions. Interestingly, we detected the complementary inverted sequence of these 14 nucleotides flanking the end of the third copy of IS26 on the pU302L plasmid (14). The homology in this short sequence could explain the upstream conserved insertion of IS26 in this region at the same position in all the deletion types. Analysis of nucleotide sequences downstream of the different deletions detected no homology with the end of inverted IS26, suggesting rearrangements are associated with the initial transposition event or represent recombination with other IS26s transposed downstream. In agreement with the findings of Cooper et al. (6) and Schneider et al. (16), these different genetic events (transpositions and recombinations) could take place simultaneously or successively. The mechanism and the drive to continue deleting in this region are unknown. However, it is possible for the deletions to be related to each other as a nested series.

Based on the results obtained by PFGE, MLVA, PCR, and sequencing, the *Salmonella* monophasic strains of this study seem to have maintained great homogeneity over the years. A recent study carried out with some *Salmonella* 4,5,12:i:- isolates from the United States and Spain concluded that this strain most likely represents multiple clones with distinct geographical distributions that emerged through independent deletion events (17). Our data support this hypothesis and expands the information given by Soyer et al. (17) about Spanish monophasic strains, as we studied a larger number of strains and sequenced the fragments flanking the fljAB deletions. From our data, there is not a clear link between the location of the strains, source, or year of isolation and the different profiles of resistance, fljAB deletion type, and PFGE or MLVA patterns; yet, considering we analyzed only a representative collection of strains of the Spanish clone, we cannot reject these relationships.

In summary, we hypothesize that a *Salmonella enterica* serotype Typhimurium, phage type U302, multidrug-resistant (ACSuGSTSxT) strain, defective for the allantoin-glyoxylate pathway and harboring the plasmid pU302L, could be the ancestor of the monophasic variant strains assayed in this report. However, more studies are necessary to ascertain if the  $\Delta$ fljAB1 deletion type could be the origin of the other variations or, to the contrary, if the four genetic defects arose independently.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Subvención General a Grupos de Investigación grant (GIU0820) from UPV/EHU and Consolidated Research Group Grant (IT343-10) and Saiotek Grant (S-PC09UN0) from Basque Government. L. Laorden and I. Martínez were supported by a Beca de Investigación Predoctoral grant from the UPV/EHU of Spain.

## REFERENCES

- Alvarez, J., M. Sota, A. B. Vivanco, I. Perales, R. Cisterna, A. Rementeria, and J. Garaizar. 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 42:1734-1738.
- Anderson, E. S., L. R. Ward, M. J. De Save, and J. D. H. De Sa. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Lond.)* 78:297-300.
- Barton, B. M., G. P. Harding, and A. J. Zaccarelli. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226:235-240.
- Bone, A., H. Noel, S. Le Hello, N. Pliher, C. Danan, M. E. Raguenaud, S. Salah, H. Bellah, V. Vaillant, F. X. Weill, and Jourdan-da Silva. 2010. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausages, March-May 2010. *Euro Surveill.* 15(24):pii=19592. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19592>.
- Chen, C.-Y., G. W. Nace, B. Solow, and P. Fratamico. 2007. Complete nucleotide sequences of 84.5- and 3.2-kb plasmids in the multi-antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U302 strain G8430. *Plasmid* 57:29-43.
- Cooper, V. S., D. Schneider, M. Blot, and R. E. Lenski. 2001. Mechanisms causing rapid and parallel losses of ribose catabolism in evolving populations of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* 183:2834-2841.
- Echeita, M. A., A. Aladueña, S. Cruchaga, and M. A. Usera. 1999. Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 37:3425.
- Echeita, M. A., S. Herrera, and M. A. Usera. 2001. Atypical, fljB-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* 39:2981-2983.
- Garaizar, J., S. Porwollik, A. Echeita, A. Rementeria, S. Herrera, R. M.-Y. Wong, J. Frye, M. A. Usera, and M. McClelland. 2002. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J. Clin. Microbiol.* 40:2074-2078.
- Guerra, B., I. Laconcha, S. M. Soto, M. A. Gonzalez-Hevia, and M. C. Mendoza. 2000. Molecular characterisation of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 190:341-347.
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26:2465-2466.
- Larsson, J. T., M. Torpdahl, R. F. Petersen, G. Sorensen, B. A. Lindstedt, and E. M. Nielsen. 2009. Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill.* 14(15):pii=19174. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19174>.
- Lindstedt, B. A., T. Varlund, L. Aas, and G. Kapperud. 2004. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolour capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 59:163-172.
- Mollet, B., S. Iida, J. Shepherd, and W. Arber. 1983. Nucleotide sequence of IS26, a new prokaryotic mobile genetic element. *Nucleic Acids Res.* 11:6319-6330.
- Reen, F. J., E. F. Boyd, S. Porwollik, B. P. Murphy, D. Gilroy, S. Fanning, and M. McClelland. 2005. Genomic comparisons of *Salmonella enterica* serovar Dublin, Agona, and Typhimurium strains recently isolated from milk filters and bovine samples from Ireland, using a *Salmonella* microarray. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1616-1625.
- Schneider, D., E. Duperehy, E. Coursange, R. E. Lenski, and M. Blot. 2000. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics* 156:477-488.
- Soyer, Y., A. Moreno, M. A. Davis, J. Maurer, P. L. McDonough, D. J. Schoonmaker-Bopp, N. B. Dumas, T. Root, L. D. Warnick, Y. T. Grün, and M. Wiedmann. 2009. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J. Clin. Microbiol.* 47:3546-3556.
- Turlan, C., and M. Chandler. 1995. IS1-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replicative deletions. *EMBO J.* 14:5410-5421.









