

eman ta zabal zazu

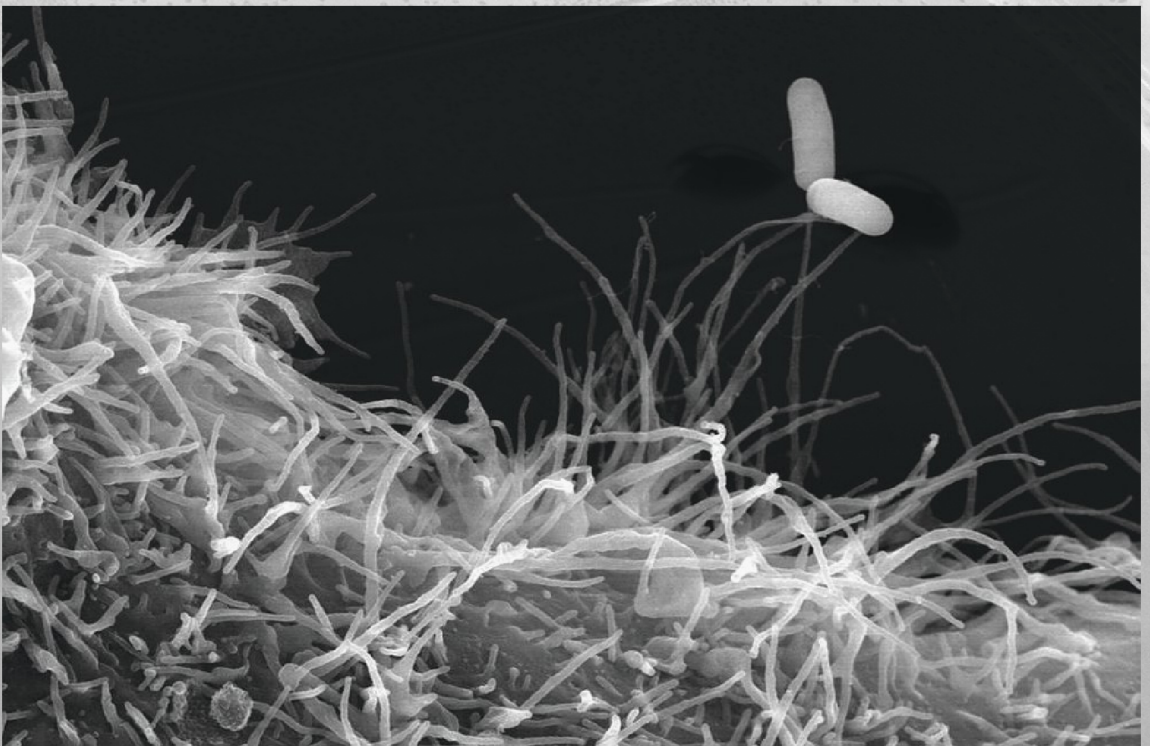


UPV EHU

Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

Departamento de Inmunología, Microbiología y
Parasitología

Caracterización molecular y epidemiológica de cepas monofásicas de *Salmonella enterica*



Lorena Laorden Muñoz

Directores:

Javier Garaizar Candina

Silvia Herrera León

Tesis Doctoral

Julio 2014

© 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: 978-84-9082-365-1**

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

**Caracterización molecular y epidemiológica de
cepas monofásicas de *Salmonella enterica*.**

LORENA LAORDEN MUÑOZ

(lorena.laorden@ehu.eus)

DIRECTORES:

Dr. JAVIER GARAIZAR CANDINA

Dra. SILVIA HERRERA LEÓN

Vitoria-Gasteiz, Julio 2014



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

En este espacio me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible que este trabajo sea una realidad.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, el Dr. Javier Garaizar Candina, Profesor titular de Microbiología y la Dra. Silvia Herrera León, responsable de la Sección de Enterobacterias del Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, por haber hecho posible este proyecto, con la continua aportación de ideas, experiencia, conocimiento e incondicional apoyo. Mi más sincero agradecimiento hacia su labor.

Quisiera agradecer al grupo de investigación del laboratorio de Microbiología I por ofrecerme la posibilidad de realizar esta tesis doctoral, por la confianza depositada en mí y por apoyarme en mi trabajo durante estos cuatro años. Especialmente, agradezco al Dr. Joseba Bikandi, Profesor titular de Microbiología y a la Dra. Ilargi Martínez, Investigadora, por su colaboración, amplia experiencia y trabajo diario, que han sido indispensables durante todo este tiempo. Al Dr. Aitor Rementería por sus consejos y recomendaciones en las partes más técnicas de este trabajo. Vosotros cinco habéis sido los pilares sobre los que se asienta esta investigación, aportando cada uno su particular sabiduría, para formar, en conjunto, un excelente equipo de trabajo.

Quiero agradecer el apoyo de todas las personas que en diferentes períodos han realizado aportaciones, consejos u apoyo sin los cuales este trabajo de investigación no hubiera sido posible. Especialmente, debo mencionar a las compañeras del departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco UPV/EHU, por aportar, de forma cercana, su apoyo profesional y humano, Maite, Ana, Zuriñe y Vane. De este mismo departamento me gustaría agradecer, de manera especial, al Dr. Andoni Ramírez por sus consejos, apoyo y bromas para amenizar los días más difíciles y, especialmente, por la interpretación y discusión de resultados (que guerra te he dado). De verdad, gracias por formarme en este campo y por el interés mostrado, por haberme enseñado y por la cantidad de tiempo invertido en aconsejarme.

Por último, agradecer a la Dra. Aurora Echeita por acogerme por primera vez en la Sección de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología en Majadahonda y haberme aconsejado en numerosos aspectos durante mis estancias tanto como responsable de la Sección como posteriormente como compañera de almuerzos. Por supuesto no puedo olvidar a todos los compañeros del laboratorio y a

las chicas de Legionella que durante mis numerosas estancias han estado siempre ahí apoyando, animando, aconsejando y compartiendo mi alegría cada vez que conseguía una “banda”. Especialmente a Vero y a Sergio, vuestro apoyo y alegría me ayudaron a superar muchos obstáculos y encontré dos buenos amigos para toda la vida.

En estas estancias hay tres personas que me ayudaron de manera muy especial acogéndome en su casa y hacia las que nunca tendré palabras suficientes para agradecerse, Sara, María Usera y finalmente Silvia, en la recta final hiciste un gran esfuerzo por mí y es algo que nunca olvidaré.

Esta investigación no hubiera dado sus frutos sin la inestimable colaboración de mis compañeros de investigación. Con sus charlas, consejos, comentarios... científicos o no, me han dado ideas, apoyo, ánimo o simplemente nos hemos reído, porque es mucho tiempo el que hemos pasado juntos, desde el “labo”, hasta viajes a congresos, cursos... La verdad es que me siento orgullosa de teneros alrededor, han sido muchas las cosas que hemos compartido. A Ilargi, Carolina, María, Toño, Andrea, Ceci, Irati, Tere y Raúl (el gran sabio que todo lo soluciona), que ya estaban aquí cuando aterricé y a los nuevos fichajes que vinieron después, Sara, Maialen, Héctor e Ylenia, sin olvidarme de Blanca.

Así mismo, quiero agradecer a mi cuadrilla por todo vuestro apoyo tras una vida juntas, ha sido mucho lo que me habéis ayudado y no tengo palabras para agradeceros tanto cariño, benetan neskak hoberenak zarete, zuen laguntzarik gabe hau ez litzateke posible izango.

A la cuadrilla de Arkaitz por vuestros ánimos y apoyo.

Y por supuesto a mi familia, aunque ajenos al trabajo, siempre cuidando de mí y consiguiendo que este motor funcione y me haga avanzar aunque a veces a trompicones siempre hacia adelante. A mis ti@s, abuel@s, prim@s y hasta al sobri nuevo y a la familia de Arkaitz que ya sois parte de mí. Hay tres personas a las que quiero dedicar esta tesis porque en cierta manera es tanto suya como mía y porque lo son todo para mí, a mi ama, Adri y en especial a ti, Arkaitz. Por no fallarme nunca, por ayudarme a tener una visión más optimista, por haberme enseñado a ser como soy, por estar siempre ahí, gracias, os quiero.

Expreso mi gratitud a los señores y señoras miembros del Tribunal por haber aceptado juzgar este trabajo.

Por último, mi manifiesta gratitud a la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU por la concesión de la Beca de Formación de Personal Investigador que he disfrutado, permitiéndome realizar este trabajo.

Resumen

La salmonelosis, producida por bacterias del género *Salmonella*, es una de las intoxicaciones alimentarias más comunes en los países desarrollados siendo la principal manifestación la gastroenteritis aguda. *Salmonella enterica* es un patógeno conocido desde el siglo XIX y en la actualidad hay descritos más de 2.500 serotipos. Sin embargo no todos han tenido la misma relevancia y por tanto, son los más frecuentemente aislados en muestras clínicas los que han recibido un control y seguimiento epidemiológico más exhaustivo. La virulencia de *Salmonella* es muy compleja y varía enormemente entre serotipos y cepas dentro de un mismo serotipo.

Si bien es cierto que la aparición de nuevas variantes monofásicas no es un evento exclusivo de los últimos años, las herramientas disponibles actualmente en biología molecular han facilitado la identificación de un mayor número de variantes no caracterizadas previamente. El trabajo de esta tesis doctoral se centró en la caracterización molecular de aislamientos de la variante monofásica 4,[5],12:i:- del serotipo Typhimurium circulantes en nuestro país así como de otros aislamientos monofásicos con importancia clínica en los últimos años: 4,5,12:b:- y 4,12:d:-, tratando de identificar su posible origen evolutivo. Del mismo modo y como segundo objetivo se planteó el ofrecer las herramientas epidemiológicas diseñadas y utilizadas en el transcurso de este proyecto de investigación para favorecer la detección, control y seguimiento de estas nuevas variantes monofásicas.

El origen y posterior evolución de las variantes caracterizadas en este trabajo son el resultado de la evolución biológica fundamentada en las mutaciones espontáneas, la selección y el aislamiento en las que puede verse

implicada la transposición de elementos genéticos móviles. Los elementos genéticos transponibles o transposones, se descubrieron por primera vez en la década de los 70 siendo la primera secuencia de inserción identificada la IS1 en *E. coli*. Las secuencias de inserción aparecían como constituyentes normales del cromosoma o de los plásmidos de las bacterias Gram-negativas. Habitualmente las IS muestran una preferencia en la inserción en determinadas regiones del ADN, lo cual sugiere que los extremos terminales de las IS pueden reconocer determinadas secuencias diana presentes en el cromosoma durante el proceso de inserción.

En este trabajo se han caracterizado cuatro colecciones de aislados con las fórmulas antigénicas 4,[5],12:i:-, 4,5,12:b:- y 4,12:d:-, mediante fagotipificación, antibiotipificación, PFGE, MLVA, PCR y secuenciación. Con los datos obtenidos se ha podido concluir que las cepas de las colecciones 1 y 2 provienen de *Salmonella* Typhimurium, sin embargo entre ellas se diferencian diferentes líneas evolutivas.

La primera colección está configurada por un clon procedente de una cepa de *Salmonella* Typhimurium U302 con plásmido pU302L y con perfil de multirresistencia R- ACSuGSTSxT, donde la tercera copia de IS26 del plásmido pU302L al reconocer una secuencia en el cromosoma originaría la delección del flagelo de segunda fase y este evento habría ocurrido al menos en tres ocasiones diferentes comenzando siempre la delección en el mismo punto. La alta homogeneidad detectada las clasifica como pertenecientes a un mismo clon denominado por otros autores como clon español. En la segunda colección se diferencian las otras dos líneas, dónde las tres primeras cepas de la colección

son muy similares a las cepas descritas en Estados Unidos y a su vez diferenciables del resto de aislados de nuestro país, señalando un origen o ancestro común con las cepas monofásicas americanas. El resto de cepas caracterizadas en la segunda colección con deleciones de menor tamaño, únicamente comparten entre ellas el perfil de tetrarresistencia y el punto final de inserción de la secuencia IS26 señalando las características principales del clon europeo. Sin embargo las diferencias mostradas por el PFGE, MLVA y PCR de la deleción muestran que no comparten un origen común próximo en el tiempo pero si están más estrechamente relacionadas entre ellas que con las otras dos líneas descritas. En esta colección se han detectado tres aislados monofásicos cuya fórmula antigénica señala la falta del flagelo de segunda fase, pero por PCR y secuenciación se comprobó que aún conservan el gen *fljB* seguido de varias secuencias IS26, estas cepas podrían ser similares al ancestro del que evolucionarían las variantes de la colección.

Las cepas de *Salmonella enterica* 4,5,12:b:- analizadas en la tercera colección de este trabajo, son variantes monofásicas provenientes de una tercera línea clonal de *Salmonella* Paratyphi B dT(+) sin resistencias a antimicrobianos, con la excepción de una cepa que no es capaz de metabolizar el tartrato (dT-), que provendría de *Salmonella* Paratyphi B dT(-). A pesar de haber caracterizado la deleción en la mayoría de los aislados no se han obtenido suficientes datos que permitan conocer el evento genético implicado en la misma. La mayoría presentan una deleción de 27 genes adyacentes al gen *fljB*, la cual pudo ser ocasionada por una transposasa, pero que posteriormente perdió parte de su estructura dejando un fragmento inservible de 281 pb. El PFGE muestra una elevada diversidad entre las cepas de esta variante. Sin

embargo dentro del pulsotipo A, las cepas presentaron una alta homología e incluso son las que presentaron la delección descrita. Entre los otros cuatro pulsotipos se engloban las cepas cuya delección no se pudo caracterizar, por lo que nos llevó a concluir que estas 10 cepas podrían pertenecer a diferentes líneas evolutivas y por lo tanto presentar diferentes tipos de delecciones de los genes implicados en la síntesis del flagelo de segunda fase.

Las cepas de *Salmonella enterica* 4,12:d:- que configuran la cuarta colección son variantes monofásicas provenientes de *Salmonella* Schwarzengrund, altamente homogéneas por lo que podrían configurar un mismo clon y en cuyo caso la delección de once genes entre los que se encuentran los genes implicados en la síntesis del flagelo de segunda fase, fue originada por una IS30. Esta variante mostro una alta homogeneidad tanto en los datos de PFGE, como antibiograma y como en el tipo de delección caracterizada. El final de la inserción de la IS30 coincide en el mismo nucleótido que el final de la inserción descrito en las cepas del clon europeo.

Finalmente como conclusión a este trabajo podemos afirmar que la zona de síntesis del flagelo de segunda fase supone un punto caliente para las inserciones de secuencias de inserción o transposones afectando a la capacidad de síntesis de la flagelina de segunda fase en cepas de *Salmonella enterica*. Sin embargo, esta deficiencia, no ha supuesto una desventaja evolutiva para este tipo de variantes.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Reseña histórica	3
2. Características generales del género <i>Salmonella</i>	4
2.1. Fisiología	4
2.2. Identificación	5
2.3. Filogenia	12
2.4. Taxonomía	15
2.5. Hábitat	17
2.6. Epidemiología	19
2.7. Patogenicidad	22
2.8. Manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento	24
2.9. Genómica	26
3. Caracterización epidemiológica de <i>Salmonella</i>.	27
3.1. Métodos de tipificación fenotípicos	28
3.1.1. Serotipificación	28
3.1.2. Perfil bioquímico	30
3.1.3. Fagotipificación	30
3.1.4. Perfil de Resistencia a antimicrobianos	31
3.2. Métodos de tipificación genotípicos	32
3.2.1. Electroforesis de gel en campo pulsante (PFGE)	32
3.2.2. Análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable (MLVA)	34
3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38

3.2.4. Secuenciación del genoma completo (Secuenciación de nueva generación, NGS)	39
4. Secuencias de inserción	42
5. Antecedentes de las cepas estudiadas	46
5.1. <i>Salmonella</i> Typhimurium	46
5.1.1. <i>Salmonella enterica</i> 4,5,12:i:-, fagotipo U302 y multirresistentes	49
5.1.2. <i>Salmonella enterica</i> 4[5]12:i:-, tetrarresistentes	51
5.2. <i>Salmonella</i> Paratyphi B	51
5.3. <i>Salmonella</i> Schwarzengrund	55
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
Aislados de <i>Salmonella enterica</i>	63
1. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> variante monofásica 4,5,12:i:- fagotipo U302. Colección nº1	64
1.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)	67
1.1.1. Preparación de los bloques de agarosa	67
1.1.2. Lisis bacteriana en los bloques de agarosa	68
1.1.3. Digestión de ADN	68
1.1.4. Electroforesis	68
1.1.5. Tinción y captura de la imagen	69
1.1.6. Análisis de los perfiles	69

1.2. Análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable (MLVA)	70
1.3. Estudio de la delección del gen <i>fljB</i>	72
1.3.1. Extracción de ADN	72
1.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación	72
1.4. Estudio de la presencia del plásmido pU302 con la secuencia de inserción IS26	75
1.4.1. Digestión con nucleasa S1	75
1.4.2. Marcaje de los concatémeros del fago lambda	76
1.4.3. Elaboración de sonda para la IS26	77
1.4.4. Hibridación con sonda para IS26	78
1.4.4.1. Tratamiento del gel PFGE-S1	78
1.4.4.2. Transferencia a membrana	78
1.4.4.3. Fijación de ADN	79
1.4.4.4. Prehibridación	80
1.4.4.5. Hibridación	80
1.4.4.6. Revelado	81
2. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> variante monofásica 4,[5],12:i:-, de diversos fagotipos. Colección n°2	82
2.1. Estudio de la delección del gen implicado en la síntesis del flagelo de segunda fase (<i>fljB</i>)	83
2.1.1. Mapeo de genes	83

2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa para la obtención de fragmentos de gran tamaño (<i>Long-PCR</i>)	86
2.1.3. Técnica de secuenciación en cadena (<i>Walking-primer</i>)	88
2.1.4. Secuenciación del genoma completo	90
3. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> variante monofásica 4,5,12:b:-. Colección nº3.	91
3.1. PCR de subespecie	92
3.2. PCR específica para la determinación de la variedad Java	93
3.3. Caracterización de la delección del gen <i>fljB</i>	94
3.3.1. PCRs para la detección de los genes <i>fljA</i> , <i>fljB</i> , <i>hin</i> , <i>iroB</i> e <i>iroC</i>	94
3.3.2. Mapeo de genes	94
3.3.3. Secuenciación inversa	95
3.4. PCR y secuenciación	99
4. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> variante monofásica 4,5,12:d:-. Colección nº4.	101
4.1. Caracterización de la delección del gen <i>fljB</i>	102
4.1.1. Mapeo de genes	102
4.1.2. Secuenciación inversa	103
4.1.3. <i>Long-PCR</i> y secuenciación	103

RESULTADOS	105
1. <i>Salmonella enterica</i> subespecie enterica variante monofásica 4,5,12:i:- fagotipo U302. Colección nº1.	107
1.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)	107
1.2. Análisis multilocus de repeticiones en tándem en número variable (MLVA)	107
1.3. Estudio de la delección del gen <i>fljB</i>	110
1.4. Estudio de la presencia del plásmido pU302 con la secuencia de inserción IS26	114
2. <i>Salmonella enterica</i> subespecie enterica variante monofásica 4,[5],12:i:-, diversos fagotipos. Colección nº2.	117
2.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)	117
2.2. Análisis multilocus de repeticiones en tándem en número variable (MLVA)	118
2.3. Estudio de la delección del gen <i>fljB</i>	120
2.3.1. Mapeo de genes	120
2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa de fragmentos largos (<i>Long-PCR</i>) y secuenciación	121
2.3.3. Secuenciación del genoma completo (NGS)	133
3- <i>Salmonella enterica</i> subespecie enterica variante monofásica 4,5,12:b:-. Colección nº3.	136
3.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)	136
3.2. PCR subespecie	138
3.3. PCR variedad Java	138

3.4. Caracterización de la delección del gen <i>fljB</i>	138
3.4.1. PCRs para la detección de los genes <i>fljA</i> , <i>fljB</i> , <i>hin</i> , <i>iroB</i> e <i>iroC</i>	138
3.4.2. Mapeo de genes	138
3.4.3. Secuenciación inversa	140
3.5. PCR y secuenciación	143
4. <i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> variante monofásica 4,5,12:d:-. Colección nº4.	144
4.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)	144
4.2. Caracterización de la delección del gen <i>fljB</i>	145
4.2.1. PCRs para la detección de los genes <i>fljA</i> , <i>fljB</i> , <i>hin</i> , <i>iroB</i> e <i>iroC</i>	145
4.2.2. Mapeo de genes	145
4.2.3. Secuenciación inversa	146
4.2.4. <i>Long-PCR</i> y secuenciación	146
DISCUSIÓN	149
CONCLUSIONES	191
BIBLIOGRAFÍA	195
TRABAJOS PUBLICADOS	221

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de serotipos reconocidos dentro de cada especie/ subespecie de <i>Salmonella</i> (Adaptado de Grimont y col., 2007)	15
Tabla 2. Genomas de <i>Salmonella</i> secuenciados completamente, disponibles en la base de datos del NCBI y utilizados en este trabajo.	27
Tabla 3. Interpretación y obtención de los patrones numéricos del MLVA, adaptado de Larsson y col. 2009.	37
Tabla 4. Colección de aislados nº1.	66
Tabla 5. Iniciadores empleados para la detección mediante PCR de repeticiones en tándem de número variable (Lindstedt y col., 2003). Modificación <i>en el marcaje</i> .	73
Tabla 6. Iniciadores diseñados para la amplificación mediante PCR de la delección del flagelo de segunda fase en la colección de cepas nº 1.	75
Tabla 7. Iniciadores diseñados para la realización de un mapa de presencia/ausencia de genes, próximos a la delección de los genes codificantes del flagelo de segunda fase en la colección de cepas nº 1, mediante PCR.	76
Tabla 8. Reactivos empleados en la fabricación de la sonda IS26.	79

Tabla 9. Colección nº2. Únicamente se muestran los 13 aislados caracterizados en el inicio.	84
Tabla 10. Iniciadores diseñados para el estudio de los aislados de la colección nº 2.	86
Tabla 11. Iniciadores diseñados para la amplificación de cada tipo de delección.	88
Tabla 12. Iniciadores diseñados para la amplificación de cada fragmento hallado en cada tipo de delección.	91
Tabla 13. Colección de aislados nº3.	93
Tabla 14. Iniciadores diseñados para la caracterización de los aislados de la colección nº 3.	97
Tabla 15. Colección de aislados nº4.	103
Tabla 16. Iniciadores diseñados para la caracterización de los aislados de la colección nº 4.	106
Tabla 15. Datos obtenidos mediante la técnica PFGE-S1 e hibridación con sonda IS26.	117
Tabla 16. Perfil de PFGE asignado y el patrón de MLVA obtenido en las 13 cepas tipificadas.	120
Tabla 17. Genes amplificados mediante PCR y el tipo de delección correspondiente.	122

Tabla 18. Se muestra los resultados de amplificación de los genes testados, tanto en los aislados monofásicos como en las cepas control.

141

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Se muestra el mecanismo de variación de fase y los genes implicados en el mismo. **10**
- Figura 2.** Evolución de *Salmonella* según McQuiston y col., 2008, representada en millones de años. **14**
- Figura 3.** Características de los serotipos generalistas, adaptados a hospedador o estrictos y su relación con el cuadro clínico. Adaptado de Feasey y col., 2012. **18**
- Figura 4.** Se muestra la delección de un VNTR. **35**
- Figura 5.** Ejemplo de diferentes VNTRs en diferentes localizaciones y con diferente número de repeticiones. **36**
- Figura 6.** Estructura de transposones simples (IS) y compuestos (Tn). **43**
- Figura 7.** Casos notificados de salmonelosis en Europa en 2008. Casos confirmados cada 100.000 habitantes. Adaptado del informe epidemiológico anual del ECDC (2008). **49**
- Figura 8.** Imagen de electroforesis capilar de Lindstedt y col. (2003). Se muestran los 5 fragmentos, obtenidos por cada pareja de iniciadores descrita en la técnica. **72**
- Figura 9.** Programa diseñado para la amplificación de fragmentos de entre 200-1.500 pb mediante PCR convencional. **75**

Figura 10. Programa de amplificación para la fabricación de la sonda IS26.	79
Figura 11. Programa optimizado para la amplificación mediante el mismo programa de PCR de los 32 genes detallados en este apartado.	85
Figura 12. Programa de amplificación diseñado según las instrucciones del fabricante para fragmentos superiores a 12 Kb, correspondiente al tampón 3 (Roche).	89
Figura 13. Programa de secuenciación.	89
Figura 14. Programa de amplificación empleado en el LNRS para la amplificación del gen <i>phoP</i> .	94
Figura 15. Programa de amplificación empleado en el LNRS para la determinación de la variedad Java.	95
Figura 16. Agrupamiento obtenido con los patrones de PFGE. Se detallan los datos de fecha de aislamiento, origen, fórmula antigénica, fagotipo, perfil de resistencia, tipo de delección hallada y resultados obtenidos mediante el MLVA (Laorden y <i>col</i> , 2010).	110
Figura 17. Tamaño y descripción de los fragmentos amplificados.	112
Figura 18. Localización de los genes próximos a la zona deletada en el genoma de la cepa <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2 y los 4	

tipos de deleciones halladas en el estudio (Laorden y <i>col.</i> , 2010).	114
Figura 19. Imágenes obtenidas en el Blast del NCBI con las zonas de interés del plásmido pU302L de <i>Salmonella</i> Typhimurium U302 y parte del gen STM2758 de <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2.	116
Figura 20. Plásmido amplificado mediante la técnica PFGE-S1 y el marcador empleado (Concatémeros del fago Λ).	118
Figura 21. Dendograma construido mediante el coeficiente de Dice y el agrupamiento por UPGMA.	119
Figura 22. Se muestra la deleción de tipo 1, en comparación con el genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2.	126
Figura 23. Se muestra la deleción de tipo 3, en comparación con el genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2.	129
Figura 24. Se muestra la deleción de tipo 4, en comparación con el genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2.	131
Figura 25. Se muestra la deleción de tipo 5, en comparación con el genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2, <i>Salmonella</i> Typhimurium T000240 y el plásmido de <i>Salmonella</i> Typhimurium pSRC27-H.	134
Figura 26. Se muestra la deleción de Tipo 2, en comparación con el genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2. Se detalla la	

delección hallada en cada una de las tres cepas completamente secuenciadas.	137
Figura 27. Dendograma construido mediante el coeficiente de Dice y el agrupamiento por UPGMA.	139
Figura 28. Se muestra el tipo de delección mayoritario hallado en las cepas objeto de estudio caracterizadas como <i>Salmonella enterica</i> 4,5,12:b:-, en comparación con los genomas de <i>Salmonella</i> Paratyphi B (dT-) y <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2, ambos del NCBI.	144
Figura 29. Dendograma elaborado mediante el coeficiente de Dice y el agrupamiento por UPGMA.	146
Figura 30. Se muestra la disposición de las diferentes secuencias halladas en el interior de la delección del flagelo de segunda fase en las cepas de la colección nº 4.	150

AD	Agua Destilada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Ampicilina
ASM	<i>American Society of Microbiology</i>
ATB	Antibiograma
A _w	Actividad del agua
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
Cef	Cefalotina
CHL	Cloranfenicol
Cip	Ciprofloxacino
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CTX	Ceftriaxona
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	Gentamicina
IR	<i>Inverted Repeat</i>
IS	<i>Insertion Sequence</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeat</i>

Abreviaturas

Kan	Kanamicina
Kb	Kilo bases
LB	Luria-Bertani-agar
LNRS	Laboratorio Nacional de Referencia de <i>Salmonella</i>
LPS	Lipopolisacárido
MLVA	<i>Multilocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis</i>
Na	Ácido nalidíxico
NA	<i>No Amplification</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NT	No tipable
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
PMN	Polimorfonucleares
PNR	Patrón No Reconocido
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SGI1	Isla Genómica de <i>Salmonella</i> 1

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

INTRODUCCIÓN

1. Reseña histórica

La infección por *Salmonella* y concretamente la fiebre tifoidea es una enfermedad conocida desde la antigüedad, y ha sido descrita en numerosas ocasiones a lo largo de la historia (Cunha, 2004). La confusión entre el tifus y la fiebre tifoidea existe desde mediados del siglo XIX, aunque investigadores de siglos previos hubieran diferenciado las dos enfermedades (Miller y Pegues, 2000; Cunha, 2004).

En 1885, Theobald Smith (1859-1934), trabajando bajo la supervisión del veterinario estadounidense Daniel E. Salmon (1850-1914), aisló el organismo que hoy en día se conoce como *Salmonella choleraesuis* del intestino de un cerdo. El bacteriólogo francés Joseph Léon Marcel Lignières (1868-1933) sugirió en 1900 que el grupo de bacterias representado por el organismo causante del cólera de origen porcino debía denominarse *Salmonella* en honor a Salmon (Ellermeier y Slauch 2006).

Georges Widal (1862-1929) en 1896 acuñó el término “aglutinina” para describir la aglutinación de las células muertas por calor del serotipo Typhi mediante suero (Reacción de Widal). Almroth Edward Wright (1861-1947) e independientemente Richard F. J. Pfeiffer (1858-1945) y Wilhelm Kolle (1868-1935), utilizaron los organismos muertos por calor para diseñar la vacuna contra la fiebre tifoidea en 1896; esencialmente es la misma vacuna que se sigue utilizando hoy en día. Elie Metchnikov (1845-1916) siguió los postulados de Koch para comprobar que el serotipo Typhi causaba la fiebre tifoidea en 1911. Fritz Kauffmann (1899-1978), extendió el trabajo de P. B. White (White,

1926), estableciendo el análisis serológico de *Salmonella* a partir de la década de 1940 (Ellermeier y Slauch 2006).

En 1948, K. Lilleengen caracterizó una serie de 25 cepas de aislamientos clínicos las cuales presentaban diferente sensibilidad a fagos. Designó a estas cepas como “Lilleengen Type” o LT1 hasta LT25 (Lilleengen, 1948). La cepa del serotipo Typhimurium LT2 es hoy en día la cepa tipo, cuyo genoma fue el primero en ser secuenciado en esta especie (McClelland y *col.*, 2001).

2. Características generales del género *Salmonella*

2.1. Fisiología

Salmonella ssp. pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos de 0,7-1,5 μm x 2-5 μm de tamaño, Gram-negativos y anaerobios facultativos (Ellermeier y Slauch 2006). Son móviles mediante flagelos de inserción peritrica, aunque existen variantes aflagelares (Selander y *col.*, 1996).

En cuanto a su fisiología, las salmonelas crecen a una temperatura óptima de 37°C aunque pueden multiplicarse en un amplio rango de temperatura de 7 a 48°C. Tienen un pH óptimo de 6,5-7,5, soportando un rango de pH entre 4,5 y 9,5. Se desarrollan bien a una actividad del agua (a_w) de 0,995 (Soto, 2002). Sin embargo, en valores bajos del orden de 0,2 como en el caso de productos deshidratados sobreviven largo tiempo, y en los alimentos puede multiplicarse hasta valores de a_w de 0,93 (Bourgeois y *col.*, 1995). Toleran elevadas concentraciones de sales biliares y su crecimiento no resulta inhibido por la presencia de colorantes como el azul de metileno, la eosina, el cristal

violeta o el verde brillante, propiedades que se utilizan para el diseño de medios selectivos y diferenciales.

2.2. Identificación

La identificación de *Salmonella* requiere un aislamiento, una caracterización bioquímica y la serotipificación. Las pruebas bioquímicas que se utilizan para identificar presuntivamente a los aislados de *Salmonella* son la catalasa (positiva) y la oxidasa (negativa), la fermentación de la glucosa y otros carbohidratos (con la producción usualmente de gas), la producción de sulfhídrico, la actividad lisindescarboxilasa, la capacidad de crecimiento en agar citrato de Simmons, la no producción de indol y la capacidad de hidrólisis de la urea. No crecen en medio de cianuro potásico y son Voges-Proskauer y triptófano desaminasa negativas (Mejía, 2003).

La serotipificación de *Salmonella* se basa en la estructura antigénica del antígeno somático O (termoestable), del antígeno flagelar H (termolábil) y del antígeno capsular Vi (si está presente). La serología es únicamente útil en las cepas confirmadas bioquímicamente como *Salmonella*, porque los antisueros presentan reacciones cruzadas con otras bacterias. La asignación de serotipos se basa en el esquema de Kauffmann-White-Le Minor (Grimont y Weill, 2007).

Antígeno O (AgO)

Este antígeno somático es de naturaleza lipopolisacárida y está situado en la membrana externa de la pared celular, es termoestable y alcohol resistente. El lipopolisacárido (LPS) es un determinante de virulencia importante de la mayoría de bacterias Gram-negativas (Luk y

col., 1993). La estructura química del LPS de *Salmonella* está compuesta por tres regiones: la región I, la más externa, compuesta por una cadena de azúcares (polisacárido) constituye el antígeno O, la región II es el núcleo formado por oligosacáridos y la región III que es el lípido A (Lüderitz y *col.*, 1966). El lípido A es la zona más interna, tiene propiedades tóxicas y se denomina a menudo endotoxina (Perry, 1992). El Lípido A ancla toda la molécula del LPS en la membrana externa de la pared celular bacteriana y está altamente conservada en muchos géneros. El núcleo oligosacárido (*core*) tiene sólo una variación conocida en todas las especies de *Salmonella* hasta ahora estudiadas (Luk y *col.*, 1993). Por el contrario, las cadenas de polisacáridos O se forman por polimerización de unidades repetidas que contienen entre tres y siete azúcares distintos y son antigénicamente muy variables (Mayer y *col.*, 1989). Tal variación antigénica en la estructura de la cadena O ha sido la base para la clasificación serológica de *Salmonella* (Luk y *col.*, 1993). Por lo tanto, cada serotipo de *Salmonella* posee diferentes Ag O, algunos de los cuales son comunes a varias de ellas, permitiendo asociarlas en serogrupos.

Existen Ag O mayores o factores principales que sirven para caracterizar los diferentes grupos antigénicos o serogrupos; así el antígeno O:12 está presente en todas las salmonelas de los serogrupos A, B y D. También existen Ag O menores o factores secundarios, ligados a un factor principal. Los Ag O menores no tienen ningún valor discriminativo, algunos se originan por cambios químicos de un

antígeno mayor, como O:5 que se produce por acetilación en el polisacárido responsable de la especificidad del O:4,12 característico del serogrupo B. Otros se producen por conversión fágica. Así, por ejemplo, la lisogenización de una *Salmonella* del grupo C1 (O:6,7) por un fago determina la aparición del factor O:14 pasando a ser O:6,7,14; lo mismo sucede con los factores O:6,14 en el grupo K (O:18), que pasan a ser O:6,14,18 (Soto, 2002).

Un defecto en la síntesis del polisacárido de la pared celular puede provocar una variación en la célula dando paso a la forma conocida como rugosa (R, *rough*, mutante) en comparación con la forma común suave-lisa (S, *smooth*, *wild-type* cepa natural o de referencia). Este defecto se debe a una mutación que bloquea el efecto de una transferasa o una sintetasa implicada en la síntesis de azúcares. Los mutantes pueden ser fácilmente reconocibles, por producir colonias planas y rugosas en comparación con las colonias convexas y lisas (o suaves) producidas por los progenitores. En medio líquido las formas R aglutinan espontáneamente y sedimentan, en contraste con las suspensiones uniformemente turbias de las formas S. Los mutantes R han perdido su especificidad O, pero mantienen la especificidad del antígeno flagelar (H) (Lüderitz y *col.*, 1966).

Antígeno H

La mayoría de las cepas de *Salmonella* son móviles mediante flagelos peritricos. Los flagelos están expuestos en la superficie de la célula y son altamente inmunogénicos. Cómo en el caso del antígeno O,

los dominios de las subunidades flagelares expuestos en la superficie celular presentan una considerable variación. De hecho, las subespecies I, II, IIIa y VI son bifásicas, y por tanto capaces de producir dos flagelos (y algunas veces tres), funcionalmente equivalentes pero inmunológicamente distintos. La distinción serológica entre los antígenos H constituye el segundo apartado del esquema de Kauffmann-White-Le Minor (Guibourdenche y *col.*, 2010).

Los antígenos H de fase 1 son designados con una letra minúscula de “a” a “z” y a continuación “z1”, “z2”, “z3”, etc. Los antígenos flagelares de fase 2 se asignan mediante números “1”, “2”, “3”, etc o mediante letras (Ellermeier y Slauch 2006). Los antígenos H suelen ser determinados mediante un ensayo de aglutinación en tubo o en porta. Inicialmente se realiza una aglutinación con antisueros H mixtos. Estas mezclas de antisueros se han diseñado para ser utilizadas con ciertos grupos de antígenos O, ya que representan los antígenos H más comúnmente asociados a ciertos grupos O (Brenner y McWhorter-Murlin, 1998).

En la mayoría de las cepas ambos antígenos H, es decir fase 1 y 2, pueden ser expresados alternativamente. Sin embargo, en colonias frescas aisladas individualmente sólo pueden expresar una fase. Para determinar la otra fase, se puede realizar un cambio de fase. Para ello se inoculara la cepa de interés en un medio de agar-movilidad que contiene el antisuero H conocido con el cual se produce aglutinación. Los anticuerpos del suero inmovilizarán las células que expresen el antígeno

H original, permitiendo la movilidad de las cepas que realicen un cambio de fase y expresen un nuevo antígeno H. Los descendientes de estas últimas cepas, podrán difundir y alejarse del lugar del inóculo. Estas cepas podrán ser entonces aisladas y de este modo poder determinar el nuevo antígeno flagelar. Si la cepa inoculada en un principio no presenta movilidad en presencia del antisuero H, puede significar que la cepa sea monofásica y no pueda expresar un segundo antígeno flagelar.

Variación de fase

La variación de fase se define como un cambio en la expresión de los antígenos de superficie en las bacterias. En general la variación de fase es un evento reversible y que puede ser modulado por factores externos. Esta variación de fase se asocia a un interruptor reversible entre todo/nada (*on/off*), donde en el momento de expresar un antígeno se realiza la represión de la otra opción.

Los genes *fliC* y *fljB* codifican las flagelinas de fase 1 y de fase 2 respectivamente. Sin embargo, estos genes se encuentran localizados en el genoma en dos zonas diferentes y alejadas, formando parte cada una de ellas de un operon distinto. En el operon *fljBA* se localiza al gen *hin*, el cual codifica la recombinasa Hin; el gen *fljB*, codifica la flagelina de segunda fase; y el gen *fljA*, codifica la proteína represora del gen *fliC*, situado en otro operon. La recombinasa Hin cataliza una inversión reversible de un segmento de 993 pb del cromosoma bacteriano, el cual contiene el promotor del operon *fljBA*. En una orientación el promotor

dirige la transcripción de los genes *fljB* y *fljA*, y gracias al *fljA*, se induce la represión del gen *fliC*. Sin embargo, si la orientación del gen *hin* se encuentra invertida, no se lleva a cabo la transcripción de los genes *fljB* y *fljA*, los cuales no llegarán a expresarse, no se codificará la flagelina de fase 2, y en ausencia del represor codificado por el gen *fljA*, se llevará a cabo la transcripción del gen *fliC*, permitiendo la expresión de la flagelina de fase 1 (Herrera-León y col., 2004).

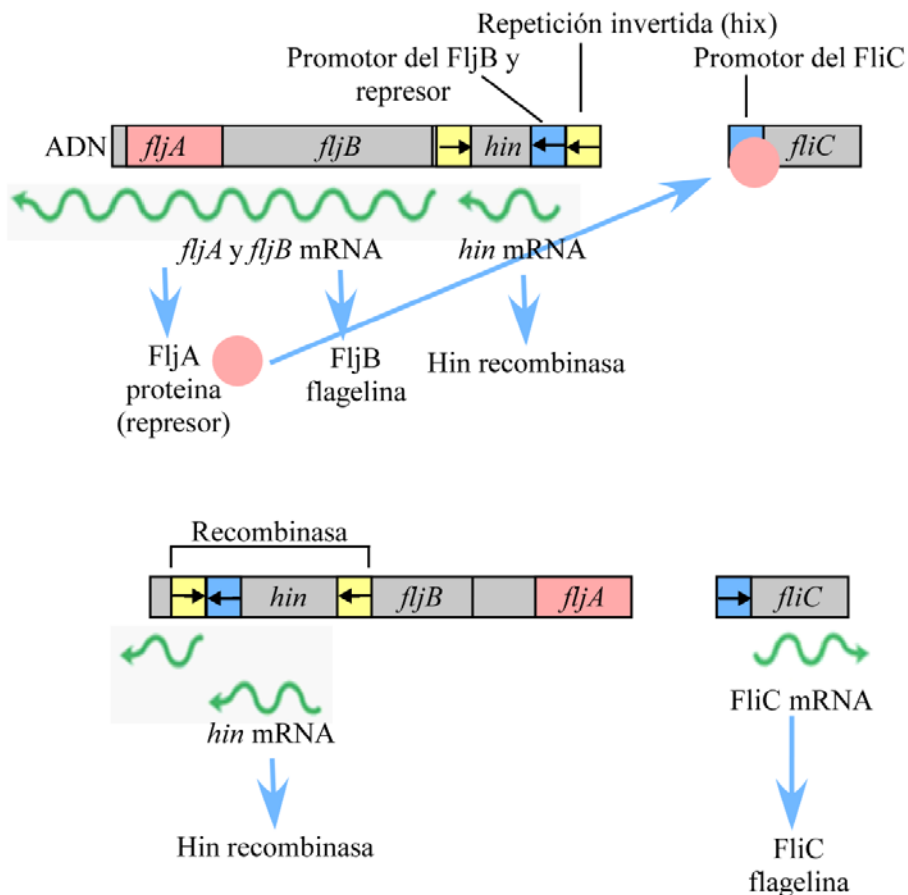


Figura 1. Se muestra el mecanismo de variación de fase y los genes implicados en el mismo.

Antígeno Vi

El antígeno Vi es un polisacárido capsular producido por cepas de los serotipos Typhi y Paratyphi C y en ocasiones por cepas del serotipo Dublin. La capsula es un homopolímero lineal de α -1,4 2-deoxi-2-*N*-ácido urónico acetilgalactosamina que puede ser O-acetilado en la posición C-3 (Daniels y *col.*, 1989). Las enzimas que realizan la síntesis y exportan la capsula se codifican en la denominada “*víaB* locus” la cual está compuesta por 10 genes (*tviA-E* a *vexA-E*).

La presencia de la capsula Vi se determina mediante aglutinación en porta. En base a los análisis bioquímicos si una cepa es sospechosa de pertenecer a los serotipos Typhi o Paratyphi C, se realiza la aglutinación con el antisuero Vi y se realiza también con el antisuero O apropiado. Sin embargo, la presencia de la capsula puede bloquear el reconocimiento del anticuerpo del antígeno O. Por ello y con el fin de realizar una determinación adecuada del antígeno O, si una cepa es positiva para el antígeno Vi, se realiza una ebullición de la cepa en agua durante 15 min, se enfría y se vuelve a realizar la aglutinación. En este caso no aglutinará con el antígeno Vi y siendo del serotipo Typhi será positiva para la aglutinación del antígeno O del grupo D (Ellermeier y Slauch 2006).

2.3. Filogenia

Salmonella es miembro de la familia Enterobacteriaceae, en la subdivisión o clase III Gamma-proteobacteria. Actualmente se reconocen dos especies de *Salmonella*: *Salmonella bongori* (antigua subsp. V) y *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies (*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). La clasificación de *Salmonella* queda de la siguiente manera:

DOMINIO: Bacteria

FILO: Proteobacteria

CLASE: γ -Proteobacteria

ORDEN: Enterobacteriales

FAMILIA: Enterobacteriaceae

GÉNERO: *Salmonella*

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

La disponibilidad de genomas completos secuenciados (McClelland y col., 2001; Parkhill y col., 2001) ha facilitado el estudio de la evolución de *Salmonella* y su relación con otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. Trabajos publicados por varios investigadores (Selander y col. 1996; Baumler y col., 1998; Edwards y col., 2002; Porwollik y col., 2002; Chan y col., 2003; McQuiston y col., 2008) permiten reconstruir un modelo general de la historia evolutiva del género *Salmonella*. En base a estos trabajos hubo una divergencia

entre *Salmonella* y *Escherichia coli* hace unos 120 millones de años, coincidiendo con la aparición de los primeros mamíferos. Aproximadamente hace 25-40 millones de años, el ancestro común de *Salmonella* adquirió la isla de patogenicidad 1 (SPI1) la cual codifica el sistema de secreción de tipo III implicado en la invasión del epitelio intestinal. De este modo *Salmonella* pasó a ser un patógeno intracelular asociado a vertebrados de sangre fría. Entre 40-63 millones de años, *Salmonella* adquirió la isla de patogenicidad 2 (SPI2) la cual permite al organismo sobrevivir en el interior de los macrófagos y de éste modo colonizar los tejidos internos. Este evento dio lugar a la división entre las dos especies actualmente reconocidas. La presencia de SPI2 es una característica aparentemente exclusiva en *Salmonella enterica*. Las seis subespecies de *Salmonella enterica* (I, II, IIIa, IIIb, IV, VI) continuaron evolucionando para adecuarse a sus respectivos nichos. Hace 21-34 millones de años, el ancestro de las subespecies I, II, IIIb y VI adquirió la capacidad de realizar un cambio de fase de las subunidades estructurales del flagelo mediante la adquisición del operón *fljAB*. El ancestro de la subespecie I, adquirió la capacidad de colonizar vertebrados de sangre caliente, lo cual supuso un avance importante, con serias implicaciones para la salud humana. Las cepas de la subespecie I han evolucionado para colonizar una gran variedad de hospedadores. Algunos serotipos como Typhi son específicos e infectan únicamente al hombre, sin embargo serotipos como Typhimurium son generalistas capaces de colonizar y causar enfermedad en diversas especies de mamíferos (Ellermeier y Slauch 2006).

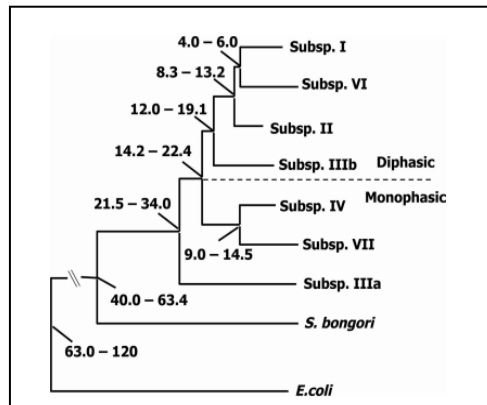


Figura 2. Evolución de *Salmonella* según McQuiston y col., 2008., representada en millones de años.

En el año 2004 Shelobodina y col., propusieron el nombre de *Salmonella subterranea* para una nueva cepa aislada en la superficie de un sedimento contaminado, y que presentaba mediante el análisis de la secuencia de ADN_r de la subunidad 16S, una gran similitud con *Salmonella bongori* y con *Enterobacter cloacae*. Aunque el nombre fue validado en el año 2005, el laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* de Estados Unidos, del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), ha determinado que esta nueva especie no es una especie de *Salmonella* pues presenta mayor proximidad al género *Escherichia* (Grimont y col., 2007).

2.4. Taxonomía

La nomenclatura de *Salmonella* siempre ha estado en constante cambio (Brenner y col. 2000, Euzéby 1999). Hasta mediados del siglo XX las especies de *Salmonella* se describían asociándolas a la enfermedad. De ahí los nombres de *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis. Kauffman (Kauffmann, 1941; Kauffmann, 1966, Kauffmann, 1971) amplió el trabajo de White (1926) estableciendo el análisis serológico de *Salmonella* y argumentó que la fórmula antigénica era “buena o incluso mejor” que el nombre de la enfermedad asociada, para nombrar a los serotipos (Kauffmann 1971). Los descubrimientos posteriores recibieron los nombres de los lugares de aislamiento del organismo como *Salmonella* London, *Salmonella* Paris y *Salmonella* Casablanca. Actualmente hay más de 2.500 serotipos de *Salmonella* (Grimont y col., 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Número de serotipos reconocidos dentro de cada especie/subespecie de *Salmonella* (Adaptado de Grimont y col., 2007)

Número de serotipos en cada especie y subespecie	
<i>Salmonella enterica</i>	2.557
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1.531
<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
<i>Salmonella bongori</i>	22
Total (género <i>Salmonella</i>)	2.579

Le Minor, Popoff y colaboradores (Le Minor y *col.*, 1982; Le Minor y *col.*, 1986) propusieron un único nombre para la especie: *Salmonella choleraesuis* con siete subespecies reconocidas. Se reconocieron los serotipos de la subespecie I, por ejemplo *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* serotipo Typhimurium o *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraeuis* serotipo Typhi. Sin embargo dada la posible confusión al utilizar *Salmonella choleraesuis* para indicar al organismo que causa diferentes enfermedades, como por ejemplo el serotipo Choleraesuis frente al serotipo Typhi, Le Minor y Popoff (1987) propusieron el nombre de *Salmonella enterica* para designar las especies y la cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I) serotipo Typhimurium LT2 como la cepa tipo. La cepa LT2 es la cepa tipo 2 de Lilleengen (Lilleengen, 1948) y está extremadamente bien caracterizada tanto genéticamente, cómo bioquímicamente. La propuesta fue unánimemente aceptada por el Subcomité de enterobacterias del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática en el XIV Congreso Internacional de Microbiología (Penner, 1988). Posteriormente Reeves y *col.* (1989) propusieron elevar a *Salmonella bongori* al estatus de especie en base a la caracterización molecular. Esta nomenclatura es la actualmente aceptada por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) y el Centro de Referencia de *Salmonella* responsable de la actualización del Esquema de Kauffmann-White (Instituto Pasteur) (Popoff y Le Minor, 1997; Popoff y *col.*, 2001b) (Tabla 1). Los serotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* se escriben con letras románicas, sin cursiva y la primera letra en mayúscula. Los serotipos de otras subespecies son designados mediante su

fórmula antigénica. En los últimos años se han aceptado abreviaturas como *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, o *Salmonella* Typhimurium, o simplemente serotipo Typhimurium. En esta tesis y con el fin de facilitar la lectura, a partir de este punto se utilizará la denominación *Salmonella* Typhimurium.

En las fórmulas antigénicas de los serotipos de *Salmonella*, primero se escribe el antígeno O, seguido del Vi (si está presente), y del antígeno(s) H, primero de fase 1 y luego de fase 2. Los antígenos principales se separan mediante dos puntos y los antígenos individuales por comas. Por ejemplo el serotipo Typhimurium está determinado por la fórmula antigénica 1, 4, [5], 12: i: 1, 2. Los antígenos entre corchetes indican que su presencia es variable.

2.5. Hábitat

Salmonella vive principalmente en el tracto intestinal de los animales. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* habita en los animales de sangre caliente, mientras que otras subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* son comensales de animales de sangre fría que raramente infectan al ser humano. Los serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* pueden dividirse en tres grupos en base a sus hospedadores. En primer lugar están los **adaptados a un huésped**, los cuales infectan principalmente a un único hospedador pero pueden causar la enfermedad en otros. En segundo lugar se encuentran los **estrictos** de un único huésped los cuales sólo pueden infectar a un hospedador. Finalmente los **generalistas** son capaces de infectar a una gran variedad de animales, aunque la evolución de la enfermedad puede variar en los diferentes hospedadores (Uzzau y col., 2000; Edwards y col., 2002).

La infección por *Salmonella* a menudo conduce a una gastroenteritis. Sin embargo, para sobrevivir en su hábitat, *Salmonella* puede persistir o vivir como comensal al menos en algunos huéspedes y ser eficientemente transmitido de hospedador en hospedador. No se conoce mucho acerca del mecanismo molecular para persistir como comensal (Kingsley y col. 2003) aunque la persistencia y diseminación del organismo está definido genéticamente, tal y como lo evidencian algunas cepas emergentes en todo el mundo, como aquellas del serotipo Typhimurium DT104 (Davis y col., 2002) y el serotipo Enteritidis PT4 (Guard-Petter y col., 2001). En general, los serotipos generalistas, poseen un repertorio genético general que les permite estar adaptados a una amplia gama de hospedadores siendo los cuadros clínicos que provocan más leves que los causados por los serotipos estrictos (Fig. 3).

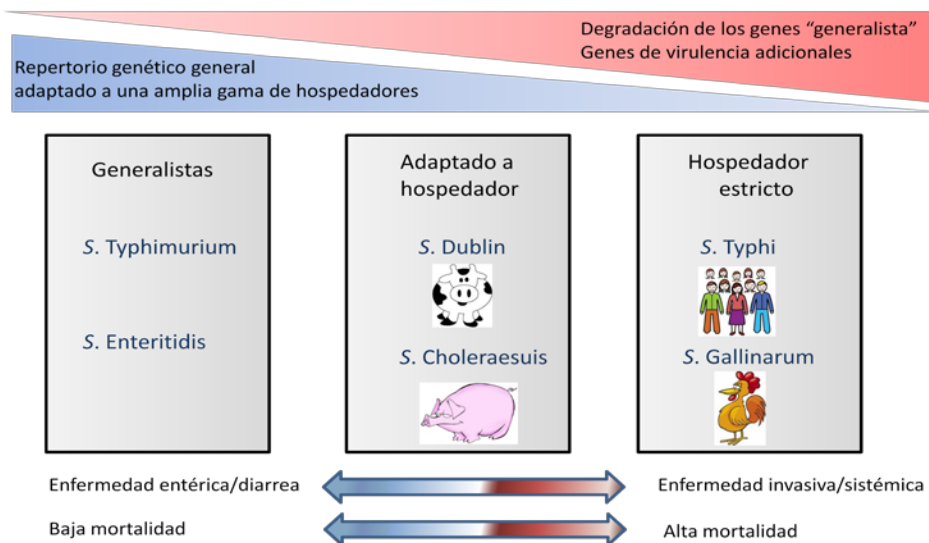


Figura 3. Características de los serotipos generalistas, adaptados a hospedador o estrictos y su relación con el cuadro clínico. Adaptado de Feasey y col., 2012.

Los dos serotipos más frecuentes causantes de enfermedad en humanos son generalistas: *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, mientras que el serotipo causante del cuadro clínico más grave, *S. Typhi*, es estricto.

2.6. Epidemiología

La salmonelosis está relacionada con la ingesta de alimentos o aguas contaminadas y es de gran importancia epidemiológica. Así, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente se producen 16 millones de casos y 600.000 muertes de fiebre tifoidea en todo el mundo (Mandell y *col.*, 2006). Por otro lado se estima que *Salmonella enterica* es responsable de alrededor de 1 millón de casos de enterocolitis y de 400 muertes al año solo en Estados Unidos (Scallan y *col.*, 2011).

Aunque ya no es habitual en los países desarrollados, la fiebre tifoidea es común en los países de baja renta y puede tener consecuencias muy serias o hasta mortales. Su principal ruta de transmisión es la contaminación del agua con heces humanas. La fiebre tifoidea puede alcanzar una tasa de mortalidad 10 veces superior a otras salmonelosis.

El informe anual de 2012, sobre zoonosis y brotes de origen alimentario en la Unión Europea (UE), de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), muestra un descenso en los casos de *Salmonella* en un 9% en 2010, marcando un descenso por sexto año consecutivo (EFSA, 2012). Según el informe, las principales razones de la disminución de los casos de salmonelosis humana son los exitosos programas de control de *Salmonella* en la UE para

reducir la prevalencia de la bacteria en las poblaciones de aves de corral, en particular en las gallinas ponedoras. Las infecciones por *Salmonella*, que por lo general causan fiebre, diarrea y calambres abdominales, representaron 99.020 casos notificados en humanos en 2010 en comparación con los 108.618 casos de 2009. *Salmonella* se encontró con mayor frecuencia en la carne de pollo y pavo. Según el informe, en 2010, en la UE se registraron un total de 5.262 brotes transmitidos por alimentos. Estos brotes notificados afectaron a más de 43.000 personas y causaron 25 muertes, sin embargo, estas cifras pueden ser en realidad más altas debido a la falta de notificación. Las causas más frecuentes fueron *Salmonella* (31% de todos los brotes), Norovirus (15%) y *Campylobacter* (9%). Las fuentes alimentarias más importantes de los brotes fueron los huevos y los ovoproductos, comidas precocinadas y vegetales. La importancia de los vegetales como fuentes de brotes aumentó respecto a años anteriores.

S. Enteritidis y *S. Typhimurium* son los serotipos más comunes en los países desarrollados y causan principalmente salmonelosis, una enfermedad intestinal auto limitante pero también pueden causar la muerte. Existen varios reservorios de animales que contribuyen a la contaminación ambiental, incluyendo pollos, pavos, cerdos, vacas y otros animales domésticos y salvajes. Las mascotas, incluyendo a los reptiles, pájaros, gatos, perros y otros animales de sangre caliente y fría, pueden servir como portadores de este organismo.

A pesar de que *Salmonella* se elimina fácilmente al cocinar los alimentos, muchos son ingeridos crudos (frutas y verduras), o no bien cocidos (huevos, carne picada). Es importante mantener una higiene adecuada antes y

durante la preparación de alimentos, para prevenir la contaminación de los productos alimentarios. Los alimentos cocinados a 70°C durante al menos 10 minutos son considerados aptos si son consumidos inmediatamente, o si se mantienen almacenados a menos de 8°C. Las infecciones por *Salmonella* son más frecuentes en verano que en invierno, probablemente debido a que el ambiente cálido es más favorable para el crecimiento de los microorganismos en los alimentos. La incidencia de salmonelosis es mayor en las épocas de lluvias en los climas tropicales y de mayo a octubre en los climas templados.

A finales del siglo pasado y principios del presente, en los países industrializados, se registró un aumento progresivo de aislamientos de *Salmonella* en humanos. Este aumento pudo ser debido a los nuevos métodos de procesamiento de alimentos en masa y a su distribución en amplias zonas geográficas, así como a un mejor informe de los casos a los laboratorios de referencia. Los datos internacionales indican una incidencia estimada de salmonelosis de entre 14 y 120 casos por 100.000 personas.

Actualmente en nuestro país, las infecciones por *Salmonella* son la segunda causa de gastroenteritis bacteriana detrás de *Campylobacter*. Sin embargo, son la principal causa de brotes de transmisión alimentaria. En los datos recogidos en el Informe Anual del Sistema de Información Microbiológica (Centro Nacional de Epidemiología y Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2009), en el año 2009 se notificaron 4.302 casos de *Salmonellas* no tifoideas. El serotipo más frecuente fue *Salmonella* Enteritidis (36,8%) seguido de *Salmonella* Typhimurium (21,9%).

2.7. Patogenicidad

La virulencia de *Salmonella* es muy compleja y varía enormemente entre serotipos y cepas dentro de un mismo serotipo. La adaptabilidad y la variabilidad de *Salmonella* garantiza la existencia de una cepa adecuada y disponible para colonizar cualquier huésped a la mínima oportunidad (EFSA, 2010). La habilidad que tiene *Salmonella* para sobrevivir en diversas condiciones y superar múltiples defensas de los hospedadores requiere de varios factores de virulencia, que a su vez, requieren de un sistema apropiado de regulación.

La salmonelosis humana puede clasificarse en dos grandes grupos; por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoideos con presencia de bacterias en la sangre y, por otro lado, las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas (Parra y col., 2002).

La infección por *Salmonella* se produce comúnmente a causa de la ingestión de agua o productos contaminados. Los alimentos contaminados ingeridos han de contener entre 10^5 y 10^8 células viables para derivar en la colonización del intestino delgado y grueso. La aparición de la enfermedad ocurre de 8 a 48 h después de la ingesta. *Salmonella* debe sobrevivir en numerosos hospedadores del medio ambiente así como superar diversas defensas del hospedador para poder producir infección.

Las islas de patogenicidad poseen una variedad de genes encargados de la invasión. La adherencia de la bacteria es un factor muy importante en la patogénesis, y esta se lleva a cabo gracias a que produce varios tipos de adhesinas (Salyers y Whitt, 2002). La primera barrera que debe superar son las condiciones ácidas del estómago de los hospedadores. Tras pasadas las condiciones de pH ácido la bacteria coloniza el intestino, donde halla sus dianas específicas e invade las placas de Peyer distales (Carter y Collins, 1974). Las bacterias pueden acceder al tejido linfático vía células M (células epiteliales endocíticas) y células epiteliales no endocíticas, utilizando la isla de patogenicidad 1 (SPI1), y el sistema de secreción tipo tres (TTSS). *Salmonella* es la única especie que se conoce que posee dos sistemas de secreción tipo III, codificados por dos islas de patogenicidad distintas (SPI1 y SPI2). Cada uno de los sistemas parece jugar papeles diferentes pero importantes en la patogénesis de la bacteria; SPI1 está implicado en la penetración inicial de la bacteria, mientras que SPI2 es importante para los siguientes estadios de la infección (Hueck 1998).

En el estudio de la causa de diarrea, se ha descubierto la implicación de los sistemas de secreción tipo III en *Salmonella*, los cuales son los encargados de transferir las proteínas necesarias para producir una diarrea al interferir en la función celular. Como consecuencia de esta irrupción en el metabolismo, las células infectadas producen citoquinas que atraen a los polimorfonucleares (PMNs) y estos liberan prostaglandinas que actúan sobre la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc que interrumpen la absorción de Na^+ y el aumento de la secreción de Cl^- , lo que lleva a una pérdida de agua por parte de la célula, signo claro de una diarrea (Salyers y Whitt, 2002).

Mediante la isla de patogenicidad SPI2, *Salmonella* una vez accede al tejido linfático subyacente, continúa la replicación en las placas de Peyer. Eventualmente se diseminan a otros órganos diana como el hígado y el bazo donde pueden continuar con su replicación en el interior de los macrófagos llegando incluso a provocar septicemia o la muerte del hospedador. La replicación en el interior de los macrófagos requiere un segundo sistema de secreción TTSS, codificado por SPI2. A medida que el número de células va en aumento, *Salmonella* puede infectar todos los tejidos del organismo. En determinadas ocasiones el hospedador muere como resultado de complicaciones a causa de un shock séptico o un fallo multiorgánico proceso denominado como fiebre tifoidea asociado al serotipo Typhi.

2.8. Manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento

Salmonella origina en el ser humano una variedad de infecciones como son la gastroenteritis, la fiebre tifoidea o paratifoidea, la bacteriemia (primaria o secundaria a enteritis) o la infección focal no digestiva (osteomielitis, absceso) y además existe el estado de portador crónico asintomático.

Salmonelosis no tifoideas (gastroenteritis o enterocolitis). Habitualmente presenta un cuadro febril, con dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea de características inflamatorias, apareciendo leucocitos polimorfonucleares en el examen en fresco de las heces (Sánchez, 2006). El diagnóstico se realiza mediante la observación clínica de los síntomas, el informe del consumo reciente de alimentos y por el cultivo del microorganismo a partir de las heces. Los síntomas incluyen escalofríos, vómitos y diarrea, seguido de fiebre durante varios días. Esta enfermedad normalmente desaparece

sin intervención en 2 o 3 días. Sin embargo, incluso después de la recuperación, los pacientes presentan *Salmonella* en las heces durante varias semanas. Algunos pacientes se recuperan y se transforman en asintomáticos, pero portan microorganismos durante meses o incluso años, resultando en portadores crónicos. En el caso de que las bacterias se diseminen hacia el exterior del tracto intestinal, se producen cuadros clínicos coincidentes con el lugar de localización: septicemia, meningitis etc. Las gastroenteritis por salmonelosis no tifoideas no suelen tratarse con antibióticos salvo en casos de pacientes inmunodeprimidos (neonatos, ancianos, enfermos de SIDA, leucemia, linfoma, drepanocitosis, presencia de enfermedad cardiovascular, prótesis o cuerpos extraños) o en los casos de infecciones extra-intestinales.

Fiebre tifoidea. Esta enfermedad está provocada por cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhi. El reservorio de *Salmonella* Typhi es el hombre, de modo que el medio de transmisión es de persona a persona. El paciente suele presentar un proceso febril, persistente, generalmente sin sintomatología importante, pero que afecta al estado general, o acompañado de un cuadro tóxico y que se detecta sobre todo en pacientes procedentes de países de baja renta o en caso de viajeros. El diagnóstico diferencial de la fiebre tifoidea, en función de la sintomatología predominante, puede suponer: gripe, neumonía bacteriana, meningoencefalitis, apendicitis, colecistitis, hepatitis vírica aguda, enfermedad inflamatoria intestinal, linfoma, brucelosis, rickettsiosis, endocarditis bacteriana, tuberculosis miliar o mononucleosis infecciosa (Sánchez, 2006). En el caso de fiebre tifoidea el tratamiento se basa en fluoroquinolonas o cefalosporinas de tercera generación. La mortalidad se acerca al 15% en los casos no tratados.

Fiebre paratifoidea. La fiebre paratifoidea tiene ciertas similitudes con la fiebre tifoidea, pero tiene un curso más benigno. Esta enfermedad está ocasionada por los serotipos Paratyphi A, Paratyphi B y Paratyphi C. Las infecciones por *S. Paratyphi A* son comunes en África y Asia, la Paratifoidea B es más frecuente en Europa y se presenta como una gastroenteritis severa y la Paratifoidea C es una infección generalmente vista en el Extremo Oriente que se presenta como una septicemia.

2.9. Genómica

Desde el año 2001 se conoce la secuencia del genoma completo de la cepa LT2 del serotipo Typhimurium (McClelland y col., 2001). En la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) había hasta el año 2013 disponibles 11 genomas de *Salmonella* completamente secuenciados y anotados y al menos 125 proyectos de secuenciación de genomas completos de diversos serotipos de *Salmonella*. Sin embargo en 2014, el número de genomas de *Salmonella enterica* completamente secuenciados es mayor de 50, siendo un número que crece exponencialmente mes a mes. Esta accesibilidad en los genomas facilita la labor investigadora de nuevas variantes de *Salmonella*.

El genoma de la cepa LT2 es de 4.857 kilobases (kb), con 4.489 secuencias que codifican numerosas proteínas putativas. El ADN tiene un contenido de 53% de G+C. Además, presenta el plásmido de virulencia pSLT, de unas 94 kb, con 108 regiones codificantes de proteínas putativas. El plásmido pSLT es autotransmisible (Ahmer y col., 1999a) y está relacionado

con otros plásmidos de virulencia asociados a las cepas no tifoideas de la subespecie *enterica*.

Tabla 2. Genomas de *Salmonella* secuenciados completamente, disponibles en la base de datos del NCBI y utilizados en este trabajo.

Serotipo disponible	Nº cepa	Nº acceso	Referencia
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	LT2	NC_003197	McClelland y col., 2001
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	T000240	AP011957	Izumiya y col., 2013
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	08-1736	CP006602	Strain y col., 2013
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Paratyphi B	SPB7	CP000886	McClelland y col., 2014
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Schwarzengrund	CVM19633	CP001127	Fricke y col. 2014

En la realización de la presente tesis doctoral, el genoma completo de la cepa LT2 ha supuesto la base para el diseño de iniciadores específicos empleados en la caracterización de las cepas tipificadas. Gracias a las nuevas herramientas y tecnologías de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*), la obtención de genomas completamente secuenciados es un hecho constatado y con un coste no demasiado elevado lo que ha mostrado el increíble aumento de más de 50 genomas completamente secuenciados y disponibles actualmente, que en breve tiempo aumentarán considerablemente y facilitarán el conocimiento genómico de éste microorganismo.

3. Caracterización epidemiológica de *Salmonella*.

La incidencia que *Salmonella* presenta en la salud humana refleja la importancia de la detección, control y seguimiento de los casos, así como de su

posterior información a las autoridades sanitarias competentes. Para ello es necesaria la clasificación intraespecie, la cual se obtiene mediante los denominados “métodos de tipificación”, basados en la aplicación de marcadores epidemiológicos para subdividir una determinada especie en tipos, cepas o clones, y a su vez, agrupar estos en clusters, líneas clonales o grupos genómicos. De esta forma, aislamientos bacterianos individuales, incluso los obtenidos en diferente tiempo y lugar, pueden determinarse como relacionados al presentar idénticos resultados mediante los métodos de tipificación.

La infección por *Salmonella* es una de las enfermedades entéricas principalmente implicadas en brotes causados por alimentos contaminados, por lo que es una de las primeras bacterias zoonóticas sometidas a tipificación. En *Salmonella*, la serotipificación es el método de tipificación más empleado. Actualmente disponemos de varios métodos de tipificación fenotípicos y genotípicos. A continuación se detallan los empleados en el presente trabajo.

3.1. Métodos de tipificación fenotípicos

3.1.1. Serotipificación

Aunque la serotipificación no es una técnica rutinaria en los laboratorios de diagnóstico, es una referencia obligada en los estudios epidemiológicos de salmonelosis.

El fundamento teórico de la técnica basado en el análisis de los antígenos O, H y Vi, ya ha sido explicado anteriormente. Por lo tanto a continuación se describirá únicamente el fundamento práctico. La serotipificación, es la técnica que detecta que antígenos están presentes en cada

cepa. Como se ha mencionado anteriormente, las cepas de *Salmonella* tienen en su pared celular antígenos somáticos “O” y flagelares “H”, que a su vez se dividen en dos grupos, de primera fase flagelar y segunda fase flagelar. Algunos serotipos también tienen una cápsula “Vi”. Un serotipo de *Salmonella* viene determinado por una combinación particular de los antígenos anteriormente definidos. La técnica se basa en la microaglutinación de la bacteria frente a antisueros específicos, generalmente comerciales, para determinar su fórmula antigénica.

Determinación del antígeno somático: Existen dos tipos de antisueros, los polivalentes y monovalentes. En primer lugar se analiza la aglutinación con los antisueros polivalentes que contienen una mezcla de anticuerpos frente a varios factores O, y en segundo lugar se realiza la aglutinación con los antisueros monovalentes que contienen el anticuerpo que aglutina con un antígeno somático en concreto.

Determinación de los antígenos flagelares: La aglutinación de los flagelos se realiza en dos fases. En primer lugar se realiza la aglutinación frente al antígeno flagelar que la célula bacteriana está expresando en un momento concreto (ya sea de primera o segunda fase). A continuación se lleva a cabo el denominado “cambio de fase” que consiste en la siembra de *Salmonella* en un medio de cultivo semisólido al que se añaden anticuerpos frente a la fase que se acaba de detectar. Sólo las células que expresen la fase flagelar contraria podrán moverse y extenderse a lo largo de la placa. Es en el borde de este nuevo crecimiento donde se lleva a cabo la detección de la fase complementaria. Al

igual que con el somático, existen dos tipos de antisueros, polivalentes y monovalentes.

3.1.2. Perfil bioquímico

El perfil bioquímico facilita la identificación de *Salmonella* frente a otras enterobacterias que hayan podido ser aisladas conjuntamente en los medios selectivos empleados. La técnica se basa en la utilización de una serie de pruebas específicas que permitirán realizar una diferenciación de la bacteria en base a su metabolismo o conjunto de reacciones bioquímicas. Las pruebas específicas comúnmente empleadas son: Ureasa, Oxidasa, Catalasa, Vogues-Proskauer, TSI, Citrato de Simmons, SIM (*Sulfide-indol-motility*), fenilalanina desaminasa, fermentaciones de azúcares etc. Cabe destacar, que con frecuencia se utilizan sistemas comerciales de identificación bioquímica como el sistema API (bioMérieux Inc., Durham, NC), con un período de identificación estimado de 21 horas. Este tipo de técnicas han evolucionado rápidamente desde su aparición, aumentando la eficacia de la identificación de los métodos tradicionales (Stager y *col.*, 1992).

3.1.3. Fagotipificación

Las cepas pertenecientes a un mismo serotipo de *Salmonella*, pueden presentar diferente sensibilidad o resistencia a la lisis producida por una serie concreta de bacteriofagos. El fagotipo o lisotipo es de gran valor epidemiológico, ya que existe un alto porcentaje de correlación entre el fagotipo y el origen epidémico. En general, al igual que el serotipado, la técnica de fagotipado por su elevada complejidad, no se lleva a cabo de forma rutinaria en todos los laboratorios. Además los lotes de fagos no son de fácil acceso y por

estos motivos solo se realiza en laboratorios de referencia. (Threlfall y col., 1994, Low y col., 1997, Angulo 1997, Glynn y col., 1998).

El resultado de esta técnica puede variar al existir diferentes mecanismos que pueden provocar un cambio en el fagotipo. También es recomendable que esta técnica sea llevada a cabo por la misma persona para intentar mantener el mismo criterio. A pesar de estas dificultades, se ha demostrado que en *Salmonella* la fagotipificación es más estable y discriminatoria que otros métodos fenotípicos, y actualmente se emplea en los laboratorios de referencia como marcador epidemiológico secundario para algunos serotipos como Typhi, Typhimurium, Enteritidis, Hadar y Virchow (De la Torre, 2006)

3.1.4. Perfil de resistencia a antimicrobianos

Mediante esta técnica se determina el perfil de resistencia de un microorganismo frente a un antibiótico o antimicrobiano determinado. Este método es utilizado en el diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas para conocer el perfil de antibióticos con los que puede ser tratada la infección. La resistencia a antimicrobianos es variable, por el hecho de que los genes que determinan la resistencia a los mismos suelen encontrarse en elementos genéticos móviles, como puede ser el caso de un plásmido, que al no ser esenciales para el crecimiento de la bacteria están sujetos a una presión selectiva en su transmisión de una generación a otra. El hecho de que se produzca esta ganancia o pérdida de genes que determinen la resistencia a antimicrobianos facilita la aparición de cepas que frente a otros métodos de tipificación presenten diferencias y sin embargo muestren idéntico perfil de

resistencia, e incluso cepas idénticas frente a otros métodos de tipificación pueden presentar diferentes perfiles de resistencia.

3.2. Métodos de tipificación genotípicos

3.2.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)

La manipulación y el análisis de ADN son fundamentales en el campo de la biología molecular. Las técnicas estándar de electroforesis en gel permitían la separación de fragmentos de ADN en base a su tamaño. Sin embargo resultaban muy limitantes para migrar fragmentos mayores de 15-20 kilobases (kb). La capacidad de separar fragmentos de pesos distintos en un campo eléctrico y continuo se pierde cuando se trata de separar moléculas de gran tamaño. En 1984, en la Universidad de Columbia, Schwartz y Cantor, desarrollaron una variación en el protocolo estándar, mediante la introducción de un gradiente de voltaje alterno para mejorar la resolución de los fragmentos de mayor tamaño (Gardiner 1990). Esta técnica se conoce como Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) y es una de las técnicas “*Gold Standard*” en la tipificación de *Salmonella* (Olsen y col., 1994).

La innovación en la técnica de electroforesis implicó una utilización diferente de los pulsos eléctricos a lo largo de la carrera del gel. De este modo, se emplean campos eléctricos no constantes que alternan su dirección. La frecuencia con la que se produce el cambio de dirección del pulso eléctrico, determina la clase de tamaño del fragmento que migrará a lo largo del gel. Si el ADN se fuerza a cambiar de dirección durante la electroforesis, fragmentos de distintos pesos moleculares empezarán a separarse entre ellos. Con cada reorientación del campo eléctrico, los fragmentos de ADN más pequeños se

moverán hacia la nueva dirección con mayor rapidez que los fragmentos de mayor tamaño. Durante el transcurso de la electroforesis los fragmentos de mayor tamaño se quedarán en la parte superior del gel separándose de los de menor tamaño.

Por otro lado, la técnica de PFGE consiste en digerir el ADN total de la bacteria mediante enzimas de restricción específicas de corte poco frecuente (Swaminathan y *col.*, 2001), para posteriormente realizar la separación de los fragmentos de diferente tamaño, siguiendo un protocolo concreto de pulsos eléctricos. Como resultado, se obtienen una serie de bandas de diferente tamaño, las cuales representan un patrón o perfil concreto de cada cepa. El patrón de bandas obtenido facilita la identificación de la bacteria y permite su caracterización y comparación en las bases de datos, hecho fundamental en la investigación de brotes alimentarios. Esta técnica puede ser aplicada para determinar el tamaño aproximado del genoma, para determinar el polimorfismo del genoma o mapa de restricción genómico (perfil-PFGE), para establecer relaciones de proximidad genética entre cepas y para mapear plásmidos, genes, locis e islas genómicas en los perfiles de PFGE.

En 1995, Barton y *col.*, publicaron una variante del método de PFGE, denominada S1-PFGE. Esta variante, posibilita la detección de plásmidos de gran tamaño que hasta ese momento eran difícilmente detectados mediante los kits comerciales empleados para el análisis del perfil plasmídico. En este método la digestión se realiza con la nucleasa S1 que linealiza los plásmidos y no digiere el ADN cromosómico, manteniéndose este al margen de la fragmentación que se lleva a cabo en el protocolo convencional de PFGE.

Cabe destacar, que existen dos limitaciones importantes en el PFGE, el alto coste que implica el equipo necesario para la realización de la misma y el tiempo necesario para la obtención de los resultados. Sin embargo, en 1996 el Centro para el Control de Enfermedades (CDC, *Center for Disease Control and Prevention*) procedió a la estandarización de esta técnica, para el programa de vigilancia denominado PulseNet (*The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance*), por su capacidad en la obtención de patrones de restricción, su alta especificidad y reproducibilidad entre los distintos laboratorios. En la actualidad en la tipificación de *Salmonella* se lleva a cabo el sistema estandarizado por *PulseNet International* permitiendo caracterizar prácticamente la mayoría de cepas patógenas (De la Torre, 2006).

3.2.2. Análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable (MLVA)

Esta técnica desarrollada recientemente es un método de tipificación bacteriana basado en la variabilidad de los VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), o ADN repetitivo. Muchos genes o regiones intergénicas contienen locis de ADN repetitivo denominados VNTR (King y *col.*, 1997). Estos VNTRs han sido detectados en prácticamente todas las especies procariotas y eucariotas y se han utilizado con éxito con fines de identificación (van Belkum y *col.*, 1998). Una clase evidente de estos genes bacterianos son los que codifican componentes de la superficie microbiana (Rivas y *col.*, 2004). En 1996 se investigó el gen que codifica la proteína A de unión a la inmunoglobulina de diversas cepas de *Staphylococcus aureus* y se observó un VNTR con una unidad de repetición de 21 nucleótidos de largo y que entre las

diferentes cepas, el número de repeticiones variaba de 1 a 15 copias (Frenay y col., 1996). En 1995 se realizó el primer inventario de locis de ADN repetitivo a gran escala del genoma, el cual se definió en base al genoma de *Haemophilus influenzae* (Fleischman y col., 1995). Basándose en la secuencia de *H. influenzae* y la variabilidad de las repeticiones, se desarrolló la primera metodología basada en el análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable (MLVA) (van Belkum y col., 1997 a, b). Al estudiar la velocidad de evolución de los diferentes locis de repetición, observaron que la velocidad era variable, y por lo tanto, algunas repeticiones fueron más adecuadas para el rastreo epidemiológico de *H. influenzae* que otras (van Belkum, 2006).

La variación del ADN repetitivo sucede con facilidad debido al pequeño tamaño de las unidades de repetición. Cuando estas unidades son copiadas por la ADN polimerasa, puede producirse una hibridación de bases ilegítima. Esta hibridación no correspondiente obliga a la ADN polimerasa a introducir o a suprimir unidades de repetición. La frecuencia de estos errores depende también de la exactitud de los sistemas de reparación del ADN (Caporale, 2003). Se ha sugerido en muchas ocasiones que esta variación de la repetición ofrece ventajas selectivas (Wise y col., 2006).

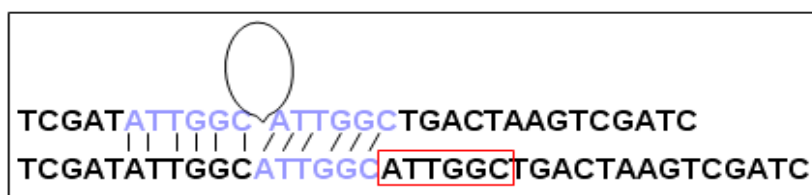


Figura 4. Se muestra la delección de un VNTR.

El rápido aumento de genomas secuenciados ha permitido el diseño de iniciadores específicos para amplificar estas repeticiones en diferentes bacterias, entre ellas *Salmonella*. Por ello, este método de tipificación se ha desarrollado para casi todas las especies bacterianas de importancia médica. Todos los genomas de bacterias contienen múltiples locis de ADN repetitivo. Sin embargo los tamaños de las unidades de repetición pueden variar entre cepas de una misma especie microbiana (6 pb, 9 pb, 33 pb...) y el número de unidades que se repiten también es variable, parámetro definido y específico para cada cepa. De esta manera para un mismo tipo de VNTR, cepas del mismo serotipo pueden tener diferente número de repeticiones. La evaluación experimental de esta variabilidad aplicada a una serie de locis (VNTRs) diferentes se denomina MLVA. La técnica consiste en la amplificación directa de locis (VNTRs) específicos mediante PCR.

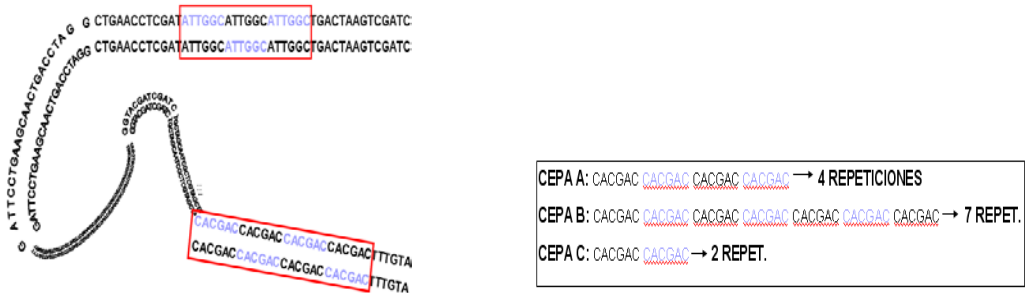


Figura 5. Ejemplo de diferentes VNTRs en diferentes localizaciones y con diferente número de repeticiones.

En 2003, Lindstedt y *col.*, desarrollaron el sistema de MLVA para *Salmonella enterica ssp. enterica*, más sofisticado hasta el momento (van Belkum, 2006). Seleccionaron un conjunto de 8 (STTR 1, STTR 2, STTR 3, STTR 4, STTR 5, STTR 6, STTR 7 y STTR 8) regiones de repetición que van

en tamaño de 6 pb a 189 pb. El número de unidades repetidas por cada región, varía de entre 2 a 15 copias. Como novedad, etiquetaron los productos de PCR fluorescentemente para la separación mediante electroforesis capilar, la cual ofrece una alta precisión en ofrecer el tamaño exacto de cada producto. En el 2004 perfeccionaron la técnica para *Salmonella Typhimurium* (Lindstedt y col., 2004), incluyendo 2 nuevos VNTRs (STTR 9 y STTR 10pl) para ofrecer una mayor precisión a la hora de tipificar las cepas analizadas. Asignaron a cada tamaño un alelo para poder transformar los resultados en valores numéricos y de este modo obtener patrones numéricos en cada cepa, los cuales facilitan el intercambio de datos entre laboratorios. En 2009, Larsson y col., realizaron modificaciones para mejorar el análisis e interpretación de la técnica (Tabla 3).

Tabla 3. Interpretación y obtención de los patrones numéricos del MLVA, adaptado de Larsson y col. 2009.

Iniciador	Producto	Unidad de repetición		Nº de alelos	Tamaño de productos
					Tipo de alelos
STTR 9	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
STTR 5	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
STTR 6	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
STTR 10 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
STTR 3	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. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Banks Mullis en 1986, hecho que le condujo a la obtención del Premio Nobel en Química en 1993. Sin embargo existen controversias sobre si él fue el inventor único del principio de la PCR. En 1971, Kleppe y *col.* describió por primera vez un método en el que replicaba pequeñas secuencias de ADN mediante enzimas y cebadores. Sin embargo, este temprano ejemplo del principio básico de la PCR no recibió mucha atención.

La técnica de PCR consiste en la amplificación “in vitro” de un fragmento concreto de ADN mediante repetidos ciclos de desnaturalización del ADN para la separación de ambas hebras, un anillamiento entre los iniciadores y el ADN molde y una elongación de los fragmentos amplificados. Para ello es fundamental la utilización de iniciadores o cebadores de ADN específicos, también conocidos como *primers*, que sean complementarios a los extremos de la región que se quiere amplificar. Sin embargo, en los años 80, el éxito fundamental de ésta técnica fue la utilización de una ADN polimerasa termoestable frente a elevadas temperaturas, puesto que las temperaturas necesarias para la separación de las dos hebras de ADN superan los 94°C y las polimerasas que se utilizaban en un principio se desnaturalizaban en cada ciclo de replicación. Por ello, el descubrimiento en 1976 de la Taq polimerasa, de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* eliminó los inconvenientes del método de la PCR. Este descubrimiento permitió automatizar el proceso, acoplándolo al uso del termociclador.

Para llevar a cabo el proceso de replicación del fragmento de ADN son necesarios el ADN molde, dNTPs, una ADN polimerasa termoestable, MgCl₂, H₂O y uno o dos iniciadores. Los ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación se repiten un número concreto de veces, durante los cuales los fragmentos de ADN amplificados sirven como molde para la amplificación de los posteriores, permitiendo una amplificación exponencial del fragmento elegido.

En la actualidad, existen un sinnúmero de tipos de PCR, como es el caso de la *Long-PCR* y de la PCR-inversa utilizadas en la presente tesis doctoral. El uso de diferentes enzimas termoestables (algunas de las cuales permiten la corrección de errores, otras ciclos de mayor duración...) y la combinación de las mismas permiten el diseño de la *Long-PCR*. Por otro lado, la PCR inversa permite realizar la PCR cuando sólo es conocida una secuencia interna, o un gen en concreto. Resulta de gran utilidad en la identificación de secuencias que flanquean insertos genómicos.

3.2.4. Secuenciación del genoma completo (Secuenciación de nueva generación, NGS)

El genoma es la totalidad de la información genética que posee un organismo o una especie en particular. El método por el que se obtiene una secuencia del genoma completo se conoce como secuenciación del genoma completo (WGS, *whole genome sequencing*). Las investigaciones que incluyen la secuenciación de nueva generación muestran un camino efectivo para descubrir las variaciones del genoma (Sabat y col., 2013). Estas tecnologías de NGS (*Next Generation Sequencing*) son también conocidas como

“Secuenciación de segunda generación”. Este término es utilizado para diferenciarlo de la secuenciación de primera generación basada en el método Sanger. La clara ventaja de las NGS frente a la secuenciación mediante el método Sanger es la capacidad de generar millones de fragmentos o *reads* de aproximadamente 35-700 pb de longitud, en un único *run*, y a un precio comparativamente bajo. Para poder construir una secuencia completa de nucleótidos del genoma, es necesario ensamblar múltiples secuencias cortas, que se solapen (ensamblaje *de novo*), o mediante comparaciones con genomas previamente secuenciados y disponibles en las bases de datos.

La secuenciación completa del genoma se está convirtiendo en los últimos años en una potente e importante herramienta para las investigaciones epidemiológicas y en un futuro cercano la tecnología WGS utilizada de rutina en los laboratorios clínicos permitirá realizar una identificación precisa y caracterización de los aislados bacterianos (Sabat y *col.*, 2013). Sin embargo, el principal desafío radica en la dificultad que supone computarizar e interpretar rápidamente la información relevante del gran número de datos que se obtienen en la WGS. Por otro lado, los fragmentos que se obtienen mediante esta tecnología son relativamente cortos, lo cual puede provocar que la unión de los fragmentos en el orden correcto en la secuenciación *de novo* sea una empresa difícil. De todas maneras, la secuenciación completa del genoma no suele suponer una secuenciación de más del 90% del genoma, porque se suelen producir huecos o intervalos a la hora de ensamblar los *contigs*, a causa de las repeticiones dispersas o dispuestas en tándem a lo largo del genoma. Aunque el montaje produce secuencias más largas, también conlleva el riesgo de la creación de *contigs* quiméricos, en particular, en hábitats con especies

estrechamente relacionadas o con secuencias altamente conservadas a través de especies (por ejemplo, con transposasas, fagos y la transferencia horizontal de genes). Además, el montaje puede distorsionar la información obtenida, como cuando se obtienen numerosas secuencias repetidas en una especie, se pueden superponer y serán identificadas como pertenecientes a la misma zona del genoma y, en consecuencia obtener unos resultados erróneos. Una alternativa es rastrear todas las lecturas que constituyen un determinado *contig* (o genes), y realizar un mapa con la información obtenida. El poder disponer de genomas completamente secuenciados para la comparación facilita enormemente la labor. Por otra parte, la combinación de varios buscadores de genes, el estudio de las regiones intergénicas y de los genes adyacentes son estrategias comunes para superar al menos algunas de estas limitaciones (Teeling y Glöckner, 2012).

Inicialmente, el pirosecuenciador 454/Roche fue el más utilizado, ya que generaba secuencias (*reads*, lecturas) mucho más largas que las plataformas de la competencia. Mientras tanto, en particular los proyectos a gran escala del metagenoma incrementan el uso de la plataforma Illumina y, en menor medida, la plataforma SOLiD. Aunque estas dos últimas todavía proporcionan lecturas más cortas que la pirosecuenciación, ofrecen un rendimiento mayor y por lo tanto un aumento de la cobertura, por el mismo precio (Teeling y Glöckner, 2012). El coste de la secuenciación del genoma completo está disminuyendo considerablemente año tras año (Armengaud, 2013).

Las herramientas de secuenciación de última generación, han hecho posible la secuenciación rápida de numerosos genomas microbianos. Por lo que para la mayoría de aplicaciones en microbiología, las máquinas más rápidas y

compactas, serán preferibles a las máquinas de gran tamaño y de alta capacidad diseñadas para la secuenciación humana. Dos de estas plataformas, el Ion torrent PGM e Illumina MiSeq, las cuales utilizan la amplificación en los primeros pasos de la secuenciación, están comenzando a ser ampliamente utilizadas por los microbiólogos (Didelot y *col.*, 2012). La última generación de secuenciadores, continuarán impulsando el campo de la metagenómica, y quién sabe si en algún momento las tecnologías del futuro como el transistor de ADN de IBM / Roche, revolucionarán el campo de nuevo.

4. Secuencias de inserción

Las mutaciones espontáneas, la selección y el aislamiento son elementos fundamentales en la evolución biológica (Arber, 1991). La evolución o desarrollo de las funciones de un gen pueden ser el resultado de procesos de reordenamiento del ADN y de alteraciones en las secuencias nucleotídicas causadas por sustituciones de nucleótidos y pequeñas deleciones locales, inserciones y duplicaciones, a veces producidas por la transposición de elementos genéticos móviles (Arber 1990 y 1991).

Los elementos genéticos transponibles o transposones, se descubrieron por primera vez en maíz en un trabajo realizado por Barbara McClintock en la década de los 50 (Klug y Cummings, 1999). Los transposones bacterianos pueden ser simples o compuestos. En un transposón simple aparece el gen que codifica para la transposasa flanqueado por secuencias repetidas de orden inverso. Esta estructura se denomina secuencia de inserción (*Insertion Sequence*, abreviatura IS). Los transposones compuestos consisten en genes cuya función no está relacionada con el proceso de inserción (por ejemplo

genes de resistencia a antimicrobianos) flanqueados por secuencias de inserción (Fig.6) (Klug y Cummings, 1999).

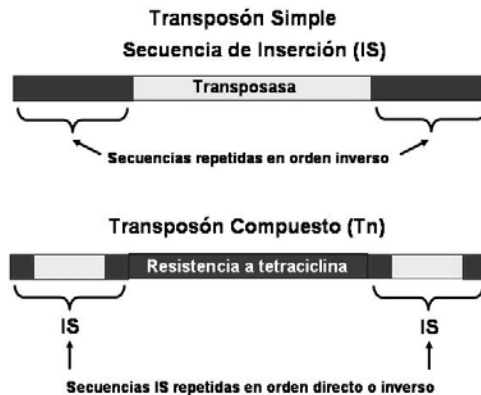


Figura 6. Estructura de transposones simples (IS) y compuestos (Tn).

Las primeras secuencias de inserción se descubrieron en la década de los 70 por diferentes investigadores, realizándose la primera observación (detección) en las IS de *E. coli* (Kleckner, 1977). En los trabajos realizados referentes al descubrimiento y estudio de las características de las IS, concluyeron que el efecto de la inserción de las IS era hereditario, y que la mutación no era de un par de bases, si no que un segmento específico y relativamente corto de ADN se había insertado en el cromosoma bacteriano. Cuando este segmento se escindía espontáneamente del cromosoma bacteriano, se recuperaba la función silvestre (Klug y Cummings, 1999). Posteriormente se descubrieron otros segmentos que se comportaban de forma similar, puesto que se insertaban en el cromosoma afectando funciones génicas. Los fragmentos eran relativamente cortos, no superando en general las 2.000 pares de bases (pb)

de longitud. La primera secuencia de inserción que se descubrió fue la IS1 identificada en *E. coli*, con una longitud de 800 pb. Las secuencias de inserción aparecían como constituyentes normales del cromosoma o de los plásmidos de las bacterias Gram-negativas. El cromosoma de *E. coli* K12 contiene al menos 8 copias de IS1, 5 copias de IS2 y 3 copias de IS3. La IS1 se detectó también en *Salmonella Typhimurium* y en *Citrobacter freundii* hace más de 30 años (Kleckner, 1977).

Las secuencias de inserción aparte de ser longitudinalmente pequeñas son muy compactas, por lo que generalmente no codifican ninguna otra función que no sea la de su propia movilidad. Por ello la estructura de las IS ha de mostrar una característica importante para su movilidad. En cada extremo, la secuencia nucleotídica se compone de Repeticiones Terminales Invertidas (ITR), las cuales varían en tamaño de una IS a otra (18 a 40 pb). Estas ITR son una parte esencial de los mecanismos de inserción de las IS en el ADN (Madigan y col., 2009). La parte que mejor define a las IS es la enzima que codifica su posición, la transposasa. Normalmente esta codificada por uno o dos genes que ocupan prácticamente la totalidad de la IS (Mahillon y Chandler, 1998). Por ello las secuencias de inserción se definen como pequeños segmentos de ADN (<2.5kb), con una organización genética simple, capaces de insertarse en múltiples lugares de una molécula diana (Mahillon y Chandler, 1998).

Habitualmente las IS muestran una preferencia en la inserción en determinadas regiones del ADN, lo cual sugiere que los extremos terminales de las IS pueden reconocer determinadas secuencias diana presentes en el

cromosoma durante el proceso de inserción (Klug y Cummings, 1999). Esta preferencia de inserción en zonas “calientes” o diana del ADN ha sido ampliamente estudiada por diferentes investigadores, como es el caso de Halling y Kleckner en 1982, los cuales concluyen que el transposón Tn10 se inserta preferentemente en concretos “hotspots”.

En la actualidad hay descritas más de 500 ISs, detectadas en 73 géneros diferentes, los cuales representan 159 especies bacterianas dentro de *Eubacterias* y *Archae*. En un estudio realizado por Mahillon y Chandler en 1998, clasificaron 443 ISs en 17 familias, basándose en combinaciones de los siguientes criterios: (i) similitud en su organización genética; (ii) marcas idénticas o similares en sus transposasas; (iii) similares terminaciones (IRs); y (iv) similitud en su secuencia nucleotídica diana, generando una duplicación de tamaño determinado. De este modo se clasificaron las 443 secuencias de inserción entre las familias IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS30, IS66, IS91, IS110, IS200/IS605, IS256, IS630, IS982, IS1380, ISAs1 e ISL3.

La secuencia de inserción IS1, se describió por primera vez en *E. coli*. Tiene una longitud aproximada de 768 pb y la longitud de sus IR (repeticiones invertidas) varía de 18 a 23 pb. En la familia IS1 hay clasificadas 14 secuencias de inserción.

En el caso de la secuencia IS3, también se detectó por primera vez en *Escherichia coli*, pero en este caso la longitud es de 1.258 pb. Sus terminaciones invertidas (IR), son de 29-40 pb. La familia IS3 engloba a 6 secuencias de inserción diferentes.

La IS26, fue descrita por Mollet y *col.* en 1983, y dadas sus similitudes con la IS6 fue posteriormente clasificada en la familia IS6. La IS26 tiene una longitud de 820 pb, donde sus IR son de 14 pb.

Finalmente, la IS10, descrita por primera vez en *Salmonella* Typhimurium y clasificada en la familia IS4. Su longitud asciende hasta 1.329 pb, y sus terminaciones rondan las 17-22 pb.

5. Antecedentes de las cepas estudiadas

En la presente tesis doctoral se ha realizado un estudio de 4 variantes procedentes de 3 serotipos de *Salmonella enterica* relevantes epidemiológicamente en nuestro país en los últimos años. Por ello se detalla a continuación una breve introducción de cada uno de ellos.

5.1. *Salmonella* Typhimurium

Las cepas descritas como *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium poseen la fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:1,2 siendo por tanto los antígenos somáticos: 1,4,5,12 y presentando dos fases de los antígenos H: en la fase 1, el “i” y en la fase 2, “1, 2”.

Salmonella Typhimurium es uno de los serotipos de *Salmonella* más frecuentes causantes de infecciones en todo el mundo, responsable de millones de infecciones y muertes en la población humana cada año. *S.* Typhimurium es una causa común de intoxicación alimentaria por *Salmonella*. Como su nombre indica, produce una enfermedad similar a la fiebre tifoidea en los

ratones. En los seres humanos *S. Typhimurium* no causa la enfermedad severa como *S. Typhi*, y normalmente no es fatal.

Entre los años 2000 y 2002, el serotipo *Typhimurium* representaba un 20%, de los 232.442 casos informados en Europa (Gatto y *col.*, 2006). En 2008, la salmonelosis pasó a ser la segunda zoonosis con mayor frecuencia en humanos, con 131.468 de casos confirmados en la UE. Los casos causados por *S. Enteritidis* disminuyeron notablemente, mientras que hubo aumento en los casos de *S. Typhimurium*. En ese año, se observó una disminución importante en la prevalencia de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* en las gallinas ponedoras, siendo el primer año en que los Estados miembros implementaron los nuevos programas de control en esta población animal (EFSA, 2010). En el informe de la EFSA de 2010, se describió una disminución de 2.088 casos de *S. Typhimurium* con respecto al año 2009. Sin embargo cabe resaltar que en las cifras de 2009 se incluían los datos de las cepas monofásicas de *Salmonella Typhimurium*, datos que en 2010 aparecen por separado (EFSA, 2011a, 2012a).

A pesar de que el reservorio principal de *S. Typhimurium* sea el cerdo, se ha detectado este serotipo en numerosas fuentes de origen animal, como pueden ser pollos de engorde, gallinas ponedoras, pavos, etc. (EFSA 2011). En el informe de 2009 (EFSA 2010) se menciona la aparición de *S. Typhimurium* DT191 en 237 casos humanos, donde el reservorio de este fagotipo fueron serpientes del maíz alimentadas con ratones importados a la UE desde EE.UU. (Harker y *col.*, 2011). Rara vez se ha detectado *Salmonella* en otros alimentos como productos lácteos, frutas y verduras (exceptuando en Estados Unidos).

Sin embargo, en algunos brotes se notificaron niveles altos de contaminación en hierbas y especias (EFSA, 2010).

Los casos de *S. Typhimurium* están en su mayoría asociados con el consumo de carne de cerdo contaminada, aves de corral y carne bovina. La transmisión ocurre a menudo cuando los organismos se introducen en las zonas de preparación de alimentos y se permite que se multipliquen en los alimentos, por ejemplo, debido a temperaturas inadecuadas de almacenamiento, cocción inadecuada o la contaminación cruzada de alimentos listos para el consumo. El organismo también puede transmitirse a través del contacto directo con animales o humanos infectados o ambientes contaminados con materia fecal.

La distribución geográfica de *Salmonella Typhimurium* es muy amplia, al ser un patógeno diseminado por todo el mundo. Según informes del ECDC, la incidencia notificada de infección por *Salmonella* ha disminuido constantemente desde 2004, el índice de casos más alto se da en la República Checa, Eslovaquia, Hungría y Lituania, aunque también ha disminuido sustancialmente en estos países en los últimos años (Figura 7). Sin embargo, pese a su amplia distribución, y descenso en número de casos, la mayoría de casos notificados de infección por *Salmonella* sigue siendo en niños menores de 5 años, y el mayor índice de casos se detecta en los meses de agosto y septiembre (ECDC 2011).

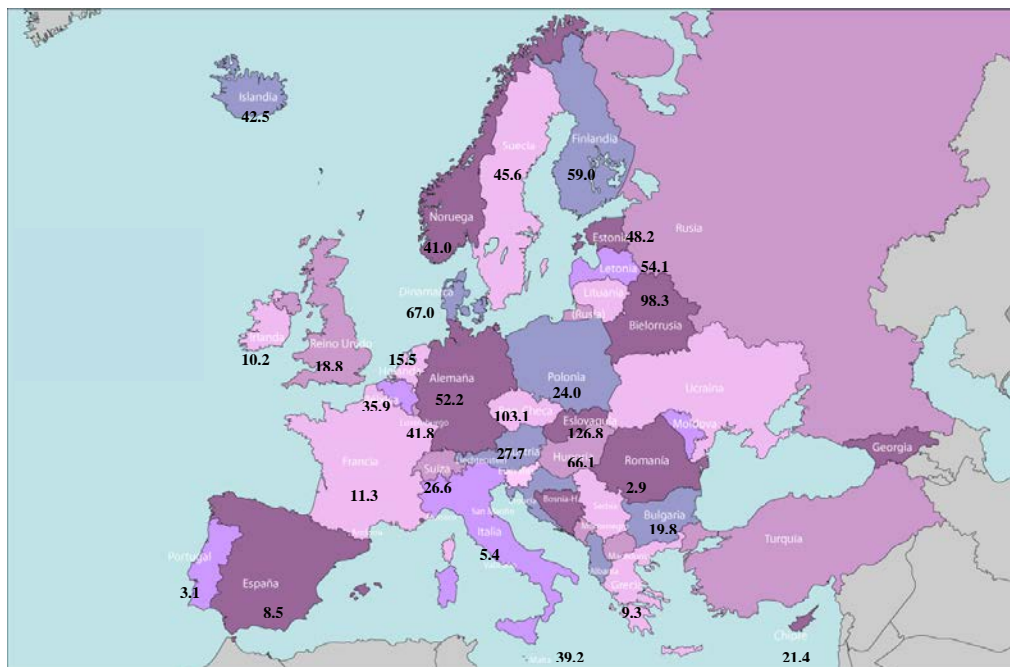


Figura 7. Casos notificados de salmonelosis en Europa en 2008. Casos confirmados cada 100.000 habitantes. Adaptado del informe epidemiológico anual del ECDC (2008).

5.1.1. *Salmonella enterica* 4,5,12:i:-, fagotipo U302 y multirresistentes

Con el fin de determinar sin ambigüedad si los aislados informados como Typhimurium y si los aislados de otros serotipos son, monofásicos, se debe analizar la fórmula antigénica completa. En el caso de *S. Typhimurium*, se han descrito variantes antigénicas que carecen o bien del antígeno H de primera o de segunda fase, o ambas (respectivamente: 1,4,[5],12:-:1,2, o 1,4,[5],12:i:-, o 1,4,[5],12:-:-). Tales variantes se han denominado “variantes monofásicas de *Salmonella* Typhimurium” (EFSA, 2010).

En el año 1997 se aisló en España por primera vez la cepa monofásica de *Salmonella* con fórmula antigénica [4,5,12:i:-], pasando a ser el 4º serotipo más frecuentemente aislado en nuestro país en 1998 (Echeita y col., 1999). Respecto a este considerable incremento, se llevaron a cabo diversos estudios epidemiológicos con el fin de establecer su posible origen (Echeita y col. 2001, Guerra y col. 2000, Garaizar y col. 2002, Zamperini y col. 2004). En el estudio realizado por Echeita y col., 2001, se demostró la relación entre *Salmonella* Typhimurium y el nuevo serotipo atípico de *Salmonella* también denominadas monofásicas. En dicho trabajo se investigaron dos secuencias específicas de *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT104 y fagotipo U302, las cuales fueron detectadas en *Salmonella enterica* [4,5,12:i:-], entre otros datos demostrando el vínculo evolutivo entre ambos serotipos (Echeita y col. 2001).

Entre las características de esta variante monofásica cabe destacar la multirresistencia antibiótica que presentaba frecuentemente a ampicilina, cloranfenicol, sulfonamida, gentamicina, estreptomina, tetraciclina y sulfamethoxazol-trimetoprim (R-ACSuGSTSxT), y que en más del 55% de los casos pertenecían al fagotipo U302. Por otra parte, el rasgo principal era la delección del operon responsable de la síntesis de los flagelos de segunda fase lo que las convertía en cepas monofásicas y explicaba la ausencia de reacción en la fórmula antigénica.

En el año 2002 nuestro grupo de investigación caracterizó varias cepas de este serotipo mediante la tecnología de las micromatrices de ADN (*microarray*), frente al genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2 (Garaizar

y col. 2002). Se observó una delección en el plásmido pSLT y varias delecciones de 5 grupos de genes cromosómicos entre las que se encontraba la delección en la sección genética responsable de la síntesis del flagelo de segunda fase. Además, en este trabajo se amplificaron mediante PCR las regiones adyacentes al operon *fljAB*, cuyas secuencias han supuesto la base para el presente trabajo.

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

Tras la emergencia y diseminación de las cepas descritas en el apartado anterior comenzó la propagación de otra variante monofásica de Typhimurium, que difería en ciertos aspectos de resistencia, fagotipo, etc. Por ello, varios grupos de investigación englobaron estas variantes en un segundo y tercer linaje, procedentes de Estados Unidos y Europa respectivamente (Lucarelli y col. 2012, Soyer y col. 2009, EFSA 2010).

En los datos aportados por el Sistema de Vigilancia Europea (TESSy), en un estudio realizado por 30 países, de los que sólo 7 reportaron datos, en 2007 se notificaron 360 casos de las cepas englobadas como tercer linaje, y en 2009 el número se vio incrementado hasta 1.416 casos (EFSA, 2010).

5.2. *Salmonella* Paratyphi B

Las cepas de *Salmonella* Paratyphi B poseen la fórmula antigénica 1,4,[5],12:b:1,2 siendo los antígenos somáticos: 1,4,12, donde la presencia del antígeno 5 es variable, y en los antígenos flagelares la fase 1, corresponde al “b” y en la fase 2, a “1, 2”. *Salmonella* Paratyphi B y *Salmonella* Paratyphi B variedad Java, son biotipos del serotipo 1,4,[5],12:b:1,2 que causan fiebre

paratifoidea y gastroenteritis humana respectivamente (Denny y *col.* 2007, Threlfall y Levent 2005b). Ambas variantes pueden ser diferenciadas mediante el análisis del metabolismo del tartrato, pero este procedimiento no suele aplicarse de rutina en todos los laboratorios (Sundeeep y *col.*, 2008). La variedad Java puede fermentar el d-tartrato como única fuente de carbono por lo que se denomina como *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Paratyphi B dT+. *S. Paratyphi B* variedad Java, parece ser menos virulenta para los humanos que la variante que no fermenta el d-tartrato (dT-) (Hernandez y *col.* 2012).

Al igual que la fiebre tifoidea, la fiebre paratifoidea es poco común en los países industrializados. La fiebre tifoidea y paratifoidea se consideran enfermedades raras en la UE (ECDC, 2011) pero los casos que surgen son en su mayoría importaciones esporádicas de fuera de la Unión y su distribución refleja las pautas de viaje de los ciudadanos de la UE a países donde estas enfermedades son endémicas. Sin embargo, se estima que en el año 2000 hubo 5.400.000 casos de fiebre paratifoidea en todo el mundo (Sundeeep y *col.*, 2008). En Estados Unidos, entre los años 2005 y 2006, se detectaron un total de 49 casos de *Salmonella* Paratyphi B, donde un 76% de los casos correspondía a la variedad Java (Sundeeep y *col.*, 2008). En 2010 en Chile se comunicaron 2.728 casos de infección por *Salmonella*, donde *Salmonella* Paratyphi B ocupaba el tercer lugar en frecuencia de aislamiento con 94 casos (3,4%), por detrás de Enteritidis y Typhimurium.

El ser humano es uno de los pocos reservorios conocidos de *Salmonella* Paratyphi B. Las infecciones por *Salmonella* se adquieren fundamentalmente mediante transmisión fecal-oral, a través del consumo de alimentos

contaminados que han sido contaminados por las heces de una persona infectada o un portador crónico asintomático, en ocasiones también puede ser por vectores mecánicos (moscas y cucarachas) que se posan sobre alimentos en los que se puede multiplicar y persona-persona.

Los pacientes infectados por la variedad Java, a diferencia de la variante que no fermenta el d-tartrato, suelen padecer una enfermedad menos grave, pudiendo presentar diarrea con sangre, vómito, fiebre y calambres abdominales (Harris, 2009). A pesar de que la variedad Java parece ser menos virulenta para los humanos, se han descrito casos de infección invasiva (Denny y col. 2007, Threlfall y Levent 2005b, Desenclos y col. 1995).

Salmonella Paratyphi B variedad Java tiene un reservorio animal y se ha asociado en casos aislados y brotes al consumo de alimentos contaminados, como ensaladas, quesos de cabra y pollo y al contacto con reptiles y acuarios de peces tropicales (Hernandez y col. 2012). Los reptiles son portadores habituales de *Salmonella* Paratyphi B variedad Java en su tracto intestinal, normalmente no presentan signos de enfermedad y eliminan las bacterias con las heces, contaminando el agua y cualquier superficie que esté en contacto con el animal. Aunque otros reptiles son portadores de *Salmonella*, las tortugas conllevan un riesgo especial, ya que es frecuente en nuestro medio la compra de pequeñas tortugas como mascotas para los niños (Hernandez y col. 2012). Los brotes causados por *Salmonella* Paratyphi B variedad Java escritos en Australia no han sido de origen alimentario. Los únicos brotes descritos hasta la fecha fueron en 2007, causados por peces ornamentales importados y en 2008 y 2009 por contaminación en cajones de arena de guarderías (Staff y col. 2012). En un

estudio publicado en 1972 en los EE.UU., se describe la mayor prevalencia en la infección con tortugas encontrada hasta la fecha, donde hasta un 85% de las tortugas domésticas estaban contaminadas con esta bacteria. En EE.UU., de los aproximadamente 1,5 millones de casos anuales de *Salmonella*, 74.000 son atribuibles a la exposición con reptiles. Se ha estimado que entre el 3 y 5% de todos los casos de salmonelosis existe alguna asociación con reptiles (Lafuente y col. 2013). En cuanto a nuestro país, la Unidad de Vigilancia Epidemiológica de Bizkaia detectó, entre septiembre de 2010 y octubre de 2011, 8 casos de infección por *Salmonella* Paratyphi B variedad Java y 3 de una posible variante monofásica (4,5,12:b:-) (Hernandez y col. 2012). En 2009 se detectaron tres casos en Castellón y 2 en Barcelona, de niños infectados con *Salmonella* Paratyphi B var. Java a partir del contacto con tortugas (Lafuente y col. 2013).

Salmonella Paratyphi B variedad Java es un organismo complejo con linajes clonales genéticamente distintos. A diferencia de *S. Paratyphi B* dT-, *S. Java* ha causado varios brotes a partir de productos alimentarios contaminados. Por ejemplo, en Francia en 2003, se infectaron 273 personas de las cuales falleció una, en un brote asociado a queso de cabra (Weill y Fabre 2005). Recientemente, se han diseminado dos líneas clonales distintas caracterizadas por la resistencia a los antimicrobianos. Una de ellas se detectó con frecuencia en la producción de aves de corral en los Países Bajos, entre 2000 y 2004 (Dorn y col. 2001, Van Pelt y col. 2003), y ha causado infecciones en humanos en varios países de Europa como resultado de la importación de aves de corral infectadas de los Países Bajos (Brown y col. 2003). La segunda línea clonal, que se caracteriza por la posesión de la Isla Genómica de *Salmonella* 1 (SGI1), la cual se ha distribuido en todo el mundo. Estas cepas son generalmente

resistentes a la ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, espectinomicina, sulfonamidas y tetraciclinas (Threlfall y Levent 2005b, Weill y Fabre 2005, Han y Choi 2006) y se han asociado con los acuarios, en particular de acuarios de peces tropicales (Gaulin y Vincent 2002), aunque también se ha informado de brotes en el ganado (Evans y Davies 2005).

5.3. *Salmonella* Schwarzengrund

Las cepas pertenecientes al serotipo Schwarzengrund poseen la fórmula antigénica 1,4,12,27:d:1,7 donde los antígenos somáticos son: 1,4,12,27, y los antígenos flagelares corresponden en la fase 1, al “d” y en la fase 2, a “1, 7”.

En los últimos años, *Salmonella* Schwarzengrund se ha convertido en uno de los serotipos emergentes responsables de infecciones en humanos y aves de corral en algunos países (Chen y col., 2010). Según el programa Internacional de vigilancia de *Salmonella* bajo la dirección de la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/salmsurv>), en muchos países, *Salmonella* Schwarzengrund es uno de los 15 principales serotipos de *Salmonella* más frecuentemente aislados de alimentos, animales, y seres humanos (Chen y col., 2010). En los Estados Unidos, ha sido clasificado como uno de los 5 primeros serotipos de *Salmonella* identificados en granjas de cerdo (Bahnson y col., 2006). Según el Centro de Control de Enfermedades (CDC), se trataría de uno de los serotipos de *Salmonella* emergentes detectados en pollos contaminados.

S. Schwarzengrund es menos prevalente que *S.* Enteritidis y *S.* Typhimurium, en el mundo, por lo que causa menos casos de salmonelosis. Sin embargo, en los últimos años, la incidencia relativa de este serotipo parece

haber aumentado (Aarestrup y col. 2007). En la actualidad se encuentra entre los 20 serotipos de *Salmonella* más frecuentemente identificados en varios países, como Eslovaquia, Nueva Zelanda, Venezuela y Tailandia, es uno de los 40 serotipos más frecuentemente identificados en Dinamarca y los EE.UU. y fue el quinto serotipo más común aislado de carne al por menor en los Estados Unidos en 2004, asociada exclusivamente con los productos de aves de corral. Otros estudios también sugieren que las aves de corral podrían ser el reservorio más común (Aarestrup y col. 2007, Limawongpranee y col. 1999, Poppe y col. 1991).

En lo referente a las manifestaciones clínicas, no difieren demasiado de las descritas anteriormente. La mayoría de las personas padecen de diarrea, fiebre y calambres abdominales durante 12-72 horas después de la infección. La infección generalmente se diagnostica por cultivo de una muestra de heces. La enfermedad normalmente dura de 4 a 7 días, y la mayoría de las personas se recuperan sin tratamiento (CDC, 2007).

OBJETIVOS

Salmonella enterica es un patógeno conocido desde el siglo XIX. Hoy en día se han descrito más de 2.500 serotipos aunque no todos han tenido la misma relevancia y son los más frecuentemente aislados en muestras clínicas los que han recibido un control y seguimiento epidemiológico más exhaustivo. En este sentido, la aparición de una variante monofásica a finales de los años 90 y su rápida expansión en los años siguientes, demostró que aunque la aparición de estas variantes no es un evento exclusivo de los últimos años (existen descritos aislamientos monofásicos en los años 50), las herramientas disponibles actualmente en biología molecular han facilitado la identificación de un mayor número de variantes no caracterizadas previamente. El trabajo de esta tesis doctoral se centró en la caracterización molecular de aislamientos de la variante monofásica 4,[5],12:i:- del serotipo Typhimurium circulantes en nuestro país así como de otros aislamientos monofásicos con importancia clínica en los últimos años: 4,5,12:b:- y 4,12:d:-.

Los objetivos abordados se detallan a continuación:

1. Objetivo 1: Estudio de aislamientos pertenecientes al clon español de la variante monofásica 4,5,12:i:- del serotipo Typhimurium recogidos en España: caracterización y tipificación molecular, bases moleculares del fenotipo monofásico y determinación de su posible origen evolutivo.
2. Objetivo 2: Estudio de aislamientos de otros clones de la variante monofásica 4,[5],12:i:- del serotipo Typhimurium recogidos en España: caracterización y tipificación molecular, bases moleculares del fenotipo monofásico, identificación de líneas clonales y sus variantes y diseño de marcadores

epidemiológicos para la detección rápida, el control y el seguimiento de cada tipo de variante.

3. Objetivo 3: Estudio de aislamientos pertenecientes 4,5,12:b:- recogidos en España: caracterización y tipificación molecular, bases moleculares del fenotipo monofásico y determinación de su posible origen evolutivo.
4. Objetivo 4: Estudio de aislamientos pertenecientes 4,12:d:- recogidos en España: caracterización y tipificación molecular, bases moleculares del fenotipo monofásico y determinación de su posible origen evolutivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *Salmonella enterica*

Los aislados de *Salmonella* objeto de este estudio se seleccionaron de la colección del Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* (LNRS) del Centro Nacional de Microbiología (CNM, Majadahonda, Madrid), donde se reciben procedentes de pacientes, animales o alimentos de diversas regiones de todo el territorio nacional. En el procedimiento de rutina, son serotipificados y en aquellos serotipos donde existen esquemas internacionalmente aceptados, se lleva a cabo la fagotipificación. Además, actualmente, se realiza el antibiograma a un 50% de los aislados recibidos. Los resultados de serotipificación y fagotipificación, así como los perfiles de sensibilidad a antimicrobianos, fueron gentilmente cedidos por el LNRS para la realización de esta tesis doctoral.

Los aislados que configuran esta tesis doctoral se dividieron para su estudio en 4 grupos:

1. *S. enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:i:- fagotipo U302. Total estudiados: 60. Colección 1.
2. *S. enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,[5],12:i:- de diversos fagotipos. Total estudiados: 215. Colección 2.
3. *S. enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:b:-. Total estudiados: 39. Colección 3.
4. *S. enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:d:-. Total estudiados: 19. Colección 4.

A continuación se detallarán los métodos empleados para la caracterización de cada una de las colecciones:

1. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:i:- fagotipo U302. Colección n°1.

Se analizaron 60 aislados clasificados como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:i:- fagotipo U302 y perfil de multirresistencia ACSuGSTSxT (ampicilina, cloranfenicol, sulfonamida, gentamicina, estreptomycin, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol). Se incluyeron como cepas control una cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Enteritidis y 4 cepas de *Salmonella Typhimuirum* con fagotipos U302 y DT104b, todas ellas del LNRS y una cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium LT2 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 722) (Tabla 4).

Tabla 4. Colección de aislados n°1. Antibióticos testados: ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), sulfonamida (SUL), gentamicina (GEN), ciprofloxacino (Cip), kanamicina (Kan), estreptomycin (STR), cefalotina (Cef), ácido nalidíxico (Na), ceftriaxona (CTX), tetraciclina (TET), trimetoprim-sulfametoxazol (SxT). Se señalan las resistencias que difieren del patrón de multirresistencia ya sea por pérdida (en azul) o por ganancia (en verde).

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

Tabla 4. (Continuación).

638	1470	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
639	4038	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
640	5476	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
641	5854	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
642	5915	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
643	7267	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
644	2566	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
645	6686	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
646	7518	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
647	8404	2003	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
648	222	2004	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
649	539	2004	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R	R
650	835	2004	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
651	7713	2004	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	R	R
652	1874	2005	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
653	1992	2005	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
654	4655	2005	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R	S
655	5831	2005	Sangre	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
656	7236	2005	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
657	916	2006	Heces	4,5,12:i:-	U302	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
658	3250	2006	Heces	4,5,12:i:-	U302	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
659	5218	2006	Sangre	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	Heces	4,5,12:i:-	U302	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
662	3897	2007	Sangre	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. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)

Los perfiles de PFGE de todas las cepas objeto de este estudio fueron obtenidos aplicando el protocolo estandarizado de PulseNet (http://www.pulsenetinternational.org/SiteCollectionDocuments/pfge/PNL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf):

1.1.1 Preparación de los bloques de agarosa:

- Siembra de los aislados en TSA (*Trypticasein Soy Agar*, Pronadisa, Madrid, España) e incubación durante 18-24h.
- Preparación de las suspensiones bacterianas en tampón CSB (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH:8), a razón de 2 ml por cepa y lectura de la absorbancia de las suspensiones a 420 nm en el espectrofotómetro. Ajuste de la densidad celular a una absorbancia final de 0,6 en un volumen final de 400 µl en el mismo tampón CSB. Posteriormente se añade 20 µl de proteinasa K (21,2 mg/ml) (Fermentas, GMBH, Alemania)
- Preparación de los bloques de agarosa, empleando una agarosa de bajo punto de fusión específica para PFGE (SeaKem Gold Agarose, Lonza, Iberlabo S. A., Madrid, España) a una concentración de 1% en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) a pH 8 y SDS 10% (*Sodium Dodecyl Sulfate*). La agarosa así preparada, se atempera en un baño térmico a 50-55°C y se mezcla en proporción 1:1 con la suspensión bacteriana. Se homogeniza y se reparte en los moldes, dejando solidificar a temperatura ambiente.

1.1.2 Lisis bacteriana en los bloques de agarosa:

- Los bloques ya solidificados se introducen en 5 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, sarkosyl 1%, pH 8). A continuación se añaden 25 µl de proteinasa K (21,2 mg/ml) y se incuban durante un mínimo de 2 h en un baño térmico en agitación a 55°C.
- Los bloques de agarosa, se lavan en 5 ml de agua miliQ estéril dos veces y en 5 ml de tampón TE a pH 8 en 4 ocasiones. Todos los lavados se realizaron con el baño a 50°C y en agitación. Finalizado el proceso de lavado, los bloques se conservan en 5 ml de tampón TE, pH 8 a 4°C.

1.1.3 Digestión de ADN:

- Se corta un fragmento del bloque de agarosa correspondiente al grosor de un porta reservando el resto del bloque en TE a 4°C para un uso posterior. Los fragmentos se incuban a 37°C durante 15 min en un termobloque con 90 µl de agua miliQ estéril comercial (Nuclease free, Fermentas) y con 10 µl de tampón específico de la enzima *XbaI* (Fast-Digest, Fermentas). Transcurridos los 15 minutos se retira la solución de pre-digestión y se añaden 87 µl de agua miliQ estéril comercial, con 10 µl de tampón y 3 µl de enzima *XbaI* (50U/muestra). Se incuba en termobloque a 37°C un mínimo de 2h.

1.1.4 Electroforesis:

- El gel de agarosa se prepara empleando agarosa Seakem Gold al 1% en TBE 0,5x (Tris 44 mM, ácido bórico 44 mM, EDTA 1 mM). Se

colocan los fragmentos digeridos en el peine y se posicionan cuidadosamente sobre la placa sin retirar el peine. A continuación se añade la agarosa y se deja solidificar 30 min a temperatura ambiente. En las posiciones 1, 8 y 15 se colocan los fragmentos de la cepa control *Salmonella* Braenderup H9812 *Universal Size Standard*.

- La electroforesis se llevó a cabo en el equipo CHEF-DR III System (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU), en 2 l de tampón TBE 0,5x y ajustando su temperatura a 14°C, durante 21h con pulsos de 2,2 a 63,8 en progresión lineal y un voltaje de 6V/cm.

1.1.5 Tinción y captura de la imagen.

- El gel se introdujo en un baño con 1 µg/ml de bromuro de etidio y 400 ml de agua destilada, durante 25 min en agitación suave. A continuación se realizaron lavados de 20 min l con agua destilada (AD) en agitación suave durante un periodo total de 1 h.
- La captura de la imagen se obtuvo en formato TIFF, y se llevó a cabo en un equipo de fotocaptura Gel Doc XRS (Bio-Rad).

1.1.6 Análisis de los perfiles

- El análisis de los archivos TIFF obtenidos mediante el software InfoQuestTMFP (Bio-Rad), se llevó a cabo en base al coeficiente de similitud de Dice y la discriminación por UPGMA para generar un dendograma con un valor de tolerancia del 1%. En la asignación de bandas para la constitución de los distintos perfiles de PFGE, los fragmentos con un peso molecular inferior a 33,3 kb fueron

ignorados en el análisis. Siguiendo las recomendaciones del sistema PulseNet, se consideró como criterio de discriminación entre perfiles una diferencia en un solo de los fragmentos de restricción.

1.2. Análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable (MLVA).

El análisis MLVA se llevó a cabo siguiendo el método y materiales descritos por Lindstedt y *col.*, 2004, para *Salmonella* Typhimurium con una modificación en el marcaje de los iniciadores (Tabla 5). En el método referenciado, se realizan 2 PCRs múltiples, con 2 y 3 parejas de iniciadores respectivamente (Fig. 8). Posteriormente, se asigna el número de alelo siguiendo la nomenclatura propuesta por Larsson y *col.*, 2009. De este modo todos los aislados monofásicos fueron clasificados en base a un patrón numérico compuesto por 5 dígitos (alelos).

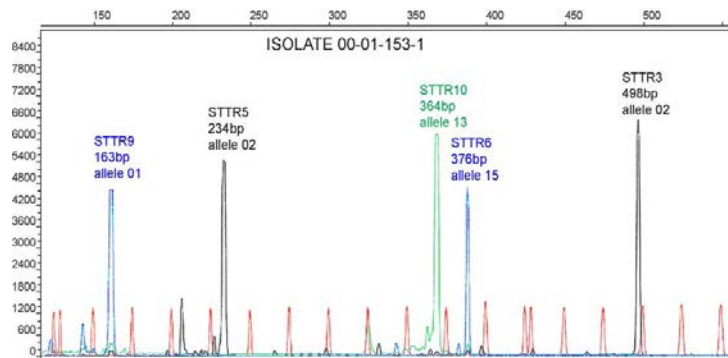


Figura 8. Imagen de electroforesis capilar de Lindstedt y *col.* (2003). Se muestran los 5 fragmentos, obtenidos por cada pareja de iniciadores descrita en la técnica.

Cabe destacar que la técnica referenciada estaba diseñada específicamente para *Salmonella* Typhimurium y no para la variante estudiada en este trabajo.

El análisis de fragmentos se realizó en el Banco de ADN del Servicio de Genómica y Proteómica de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU, Vitoria-Gasteiz), en un secuenciador 3130 Genetic Analyser (4 Capillary) de Applied Biosystems (Foster City, California, EEUU). El análisis de los datos se realizó mediante el software BioNumerics v3.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

Tabla 5. Iniciadores empleados para la detección mediante PCR de repeticiones en tándem de número variable (Lindstedt y *col.*, 2003). Modificación en el marcaje.

Locus	Iniciador	Secuencia nucleotídica (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	
STTR10, plásmido	STTR10pl-F	CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG
	TET	
pSLT	STTR10pl-R	GAAGGGGCCGGCAGAGACAGC

1.3. Estudio de la delección del gen *fljB*

1.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por ebullición. Para ello se realizó una suspensión a partir de un cultivo bacteriano en medio sólido TSA en 500µl de agua MiliQ estéril utilizando asas de siembra estériles de 1 µl de capacidad. Se mantuvieron a 100°C durante 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos. A continuación se recogió el sobrenadante y se conservó congelado a -20°C para una futura utilización.

1.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación

En un estudio previo del grupo de investigación se secuenció parte del fragmento de la delección del operon *fljBA* (Garaizar y col., 2002). En base a la secuencia obtenida en ese trabajo se diseñaron dos parejas de iniciadores para amplificar y secuenciar el fragmento desde el extremo inicial de la delección (gen STM2757) hasta el extremo final de la misma (gen *iroB*-STM2773, *iroC*-STM2774, o *emrA*-STM2814). Los iniciadores se diseñaron mediante el programa Primer3 (www.bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/) y fueron proporcionados por la empresa Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania) y Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EEUU) (Tablas 6-7).

Tabla 6. Iniciadores diseñados para la amplificación mediante PCR de la delección del flagelo de segunda fase en la colección de cepas n° 1.

Gen	Iniciador	Secuencia nucleotídica (5´-3´)	Tamaño (pb)	Referencia
STM2758	4512F	CGCTGTGGTGTAGCTGTTTC	705	Álvarez y col. 2004
IS26	4512R	TCTGCCACTTCTTCACGTTG		
IS26	IS26-3F	TCGTAACAGCAAAGCTGCAT	900/1100	Laorden y col. 2010
<i>iroC</i>	2774-2R	TTTTACGTTCCCAACACACG		
IS26	DIS26Fcomp	TATTATGGTGATCCCCTGGG	230	Laorden y col. 2010
<i>iroC</i>	D57-2774R	TGAAGATCGCTGTTGGTACG		
IS26	IS26F-TD	CGCCTGGTAAGCAGAGTTTT	900	Laorden y col. 2010
STM2815	2815R	CACCCCGAAAGAGGTGATAA		

Las reacciones de PCR se diseñaron para un volumen final de 25 µl en el cual se añadieron 1 µl de ADN genómico extraído por ebullición, 200 µM de dNTPs, 1,50 mM MgCl₂, 0,4 µM de iniciadores, y 1 U de Taq polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido).

El programa de amplificación fue el siguiente:

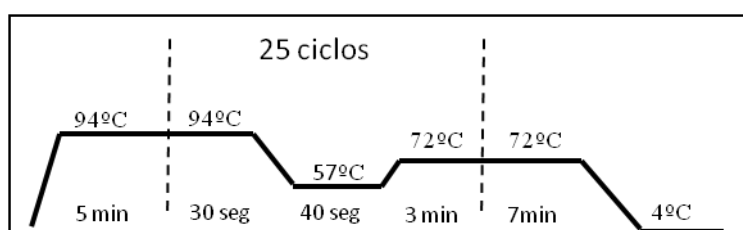


Figura 9. Programa diseñado para la amplificación de fragmentos de entre 200-1.500 pb mediante PCR convencional.

Tabla 7. Iniciadores diseñados para la realización de un mapa de presencia/ausencia de genes, próximos a la delección de los genes codificantes del flagelo de segunda fase en la colección de cepas nº 1, mediante PCR.

	Genes STM	Secuencia nucleotídica (5'-3') Forward/Reverse	Tamaño amplificado (bp)
	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
Iniciadores para detectar presencia/ausencia de genes alrededor del gen <i>fljB</i>	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	

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (peso/vol) (Pronadisa) en tampón TAE (Tris-acetato-EDTA) al 1x durante 50 min a 100V. Posteriormente se procedió a la tinción de los geles con bromuro de etidio y fueron visualizados en un Chemi-Doc XRA (UV-transilluminator, Bio-Rad). Como marcador de peso molecular se utilizó Hypperladder IV (Bioline). Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La secuenciación de los fragmentos purificados se llevó a cabo en la empresa Sistemas Genómicos S.A (Valencia, España) mediante la técnica BigDye Terminator.

La visualización de los cromatogramas se llevó a cabo con el programa ChromasPro 1.5 (MFC Application). La comparación y posterior análisis de las secuencias obtenidas, se realizó mediante diversos programas informáticos como el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), el programa ADN/Protein alignment (<http://insilico.ehu.es/align/>) y el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

1.4. Estudio de la presencia del plásmido pU302 con la secuencia de inserción IS26.

1.4.1 Digestión con nucleasa S1

El protocolo a seguir se basaba en el descrito por Barton y *col*, 1995. Básicamente consiste en los mismos pasos descritos para el campo pulsante, pero con las siguientes excepciones:

- Lectura de la absorbancia de las suspensiones a 420 nm en el espectrofotómetro y ajuste de la densidad celular a una absorbancia final de 1.
- Digestión de ADN: el fragmento a digerir debe ser de mayor tamaño, al menos el doble que el tamaño utilizado para PFGE. Los fragmentos se incuban a 37°C durante 15 min en un termobloque, con 90 µl de agua miliQ estéril comercial y con 10 µl de tampón específico de la nucleasa S1 (Takara, Japón). Transcurridos los 15 minutos se retira la solución y se añaden 90 µl de agua miliQ estéril comercial, con 10 µl de tampón y 0,058 µl de nucleasa S1 (7U/muestra). Se incubó en termobloque a 37°C un mínimo de 45 min.
- Como control del tamaño de los fragmentos se utilizaron concatémeros del fago lambda cuyo rango abarca desde 50 a 1.000 kb (New England Biolabs, Hitchin, Reino Unido).

1.4.2. Marcaje de los concatémeros del fago lambda

- Digestión, según las especificaciones del fabricante, de los concatémeros del fago lambda mediante la enzima *PstI* (Roche) para realizar un posterior marcaje con biotina.
- El marcaje se realizó mediante el kit de Roche “DIG ADN labeling and Detection Kit” (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) siguiendo las especificaciones del fabricante. El sedimento final se resuspendió en 50 µl de TE pH 8 estéril y se conservó a -20°C.

1.4.3. Elaboración de sonda para la IS26

- Se utilizó como cepa de referencia la cepa 4836/01 con la delección de tipo 1 (1.ΔFljB1) y los iniciadores específicos para la amplificación de la secuencia de inserción IS26 (IS26F: 5'- GCA AAT AGT CGG TGG TGA TAA AC-3', IS26R1: 5'- GAG GCA GCC TTT TGT CTT ATT C-3'). El marcaje del fragmento se llevó a cabo mediante la incorporación de dUTP-digoxigenina durante el proceso de amplificación. Los reactivos y cantidades utilizadas se detallan a continuación (Tabla 8):

Tabla 8. Reactivos empleados en la fabricación de la sonda IS26.

REACTIVOS	SONDA	CONTROL -
AD	14 µl	18 µl
Digoxigenina (dUTP, Roche)	4 µl	- µl
Iniciadores	2 µl	2 µl
ADN (4836/01, ebullición)	5 µl	5 µl

- El programa de PCR utilizado se muestra a continuación:

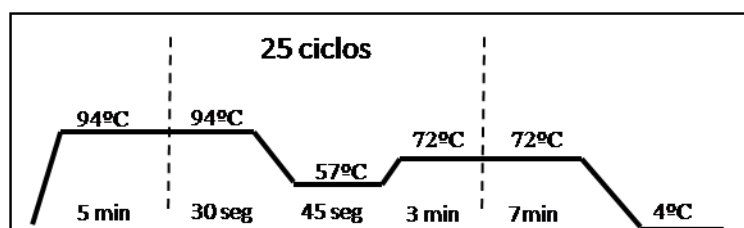


Figura 10. Programa de amplificación para la fabricación de la sonda IS26.

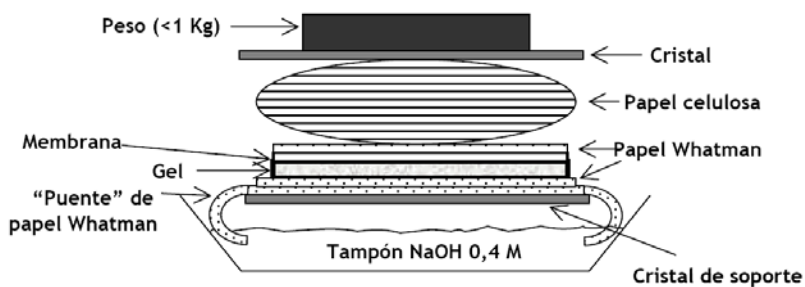
1.4.4. Hibridación con sonda para IS26

1.4.4.1. Tratamiento del gel PFGE-S1

- Proceso de depurinación: sumergir el gel 10 min (2 veces/5 min cada vez) en HCl 0,25 N (125ml HCl 1 M, hasta 500 ml H₂O-Destilada (AD) con agitación suave.
- Desnaturalización, durante 30 min (2 veces/15 min cada vez) con una solución 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH (150 ml de NaCl 5 M, 50 ml de NaOH 5 M, hasta 500 ml con AD).
- Neutralización, durante 30 min con una solución 1,5 ml NaCl / 0,5 M TrisHCl / 0,001 M EDTA pH 7,2 (150 ml de NaCl 5 M pH 7,2, 250 ml de Tris HCl 1 M pH 7,2, 1 ml de EDTA, hasta 500 ml con AD).

1.4.4.2. Transferencia a membrana

- En primer lugar, se recortan las partes sobrantes del gel (superior y laterales), y se mide para obtener una membrana de Nylon del mismo tamaño (es recomendable realizar una marca en la esquina superior del gel para tener una referencia de la posición de las bandas).
- A continuación se monta la transferencia en base a la siguiente imagen:



- Este montaje se mantiene durante 24 h, para llevar a cabo la transferencia del ADN del gel, a la membrana de Nylon (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Staffanstorp, Suecia). La transferencia del ADN se realiza mediante un proceso de capilaridad que ejerce el tampón SSC 10X sobre la membrana de Nylon cargada positivamente.

1.4.4.3. Fijación de ADN

- Tras la transferencia se lava la membrana en una bandeja y en agitación, con una solución SSC 2x para eliminar posibles restos de agarosa. Posteriormente se seca sobre papel de filtro y se introduce en una funda de plástico para fijar el ADN en la estufa a 37°C.
- Fijación del ADN de la membrana mediante exposición a la luz ultravioleta (UV) durante 2 min. Se deja secar con papel de filtro 24 h.

1.4.4.4. Prehibridación

- Se introduce la membrana en el tubo de hibridación con la superficie de la membrana donde está el ADN de cara a la luz del tubo y procurando eliminar las burbujas entre la membrana y la pared del tubo.
- Se añade la mezcla de pre-hibridación (SSCX 5x / N-lauril-sarcosina 0,1 % / SDS 0,02% / agente de bloqueo 1 % disolviendo con calor suave):
 - 8,75 ml de SSC 20X
 - 116 μ l N-lauril-sarcosina 30 %
 - 70 μ l SDS 10%
 - 0,35 g agente de bloqueo (Roche)
 - Hasta 35 ml con AD
- Se introduce el tubo en el horno de hibridación giratorio y se mantiene a 68°C durante 2 h.

1.4.4.5. Hibridación

- Se hierve la sonda 10 min al baño María y se enfría rápidamente en hielo.
- Se añaden los 25 μ l de la sonda a 5 ml de la mezcla de hibridación.
- Se desecha la mezcla de prehibridación y se introduce la sonda con una pipeta.
- Se incuba toda la noche a 68°C.

1.4.4.6. Revelado

Se realiza en un horno de incubación sin calor y con rotación, siguiendo los pasos que se describen a continuación:

- Lavados de membrana, con 50 ml de la 1ª solución de lavado (10 ml SSC 20x, 1 ml SDS 10 %, hasta 100 ml AD), durante 5 min 2 veces.
- Lavados de membrana, con 50 ml de la 2ª solución de lavado (0,5 ml SSC 20x, 1 ml SDS 10 %, hasta 100 ml AD), durante 15 min 2 veces.
- Equilibrado de membrana con 20 ml del Tampón 1 (10 ml Tris HCl 1 M pH 7,2, 3 ml NaCl 5 M pH 7,2, 87 ml AD), durante 1 min.
- Incubación durante 30 min con la solución de bloqueo (0,25 g agente de bloqueo, 25 ml tampón 1)
- Incubación durante 30 min en anti-Dig 1 (4 µl anti-Dig, Roche, 20 ml de tampón 1).
- Lavados con 20 ml del tampón 1, 2 veces 15 min cada vez.
- Equilibrado de la membrana con 30 ml del Tampón 3 (5 ml Tris HCl 1 M pH 9,5, 1 ml NaCl 5 M, 2,5 ml Cl₂Mg 1M, hasta 50 ml con AD), durante 2 min.
- Revelado de membrana en oscuridad y sin agitación, distribuir sobre la membrana la solución de revelado (90 µl de NBT en 20 ml del tampón 3 y 70 µl de BCIP, Roche). Parar la reacción con TE pH 8.

2. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,[5],12:i:-, de diversos fagotipos. Colección n°2.

Se analizaron en un principio trece aislados clasificados como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,[5],12:i:-, fagotipos 18, 104b, 193, 195, 138, 7, PNR y NT y perfil de tetrarresistencia ASuST (Tabla 9). Una vez delimitada y secuenciada la zona de la delección del flagelo de segunda fase, se utilizaron los iniciadores específicamente diseñados, para ampliar el estudio a un total de 215 aislados monofásicos que presentaran las mismas características que los 13 aislados de esta colección. Se incluyeron como cepas control, una cepa de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:i:- del estudio descrito en el apartado 1 y la cepa anteriormente descrita LT2.

Tabla 9. Colección n°2. Únicamente se muestran los 13 aislados caracterizados en el inicio. Los antimicrobianos testados son los detallados en la Tabla 4.

Aislados	Año	Fórmula antigénica	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

La electroforesis en campo pulsante y la técnica de MLVA se llevaron a cabo según el procedimiento descrito para la colección de aislados n°1.

2.1 Estudio de la delección del gen implicado en la síntesis del flagelo de segunda fase (*fljB*)

2.1.1. Mapeo de genes

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante ebullición tal y como se ha detallado en el apartado 1.3.1.

Se realizaron PCRs mediante el sistema pure-Taq™ Ready-To-Go Beads (GE Healthcare AB) para confirmar la presencia o ausencia de 33 genes desde el gen STM2692 al gen STM2775 y del mismo modo determinar el inicio y final de la delección del gen *fljB* en cada aislado. Los iniciadores se diseñaron mediante el programa Primer3 y fueron proporcionados por la empresa Sigma-Aldrich (Tabla 10). Las reacciones de PCR se diseñaron para un volumen final de 25 µl en el cual se añadieron 5 µl de ADN, 1µM de iniciadores, y 18 µl de agua miliQ estéril comercial (Nuclease free Fermentas). El programa de amplificación fue el siguiente:

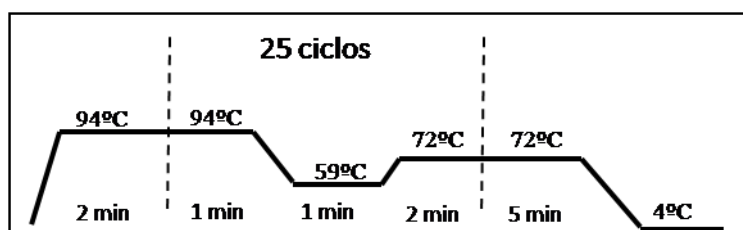


Figura 11. Programa optimizado para la amplificación mediante el mismo programa de PCR de los 32 genes detallados en este apartado.

Los productos de PCR fueron visualizados, del mismo modo y con las mismas herramientas descritas en el apartado anterior 1.3.2. Se llevó a cabo la purificación y posterior secuenciación de los productos obtenidos con la cepa LT2 como comprobación de la efectividad de los iniciadores diseñados, tal y como se ha explicado en el punto 1.3.2.

Tabla 10. Iniciadores diseñados para el estudio de los aislados de la colección nº 2.

	Genes	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño
	STM	Forward/Reverse	amplificado (pb)
Iniciadores para detectar presencia/ausencia de genes alrededor del gen <i>fljB</i>	2692	TGATGGAGATAGTGCCGGTAGAC/ TCCCGTCGAATCCAGAATCAG	490
	2693	AAACTCATGTGGCCTTGACC/ TGGTGGGATAACAGCAATGA	278
	2695	GCTTAAATCCCGTCACCTTCAC/ CCC GGCATAACCTCAAAGTG	220
	2697	CACTTCACGGGCAATATCCT/ ACCCCG TTAATCCACTTC	596
	2699/2700	GATTCGTGGGATCACAGTCA/ GTT CAACGACGGGAACAAC	664
	2710	TCACGACCC CGTTAGAACTC/ CGCCTTATCACCAACCTGAT	583
	2724	ATCGCTGCCTTTTC ATTCTATC/ TATGATGGTTAATTTGAAGGTTGTTG	460
	2740	CTC GCACGAAATACAGACGA/ GGG CTCCATGATCTGAAGAA	1078
	2742	TTGCTAAAAATGCCGATAAAGG/ TATTGGAGACAGAAAGAATGATGG	699
	2744/2745	CAGTTTCTGGCGATGAGTGA/ CGGGTGGAGATATTGGTCAG	883
	2747	TCCATTATGATTCGCCGTGTAG/ GAC TTCTGTCGAGGATGTGCTG	732
	2748/2749	ATGAACAATCAATGCAAATAACCTG/ ATGCGTCCTGCCACTCACAG	633
	2753	CGTGGTGGGTGCAGGTATCTAC/ TTCAGGTTTCCCGCTCTCAAG	724

Genes STM	Secuencia nucleotídica (5'-3') Forward/Reverse	Tamaño amplificado (pb)
2756	TCATGTTGGTTTCCTTGTGTGCG/ GATGATTTATTCCCGCTCTGTGTCAG	402
2757	ATAATGCTCTGCCCCTCCTT/ CTGAAACCGCCGCTAAACTA	522
2758	CTGAATGTTGTTCCCGACCT/ TGG CGACCAGCTTATCTTCT	411
2759	GATCCGCTTAACCCACTCGTCC/ CCGCAGCAGGGGAATAAAG	730
2760	TACTGGACCGGGTTC ATCAT/ CGCCTCTTTATGGCTCAGAC	450
2761	TGTCAATCTAACCAAGGATGAATGTC/ TTTACCTCAGAATAACCTGTGTGCTC	450
2763	CCAAAAAGCGAACTAAGGTGAGC/ ACGGACAGATGCATTGTTCAATG	700
2763/2764	ATGCCCTAAAAGATGCAACG/ ACCAGAGCTGGTCTGTGTCGAT	848
2766	CTGGCAACGGAAACGGTGAG/ CAAGTTTGTGCTGTAAGGGATGC	471
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/ CAATCTTGTCACCTGATACGGTCC	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

(Continuación)
**Iniciadores para
detectar
presencia/ausencia
de genes alrededor
del gen *fljB***

2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa para la obtención de fragmentos de gran tamaño (*Long-PCR*)

En este caso el ADN genómico se extrajo mediante el Kit Qiagen DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se procedió a cuantificar las muestras de ADN obtenidas mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

La técnica de PCR para la obtención de productos de gran tamaño (*Long-PCR*) se llevó a cabo con el Kit Expand Long Template PCR System de Roche. La reacción se realizó en un volumen final de 50 μ l, con 5 μ l de tampón 3, 2,5 μ l de cada dNTP (Roche), 2 μ l de cada iniciador, 0,75 μ l del mix de enzimas *Taq* y *Tgo* y una cantidad de ADN de 300ng/ μ l, completando hasta 50 μ l con AD comercial (Fermentas).

Todas las PCRs se llevaron a cabo con el mismo programa y reactivos de PCR exceptuando los iniciadores, los cuales fueron específicamente diseñados para cada tipo de deleción mediante el programa Primer 3 y fueron proporcionados por la empresa Sigma. (Tabla 11).

Tabla 11. Iniciadores diseñados para la amplificación de cada tipo de deleción.

	Tipo de deleción	Sentido	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Gen diana	Tamaño amplificado (pb)
Iniciador para la <i>Long-PCR</i>	Δ <i>flj</i> AB1	Forward	GACGATCGTCTGCTGATTGAAAC	STM2692	8700
	Δ <i>flj</i> AB3	Forward	GATCCGCTTAACCCACTCGTCC	STM2759	1600 or 3300
	Δ <i>flj</i> AB4	Forward	TCCGCAATTATCCTTTCGAC	STM2767	1900
	Δ <i>flj</i> AB5	Forward	TACTGGACCGGTTTCATCAT	STM2760	8400
	Todas	Reverse	CAGGATTGGGGAACTGGATTTCGCATACC	<i>iroB</i>	-

El programa de amplificación fue el siguiente:

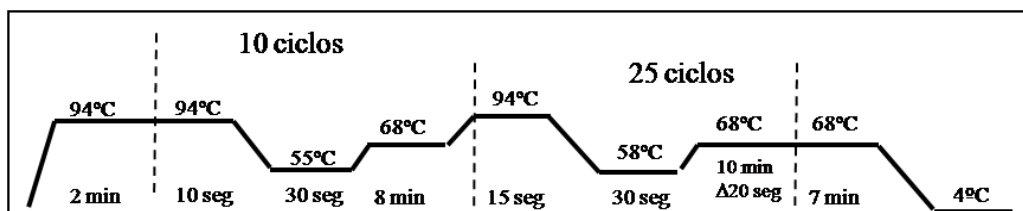


Figura 12. Programa de amplificación diseñado según las instrucciones del fabricante para fragmentos superiores a 12 Kb, correspondiente al tampón 3 (Roche).

Los productos de PCR fueron visualizados mediante el procedimiento descrito en el apartado 1.3.2 con la única diferencia del uso de agarosa a menos concentración (0,8%). Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit GeneJet purification Kit (Fermentas). La PCR de secuenciación de los fragmentos purificados se realizó en un volumen final de 10 μl , con 5 μl de AD comercial, 2 μl de Big Dye v 3.1, 1 μl de iniciador y 2 μl de producto de PCR.

El programa de secuenciación fue el siguiente:

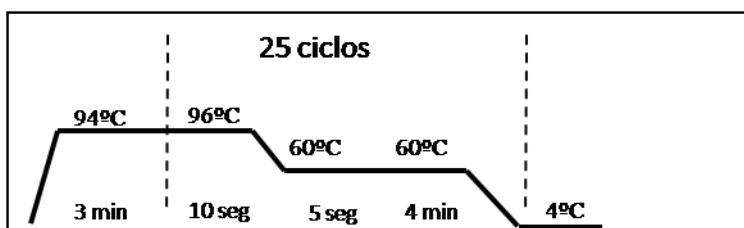


Figura 13. Programa de secuenciación.

La electroforesis capilar de los productos de secuenciación llevó a cabo en el servicio de secuenciación del CNM.

La visualización de los cromatogramas se llevó a cabo con el programa DNASTar de Lasergene vs. 7.0 (Madison, Wisconsin, EEUU). La comparación y posterior análisis de las secuencias obtenidas, se realizó mediante los programas informáticos Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), y el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

2.1.3. Técnica de secuenciación en cadena (*Walking-primer*)

En la secuenciación de los productos de PCR de gran tamaño obtenidos mediante la técnica descrita en el apartado 2.1.2, únicamente se obtuvieron las secuencias próximas a los iniciadores empleados. Al tratarse de productos de PCR de gran tamaño (2.000-9.000 pb), procedimos a emplear la técnica de la secuenciación en cadena para poder obtener la secuencia completa del producto amplificado.

Tras analizar el primer fragmento secuenciado mediante el programa informático Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), se diseñaba otro iniciador para continuar con la secuenciación del fragmento obtenido en la *Long-PCR*. De este modo se realizaron varias PCRs de secuenciación para obtener la secuencia del fragmento completa (Tabla 12).

Tabla 12. Iniciadores diseñados para la amplificación de cada fragmento hallado en cada tipo de delección.

	Tipo de delección	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Gen diana
Iniciadores de secuenciación		Forward-GACGATCGTCTGCTGATTGAAAC	STM2692
		Forward-GGCATCCCCAAGTAACACAC	inserción
		Forward-GAAATATCCAGCGCTTCGGTAG	inserción
		Forward-TGCTAAAGCGCGAGAACAAAG	inserción
		Forward-CCGAAAGAACATTAGCAACCCG	inserción
		Forward-TTGAAAATGTGAATGGCGACG	inserción
		Forward-AGCATAGATGGGTATACCTGGGC	inserción
		Forward-GCTCTGGATGGTGGGATAAAG	inserción
		Forward-CGAAGTACAGCGTCCCCTTC	inserción
		Forward-CGCTATCATCGAAAAGGTTG	inserción
	2.Δ <i>flj</i> AB1	Forward-GCCTGGCTTGCACTGGGAG	inserción
		Forward-ATCGAGCACAGGAAAGGAGG	inserción
		Forward-GATACATCTTCTGATACGGAACGG	inserción
		Forward-TGTTATCGTAGTCCGGGTCATCAG	inserción
		Forward-ACCATTCTGTTTAAGCCCTGTATC	inserción
		Forward-ACAGTGTATATGTCTGACCGTTCG	inserción
		Forward-GGCATCCCCAAGTAACACAC	inserción
		Reverse-GCCACACGATTTATGGTTCTTG	Region intergénica <i>hin-iroB</i>
		Reverse-CGTCACCGTTCGAATGTTGC	Region intergénica <i>hin-iroB</i>
	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	

	Tipo de delección	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Gen diana
Iniciadores de secuenciación	2.Δ <i>flj</i> AB5	Forward-GTTTCCATTTACCCGCACTT	STM2761
		Forward-CTGCGTATATCGCTTGCTGA	IS1
		Reverse-ACGAACAGTGGGGATACGTC	IS1
		Forward-GCGGCTTTTTATTGAGCTTG	<i>tetA</i>
		Forward-TGCGTCTCAACCCCTACTTC	<i>tetA</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 Secuenciación del genoma completo (NGS)

En las tres cepas clasificadas como tipo 2.Δ*flj*AB2, se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo, o también conocida como secuenciación de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*). Para la secuenciación de las muestras, en primer lugar se realizó la extracción de ADN, partiendo de células cultivadas en caldo TSB durante 24h, y posteriormente se utilizó el kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen. Las extracciones de ADN se cuantificaron mediante el espectrofotómetro ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop, Delaware, EEUU). La secuenciación se llevó a cabo en la empresa aScidea Computational Biology Solutions, S.L. (Barcelona, España). Las tres cepas de *Salmonella* se secuenciaron con el secuenciador Illumina MiSeq de aScidea, para la obtención de secuencias de máximo 251 pb.

3. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:b:-. Colección n°3.

Se analizaron 39 aislados clasificados como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:b:- (Tabla 13). Se utilizó como control de PCR la cepa de LT2 anteriormente mencionada.

La caracterización mediante PFGE se llevó a cabo mediante el protocolo descrito en el apartado 1.1.

Tabla 13. Colección de aislados n°3. Se testaron los antimicrobianos detallados en la Tabla 4. Todos ellos fueron sensibles a los antimicrobianos testados, por lo que los datos no se muestran en la tabla.

Aislados	Año	Fórmula antigénica	Aislados	Año	Fórmula antigénica
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. PCR de subespecie:

Para llevar a cabo el objetivo de determinar el origen de esta colección y dado que la fórmula antigénica 4,5,12:b:- puede pertenecer a más de una subespecie de *Salmonella enterica*, se realizó una PCR mediante el sistema DreamTaq™ Green PCR Master Mix (Fermentas) con el programa de amplificación utilizado en el apartado 2.1.1. (fig. 11) para determinar la subespecie de la colección de aislados nº3. Las reacciones de PCR se diseñaron para un volumen final de 25 µl en el cual se añadieron 5 µl de ADN genómico extraído por ebullición, 1 µl (1µM) de cada iniciador, 6 µl de agua miliQ estéril comercial (Fermentas) y 12 µl de DreamTaq™ (Fermentas). Los iniciadores (*phoP*) fueron gentilmente proporcionados por la sección de Enterobacterias del LNRS.

El programa de amplificación fue el siguiente:

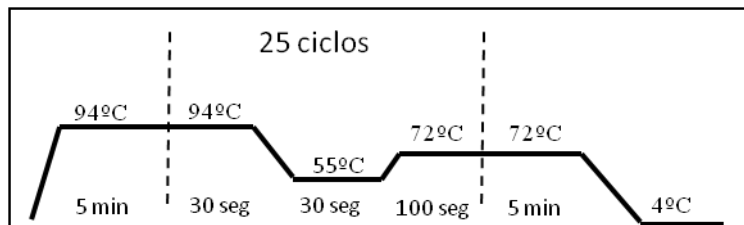


Figura 14. Programa de amplificación empleado en el LNRS para la amplificación del gen *phoP*.

Los productos de PCR fueron verificados, del mismo modo y con las mismas herramientas descritas en el apartado 1.3.2.

Se llevó a cabo la purificación de los productos mediante el kit GeneJet purification Kit (Fermentas). La PCR de secuenciación de los fragmentos purificados se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.4.2.

La visualización de los cromatogramas se llevó a cabo con el programa DNASTar (Lasergene). La comparación y posterior análisis de las secuencias obtenidas, se realizó en base a las recomendaciones del trabajo publicado por McQuiston y *col.*, 2008.

3.2. PCR específica para la determinación de la variedad Java

Se realizó una PCR mediante el sistema DreemTaq™ descrito en el apartado anterior para determinar si los aislados de la colección n°3 pertenecían a una variante monofásica del biotipo Java de *Salmonella* Paratyphi B dT(+). Los iniciadores fueron proporcionados por la sección de Enterobacterias del LNRS, así como las dos cepas utilizadas como control positivo y negativo.

El programa de amplificación fue el siguiente:

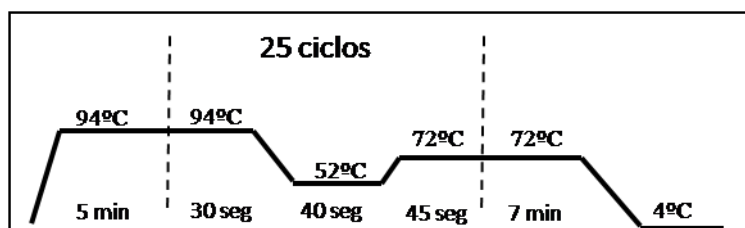


Figura 15. Programa de amplificación empleado en el LNRS para la determinación de la variedad Java.

3.3. Caracterización de la delección del gen *fljB*

3.3.1. PCRs para la detección de los genes *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* e *iroC*

Se realizaron 5 PCRs simples para comprobar la ausencia o presencia de los genes *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* e *iroC* (Tabla 10), que forman parte del operon *fljAB* o aparecen próximos a él (*iroB* e *iroC*). Los iniciadores empleados fueron los diseñados para el mapeo de genes de la colección de aislados nº2 (apartado 2.1.1., tabla 10), aplicando por tanto el mismo procedimiento de PCR y visualización.

3.3.2. Mapeo de genes

En base a los patrones obtenidos en el PFGE, planteamos la hipótesis de que el origen de esta variante monofásica podría ser el serotipo *Salmonella* Paratyphi B. Por esta razón se planificaron diferentes técnicas a llevar a cabo para la corroboración de esta hipótesis.

Basándonos en la secuencia del único genoma completamente secuenciado de *Salmonella* Paratyphi B dT(-) y disponible en la plataforma NCBI, se diseñaron 4 parejas de iniciadores para amplificar los genes próximos al gen *fljB* (Tabla 14). Utilizando las 4 parejas se aplicaron 4 PCRs en 3 de los 39 aislados monofásicos y en 2 cepas de *Salmonella* Paratyphi B dT(+) (LNRS) utilizadas como control positivo. Las PCRs se llevaron a cabo mediante el sistema pure-TaqTM Ready-To-Go Beads descrito anteriormente en el apartado 2.1.1.

Tabla 14. Iniciadores diseñados para la caracterización de los aislados de la colección n° 3.

Objetivo	Gen	Iniciador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)
Presencia/ ausencia de genes ceranos a <i>fljB</i>	SPAB3434	3434F	GGAACAGATTGCCCCGAAG	360
		3434R	TGGCTGGCAACCCCTTACC	
	SPAB3435	3435R	CGGTCCGGGTAGGTTATGTTG	501
		3436F	AAACTTCTTTCCATGCTTCAACC	
	SPAB3436	3436R	GAGGATGGCAGATATGAAATGACG	241
3437R		TTGATACATGATGAACAGTCCGTG		
PCR inversa	<i>iroB</i>	<i>iroBi</i>	AGCAGCATGATCAATACCTTCCTCG	-
		<i>iroBf</i>	GGCCATTAACACGAAACGCTTG	-
	<i>iroC</i>	<i>iroBR</i>	CAGGATTGGGGAAGTGGATTTCGCATACC	-
		SPBiroCF		

Basándonos en los resultados negativos obtenidos en este apartado, se resolvió proceder a corroborar la hipótesis de inicio mediante el uso de otras técnicas moleculares, descritas a continuación.

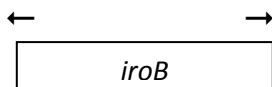
3.3.3. Secuenciación inversa

Se recurre a esta técnica cuando se desea conocer la secuencia adyacente a un fragmento conocido y no se dispone de información suficiente para llevar a cabo un proceso de amplificación y secuenciación tradicional. Consiste en:

- Elección del gen para el inicio de la secuenciación. Se seleccionó el gen *iroB* por encontrarse presente en el genoma objeto de estudio y por

suponer, en base a la experiencia con las colecciones anteriores, que se encontraba próxima a la zona de delección.

- Diseño de dos iniciadores específicos que sinteticen una cadena de ADN partiendo de los extremos de *iroB* con dirección “externa” al gen seleccionado (*iroBi*; 5'-AGCAGCATGATCAATACCTTCCTCG-3', *iroBf*; 5'-GGCCATTAACACGAAACGCT TG-3').



- Extracción de ADN. Se realizó mediante el kit ADN mini kit (Qiagen). La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop, Delaware, USA). Es aconsejable una concentración de entre 30 ng/μl y 60 ng/μl para una optimización de la técnica.
- Digestión del ADN genómico total con una enzima de restricción de corte no demasiado frecuente, se utilizó la enzima *PstI* (Fermentas) por no realizar ningún corte en el gen seleccionado (*iroB*) y producir una digestión de entre 600 y 900 fragmentos. Según instrucciones del fabricante se añadieron para un volumen final de 50 μl, 10 μl de ADN, 2,5 μl de *PstI* (15 U/ μl), 5 μl de Tampón de *PstI* y 32,5 μl de AD comercial (Fermentas). Se incubó en un termobloque a 37°C durante un mínimo de 4 h.
- Inactivación del enzima a 65°C durante 20 min

- Comprobación de la digestión en un gel de agarosa al 0,8% en TAE 1x, a 90V durante 50 min y visualización mediante tinción con bromuro de etidio y visualización en un Gel Doc XRS (Bio-Rad).
- Precipitación del ADN digerido, con una solución 24:1 de cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción 1:1. Centrifugación de 5 min a 13.000 rpm. Se transfiere la parte acuosa (superior) a otro eppendorf limpio y se mezcla en una proporción 1:1 con una solución alcohol isoamílico: fenol: cloroformo (AppliChem, Gatersleben, Saxony-Anhalt, Alemania). Centrifugación de 5 min a 13.000 rpm. Se transfiere la parte acuosa (superior) a otro eppendorf limpio y se mezcla en una proporción 1:0,6 con isopropanol (-20°C), y se centrifuga de 10 min a 13.000 rpm. Se desecha el sobrenadante y se procede a un lavado del sedimento con 100 µl de etanol absoluto (-20°C) mediante centrifugación 5 min a 13.000 rpm. Posteriormente se retira el etanol y se seca el sedimento a 37°C en un termobloque. Una vez eliminados los restos de etanol, se resuspende el sedimento en 20 µl de TE pH8.
- Ligación. Uso de T4 ADN ligasa (Roche). Se prepara una mezcla de un volumen final de 30 µl con 18 µl de AD comercial (Fermentas), 3 µl de tampón T4, 2 µl de T4 ADN ligasa (5u) y 7 µl de ADN procedente de la precipitación anterior. Se mantiene a 14°C toda la noche.
- Precipitación. Se procede del mismo modo descrito en el paso 7 pero resuspendiendo el sedimento final en 15 µl de TE pH8.

- *Long PCR*. Se utilizó el mismo kit comercial que el especificado en el punto 2.1.2. Se emplearon los iniciadores iroBi e iroBf en un volumen final de 50 μ l, con 20,25 μ l de AD comercial (Fermentas), 5 μ l de tampón 3, 2,5 μ l de cada dNTP, 2 μ l (1 μ M) de cada iniciador, 0,75 μ l del mix de enzimas Taq y Tgo y 10 μ l del ADN del paso anterior. El programa de amplificación utilizado fue el descrito en el punto 2.1.2.(fig. 12) Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE al 1x durante 70 min a 90V. Posteriormente se procedió a la tinción de los geles con bromuro de etidio y fueron visualizados en un Gel-Doc XRA (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular se utilizaron el Marcador X (Roche) y GeneRuler DNA 100bp Plus (Thermo Fisher Scientific). Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit GeneJet purification Kit (Fermentas).
- Clonación de los productos amplificados en *E. coli* con el fin de disponer de una reserva de producto amplificado para su secuenciación. La transformación se llevó a cabo utilizando el kit Clonning TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez realizada, se realizaron 3 siembras de 50 μ l, 100 μ l y 200 μ l en placas con medio Luria-Bertani-agar (LB) con 10 μ l de ampicilina (100 ng/ μ l) (Sigma). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24h. Se comprobó la inserción del producto en el vector y la transformación en las células de *E. coli* competentes, mediante una extracción de plásmidos con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (protocolo Plasmid ADN purification, Qiagen) siguiendo las

instrucciones del fabricante, y una posterior amplificación del gen *iroB* mediante una PCR con el sistema pure-Taq™ Ready-To-Go Beads (GE Healthcare AB) y el programa de amplificación descrito en el apartado 2.1.1. (fig. 11). Los productos de PCR fueron visualizados, del mismo modo y con las mismas herramientas descritas en el apartado 1.3.2.

- Secuenciación. Se utilizó el método descrito en el apartado 2.1.2. (fig. 13).
- Secuenciación en cadena (*walking-primer*). Se utilizó el método descrito en el apartado 2.1.3, utilizando los iniciadores especificados en la Tabla 14 (PCR inversa).

3.4. PCR y secuenciación.

Teniendo como punto de partida los datos obtenidos en la PCR inversa o secuenciación hacia fuera, se amplificó el fragmento entre el gen STM2744 y el STM2773 (*iroB*) descritos en *Salmonella* Typhimurium pero también presentes en *S. Paratyphi* B dT(+) (iniciadores detallados en la Tabla 10). La PCR se llevó a cabo en los 39 aislados objeto de estudio y en 6 cepas tipificadas como *Salmonella* Paratyphi B dT(+) variedad Java del CNM (utilizadas en este caso como control negativo), mediante el sistema descrito en el apartado 3.1.

Se llevó a cabo la secuenciación de 3 de los productos amplificados en los 39 aislados para comprobar la efectividad de los iniciadores y PCR.

Posteriormente se realizó una PCR con las 6 cepas de *Salmonella* Paratyphi B variedad Java, en la cual se amplificó un fragmento desde el gen

fljB al gen *iroB* para determinar su proximidad en el genoma en cepas de *Salmonella* Paratyphi B Java aisladas en España. Se utilizó el sistema DreamTaq™ de Fermentas y los programas de amplificación y secuenciación descritos en los apartados 2.1.1. (fig. 11) y 2.1.2. (fig. 13) respectivamente.

El análisis de PFGE se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.2. Dado que durante la realización del primer experimento se observó que estos aislamientos sufrían un proceso de autodigestión durante la electroforesis, en los ensayos posteriores se añadieron 782 µl de una solución de thiourea (10 mg/ml, Sigma) en el tampón de electroforesis para evitar este proceso.

Se realizaron 5 PCRs simples para comprobar la ausencia o presencia de los genes *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* e *iroC* tal y cómo se describe en el apartado 3.3.1.

4.1. Caracterización de la delección del gen *fljB*

4.1.1. Mapeo de genes

Se realizaron PCRs mediante el sistema DreamTaq™ descrito en el apartado 3.1., para confirmar la presencia o ausencia de 9 genes descritos en *Salmonella* Schwanzengrund entre los genes SesA2901 al gen SesA2914 y del mismo modo determinar el inicio y final de la delección del flagelo de segunda fase. Los iniciadores se diseñaron mediante el programa Primer3 y fueron proporcionados por la empresa Sigma (Tabla 16).

El programa de amplificación fue el descrito en el apartado 2.1.1. Los productos de PCR fueron visualizados, del mismo modo y con las mismas herramientas descritas en el apartado 1.3.2.

4.1.2. Secuenciación inversa

Se procedió del mismo modo descrito en el apartado 3.3.3. Los iniciadores seleccionados fueron los descritos en el mismo apartado (iroBi e iroBf) (Tabla 14).

4.1.3. Long-PCR y secuenciación

Basándonos en los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se realizó en 3 de los 19 aislados de esta colección, una *Long-PCR* entre el gen SesA_2902 (S2902F) y el gen SesA_2915 (iroBR). En la secuenciación se utilizaron de nuevo los iniciadores diseñados en la PCR inversa (Tabla 16), empleando la misma técnica de secuenciación en cadena, el mismo kit, programa de amplificación (fig. 12) y programa de secuenciación (fig. 13) descritos en los apartados 2.1.3. y 2.1.2. respectivamente.

Tabla 16. Iniciadores diseñados para la caracterización de los aislados de la colección nº 4.

Objetivo	Gen	Iniciador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)
Presencia/ ausencia de genes próximos a <i>fljB</i>	SesA_2902	S2902F	TAACCTTTTCCTGCCACCAG	352
		S2902R	AAGGGCAATGACTTTTACCG	
	SesA_2903	S2903F	TTACATTCACGCCTGATCATT	698
		S2904R	AGGGTTACGGGCTTTCTGTT	
	SesA_2904	S2904F	TCGTGACGACTTCTCACTGG	490
		S2905F	AGCGAAAAGAAAGCAAACG	
	SesA_2905	S2905R	CTGTACGCGCAATTGTGTTC	224
		S2906F	CGGACTTCTTCCAGCATTTTC	
	SesA_2906	S2906F	CGGACTTCTTCCAGCATTTTC	363
		S2907R	GGCCTGGATTTATCGTCTGA	
	SesA_2908	S2908F	GCTGACGAACGACAGATTCA	271
		S2908R	GATAACTACCGGGCACTGGA	
	SesA_2910	S2910F	ACCCATCGTTGGACTTGTCT	328
		S2910R	TTCAGAGCCTATTGGGATGC	
SesA_2914	S2914F	GAATCCAGTTCCTCAATCCT	110	
	S2914R	AAATCGGGAAAGAGGAGAGC		
PCR inversa	<i>iroB</i>	iroBi	AGCAGCATGATCAATACCTTCCTCG	-
		iroBf	GGCCATTAACACGAAACGCTTG	-
		iroBR	CAGGATTGGGGAAGTGGATTTCGCATACC	-
	EAE_1190	ENTF	TCCTAATTGCGAATGCTGTG	-
	IS30	EntfWP2	CTCAGAAGCGGAAGAGCAGT	-

RESULTADOS

1. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:i:- fagotipo U302. Colección n°1.

1.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)

Los datos recogidos del PFGE mostraron 60 patrones de bandas muy similares. Los patrones no mostraron más de 4 diferencias entre si, por lo que todos los aislados se agruparon dentro de un mismo tipo A, el cual se subdividió en 19 subtipos (A1-A19) (Fig. 16). Los diferentes perfiles mostraron de 12 a 15 bandas, teniendo en cuenta que algunos pulstipos presentaban el mismo número de bandas pero diferente peso molecular. Entre los 19 subtipos obtenidos se calculó un índice de diversidad de Simpson (SID) de 0,89. Las diferencias más significativas se hallaron en la región inferior del gel en los fragmentos menores de 190 kb (Fig. 16). La representación gráfica de las semejanzas de los perfiles se realizó mediante la construcción de un dendograma de similitud aplicando el índice de Dice y el agrupamiento por UPGMA (Fig. 16).

1.2. Análisis multilocus de repeticiones en tándem en número variable (MLVA).

En los perfiles obtenidos mediante el MLVA, se clasifican los fragmentos amplificados en el siguiente orden STTR 9 - STTR 5 - STTR 6 - STTR 10pl - STTR 3. En las PCRs múltiples, no se obtuvo amplificación con el iniciador STTR 10pl en ninguno de los aislados monofásicos, pero si con el resto de cepas de otros serotipos empleadas en este trabajo, por lo tanto se les asignó el alelo NA (*no amplification*) (Fig.16).

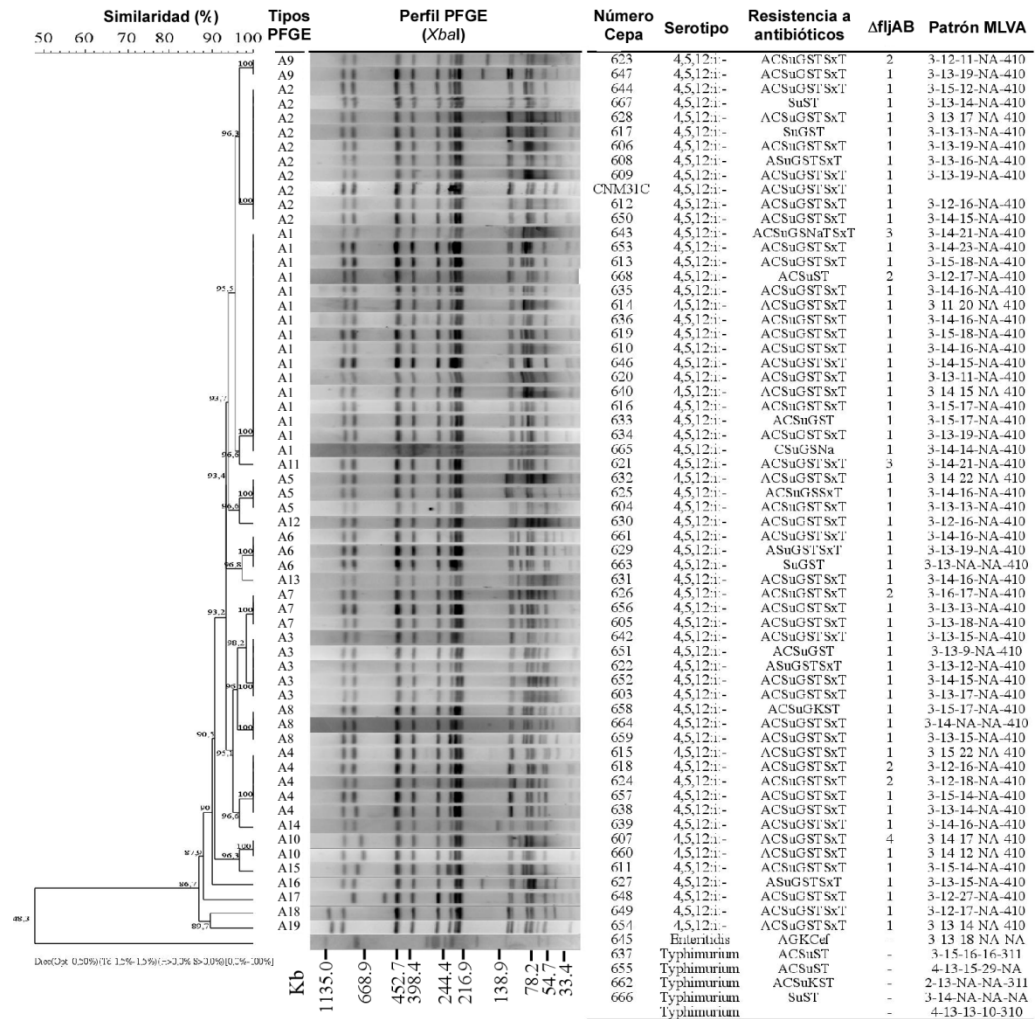


Figura 16. Agrupamiento obtenido con los patrones de PFGE. A su vez, en cada aislado se detallan los datos de fecha de aislamiento, origen, fórmula antigénica, fagotipo, perfil de resistencia, tipo de delección hallada y resultados obtenidos mediante el MLVA (Adaptado de Laorden y col, 2010).

En dos de las cepas de *Salmonella* Typhimurium utilizadas como control y en la cepa LT2, con el iniciador STTR9 se obtuvieron fragmentos de 180 pb y 162 pb respectivamente. En los 60 aislados monofásicos y el resto de cepas no monofásicas empleadas en esta investigación, el fragmento fue de 171pb. Utilizando la nomenclatura propuesta por Larsson y *col.* se les asignó un número de alelo de 4, 2 y 3 respectivamente (Fig.16 y Tabla 3). En el caso de los iniciadores STTR 5 y STTR 6 se obtuvieron fragmentos de diferente tamaño entre los diferentes aislados. En la amplificación con el STTR5 todos los aislados fueron amplificados ofreciendo fragmentos desde 241 pb hasta 271 pb, a las cuales se les asignó un número de alelo desde 10 hasta 15 (Fig. 16). Para el iniciador STTR 6 se obtuvo un porcentaje de amplificación del 93%, se obtuvieron 12 tipos de fragmentos de diferentes tamaños de 330 pb a 396 pb (Fig. 16) entre los alelos 11 y 22. El iniciador STTR 3 ofreció un porcentaje de amplificación del 21% en los aislados monofásicos, sin embargo amplificó un fragmento de 484 pb en todas las cepas de *Salmonella* no-monofásicas empleadas en el estudio. Por este motivo, se procedió a la realización de una PCR en la que únicamente se empleó el iniciador STTR3 sin marcaje. En este caso la amplificación fue del 100%. La secuenciación de estos fragmentos mostró el mismo número de repeticiones (4 repeticiones en el primer VNTR y 10 en el segundo) en todos los aislados monofásicos, localizadas en el gen *bigA*. A todos ellos se les asignó el número de alelo 410 (Fig. 16).

En resumen, se obtuvieron 32 perfiles diferentes entre los 60 aislados de la colección nº1, para las que se calculó un SID de 0,97.

1.3. Estudio de la delección del gen *fljB*

Para el estudio del extremo 5' de la delección, se emplearon los iniciadores 4512F y 4512R (Alvarez y *col.*, 2004). La amplificación en los 60 aislados mostró un fragmento de 705 pb. Mediante la secuenciación de estos fragmentos se comprobó que la delección comenzaba en el nucleótido 99 del gen STM2758 en todos ellos (Fig.17).

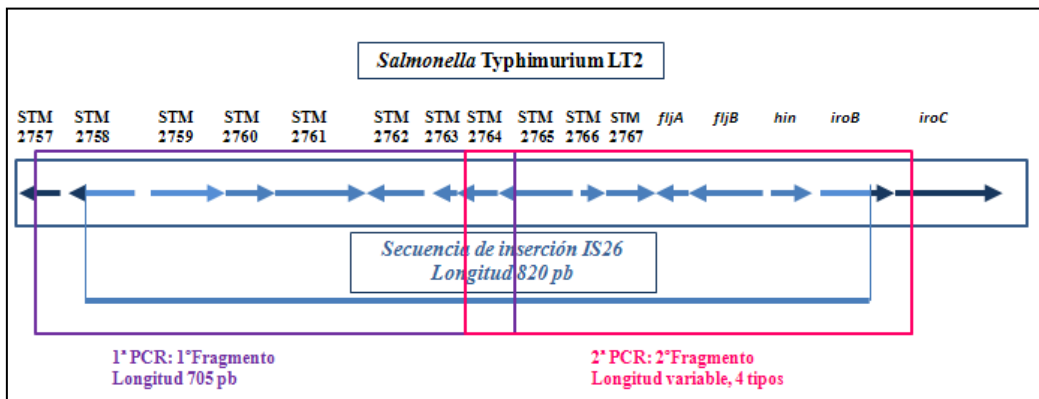


Figura 17. Tamaño y descripción de los fragmentos amplificados.

La amplificación del extremo 3' de la delección se realizó con los iniciadores IS26-3F y 2774-2R. En 52 de los 60 aislados estudiados se obtuvo un fragmento de 1100 pb cuya secuenciación reveló que la delección del operon concluía en el nucleótido 640 del gen *iroB* (STM2773) (Fig.18). Ambos fragmentos se solapaban en 60 nucleótidos con lo que se comprobó que la secuencia de inserción IS26 (820 pb), se localizaba en el centro de la secuencia (Fig.18). Este tipo de delección se clasificó como 1.Δ*fljAB*1. En cinco de los 60 aislados se obtuvo un fragmento de 900 pb cuya secuenciación reveló que en este caso la delección finalizaba en el nucleótido 872 del gen *iroB* (Fig.18). Al igual que en el caso anterior, la secuencia de inserción IS26 aparecía en la zona

central. Este tipo de deleción se clasificó como 1.ΔfljAB2. En los 3 aislados restantes no se obtuvo amplificación con los iniciadores diseñados para la amplificación del extremo 3'. Por lo tanto, se diseñaron 14 parejas de iniciadores para la amplificación de 14 genes posteriores al gen *iroC* (STM2774) con el fin de hallar el final de la deleción. En 2 de los aislados, todos los genes excepto el *iroC* estaban presentes, por lo que el diseño de una segunda pareja de iniciadores para amplificar el extremo 3' de estos aislados, permitió obtener un fragmento de 520pb cuya secuenciación reveló que el final de la deleción se encontraba en la posición 235 del gen *iroC*. Este tipo de deleción se clasificó como 1.ΔfljAB3 (Fig.18). Finalmente, en el último aislado que quedaba sin clasificar, se demostró la ausencia de todos los genes localizados entre STM2775 y STM2815. Una tercera pareja de iniciadores fue diseñada para la amplificación del segundo fragmento desde la IS26 hasta el inicio del gen STM2815. Se comprobó que en este caso la deleción se extendía hasta la base 543 del gen *emrA* (STM2814) (Fig.18). Esta deleción se clasificó como 1.ΔfljAB4.

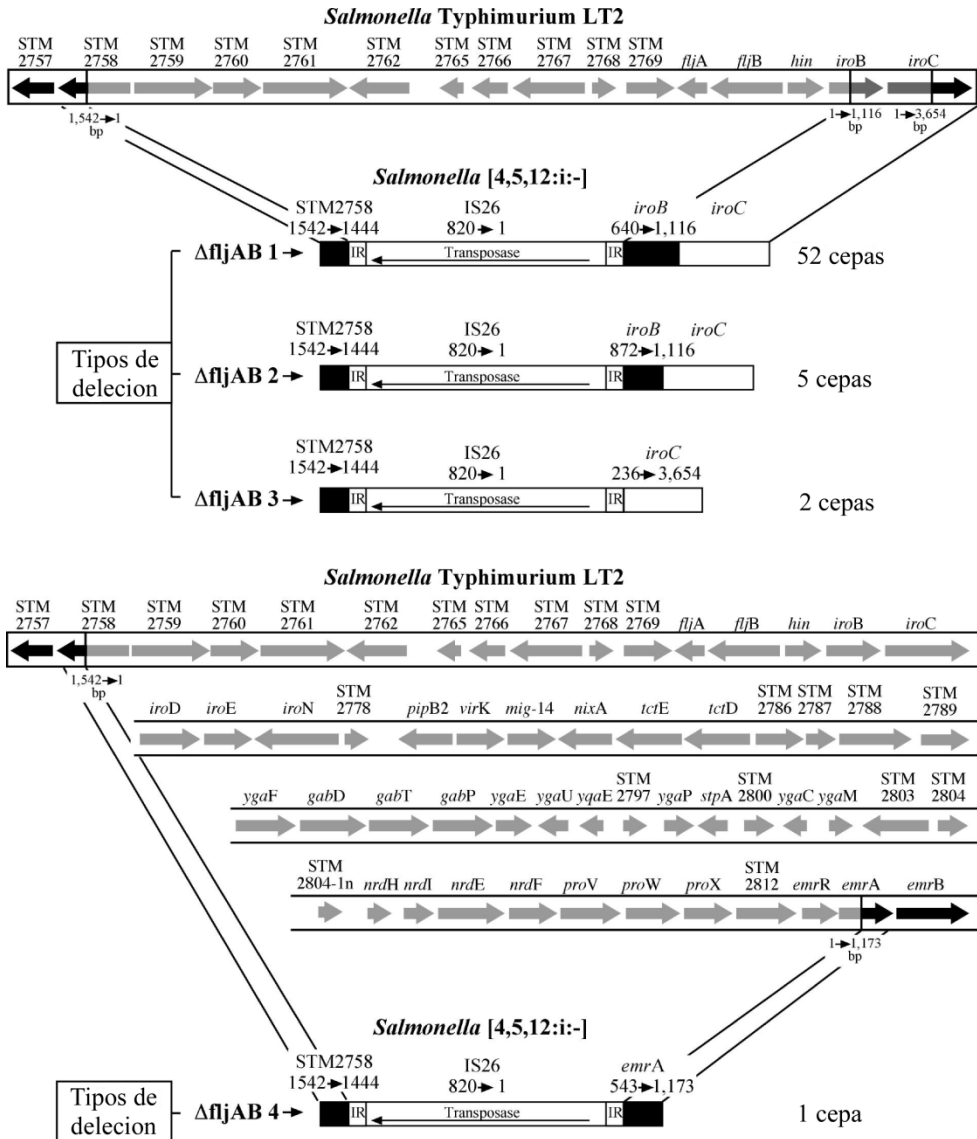


Figura 18. Localización de los genes próximos a la zona delecionada en el genoma de la cepa utilizada como referencia *Salmonella Typhimurium LT2* y los 4 tipos de deleciones halladas en el estudio entre los 60 aislados de *Salmonella enterica* variante monofásica 4,5,12:i:-. (Adaptado de Laorden y col., 2010).

Análisis informático de las secuencias

En el transcurso del análisis de las secuencias de la zona de la delección, se comprobó que el plásmido pU302L de *Salmonella* Typhimurium U302 poseía 5 copias idénticas de la secuencia de inserción IS26, 2 en 5'-3' y las otras 3 en 3'-5'. Mediante la herramienta de comparación de secuencias Blast del NCBI, se descubrió que tras la tercera copia de la secuencia de inserción IS26 del pU302L, una secuencia de 14 nucleótidos hibridaba con otra secuencia de 14 nucleótidos situada en el gen STM2758 de *Salmonella* Typhimurium justo en el lugar en el que comenzaba la delección de las 60 cepas monofásicas objeto de estudio (base 85 del gen STM2758) (Fig. 19).

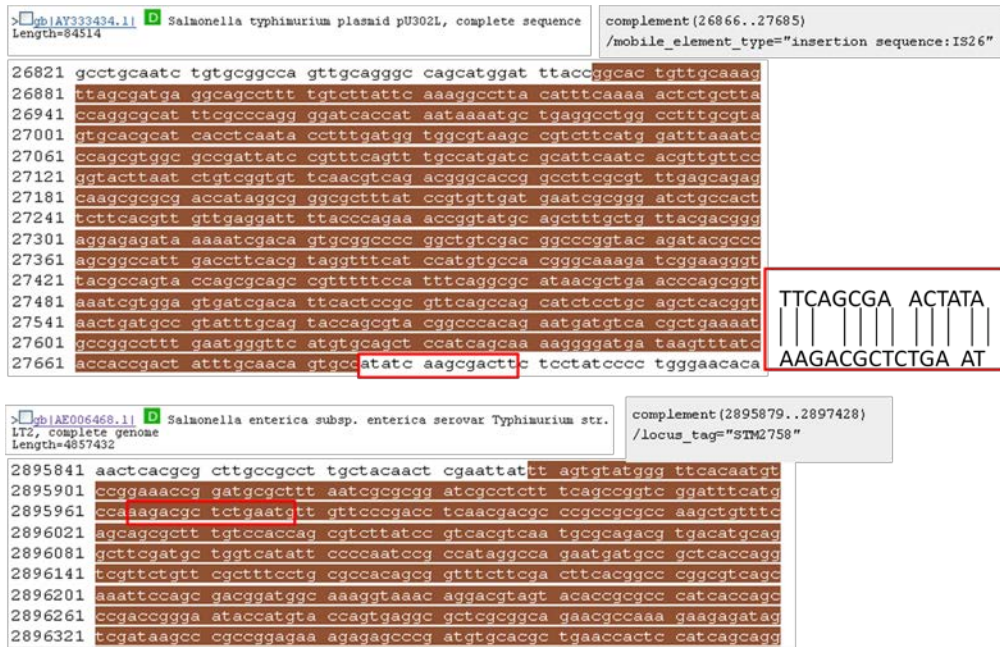


Figura 19. Imágenes obtenidas en el Blast del NCBI, se muestran las zonas de interés en este estudio del plásmido pU302L de *Salmonella* Typhimurium U302 y parte del gen STM2758 de *Salmonella* Typhimurium LT2. En rojo se muestran las secuencias de 14 nucleótidos las cuales difieren en 3 nucleótidos (79% de similitud).

1.4. Estudio de la presencia del plásmido pU302 con la secuencia de inserción IS26

Se seleccionaron 11 de los 60 aislados objeto de estudio en función del tipo de delección del operon *fljBA* (Tabla 15). Como cepa control se utilizó una cepa de *Salmonella* Typhimurium fagotipo U302. En todos los aislados se detectó un plásmido de gran tamaño de entre 125 y 180 kb. Del mismo modo, la sonda de IS26 mostró hibridación en todos ellos, tanto en la zona cromosómica (comprobada también por PCR) cómo en los plásmidos obtenidos (Fig. 20).

Tabla 15. Datos obtenidos mediante la técnica PFGE-S1 e hibridación con sonda IS26.

Nº Aislado	Tipo deleción	Tamaño del plásmido (kb)	Presencia IS26 en el plásmido	Presencia IS26 en el cromosoma
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	+	-

*Cepa control 5818/08, proporcionada por el LNRS.

*ND: No deleción

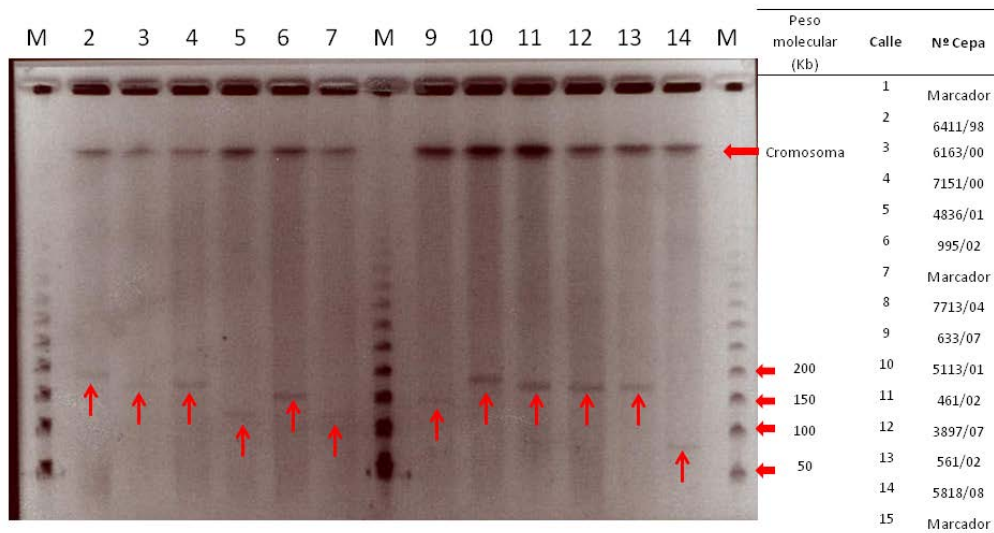


Figura 20. Plásmido amplificado mediante la técnica PFGE-S1 y el marcador empleado (Concatémeros del fago Λ). En el extremo derecho se enumeran los aislados empleados.

2. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,[5],12:i:- diversos fagotipos. Colección n°2

2.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)

Los datos recogidos del PFGE mostraron 10 perfiles diferentes entre los 13 aislamientos (Fig. 21). Entre los diferentes perfiles no había ninguno menor de 11 bandas ni mayor de 13, siendo las mismas de diferentes tamaños.

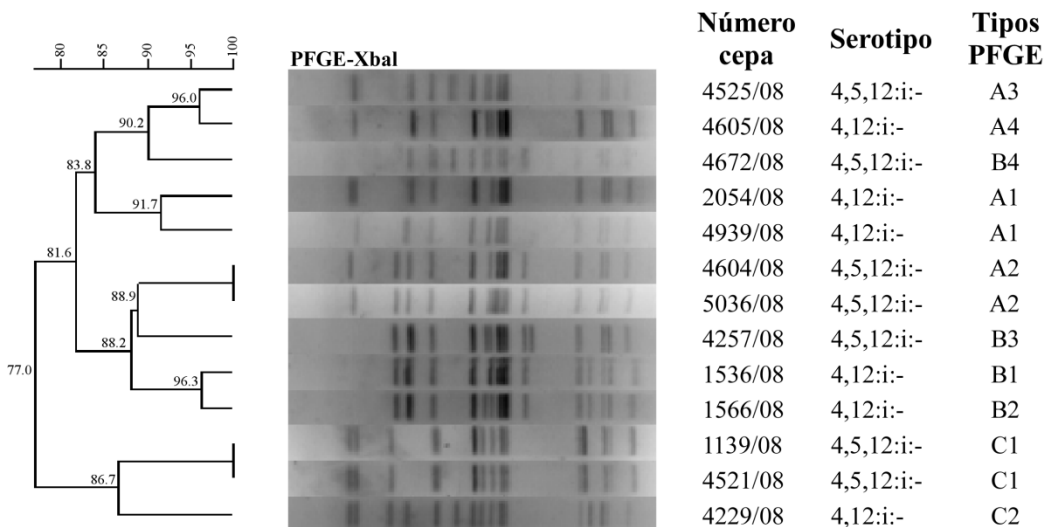


Figura 21. Dendrograma construido mediante el coeficiente de Dice y el agrupamiento por UPGMA.

Se contabilizaron más de 4 bandas de diferencia entre los perfiles, por lo que los aislados se clasificaron en 3 pulsotipos diferentes (A, B y C), dentro de los cuales se obtuvieron 4 subtipos (A1-A4), 4 subtipos (B1-B4) y 2 subtipos (C1-C2) respectivamente (Tabla 16). Se calculó un índice de diversidad de Simpson de 0,97.

2.2. Análisis multilocus de repeticiones en tándem en número variable (MLVA)

Se llevó a cabo la técnica MLVA con los 13 aislados de la colección, obteniendo 11 perfiles diferentes (Tabla 16).

Tabla 16. Perfil de PFGE asignado y el patrón de MLVA obtenido en las 13 cepas tipificadas.

AISLADOS	PFGE	MLVA STTR 9-5-6-10-3
1139/2008	C1	13-14-NA-09-210
4521/2008	C1	13-14-NA-09-210
4229/2008	C2	08-09-NA-11-210
4939/2008	A1	07-13-12-NA-210
1536/2008	B1	07-12-08-NA-310
1566/2008	B2	07-16-12-NA-310
2054/2008	A1	07-14-10-NA-210
4605/2008	A4	07-11-08-NA-210
4257/2008	B3	07-11-09-NA-210
4672/2008	B4	07-14-08-NA-210
4525/2008	A3	07-11-08-NA-210
5036/2008	A2	NA-12-NA-NA-210
4604/2008	A2	07-13-10-NA-210

En el 69% de los aislados se obtuvo un fragmento de 207 pb con el iniciador STTR9 (alelo 7), en el resto se amplificaron fragmentos de mayor

tamaño y en uno no se obtuvo amplificación (Tablas 3 y 16). En la amplificación con el STTR5 todos los aislados fueron amplificados ofreciendo fragmentos desde 235 pb hasta 277 pb, a las cuales siguiendo el criterio de Larsson *et al.*, 2009, se les asignó un número de alelo desde 09 hasta 16. Con el iniciador STTR6 no se obtuvo amplificación en el 30% de los aislados. En el resto se obtuvieron diferentes fragmentos los cuales fueron asignados a alelos desde 08 a 12. En el caso del STTR10 sólo se obtuvo amplificación en el 23% de los aislados, entre los cuales se obtuvieron 2 tamaños de fragmentos, asignados a los alelos 09 y 11. En la amplificación de los dos VNTRs que corresponden al alelo STTR3 se obtuvieron entre 2 y 3 copias del primer VNTR, sin embargo para el segundo VNTR que se amplifica en la zona, todos los aislados mostraron el mismo número de repeticiones, 10 (alelos 210 y 310 respectivamente). En todos los aislados se obtuvo amplificación con el STTR3 (Tabla 16).

La amplificación de los productos mostró 5 grupos de deleciones (Tabla 17). En el primer tipo, 2.ΔfljAB1, cuatro aislados mostraron una deleción entre el gen STM2692 y el gen STM2772. Dentro del segundo tipo, 2.ΔfljAB2, los tres aislados mostraron la presencia del gen *fljB* y únicamente se detectó la deleción del gen *hin* en dos de los aislados. En el tercer tipo, 2.ΔfljAB3, la deleción comprendía desde el gen STM2759 hasta el STM2773 (*iroB*). El tipo 4, 2.ΔfljAB4, únicamente se detectó en un aislado. La deleción se extendía desde el gen STM2767 hasta el STM2773 (*iroB*). Finalmente el quinto tipo, 2.ΔfljAB5, se detectó en 2 aislados que presentaban una deleción desde el gen STM2760 al STM2773 (Tabla 17).

2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa de fragmentos largos (*Long-PCR*) y secuenciación

Con el objetivo de conocer con mayor detalle la zona afectada por las deleciones, se llevó a cabo esta técnica para la amplificación de fragmentos de gran tamaño. Se obtuvieron fragmentos de PCR de diferentes tamaños en los distintos tipos de deleciones, para los que se diseñaron 5 sets de iniciadores, específicos para cada tipo de deleción (Tabla 10). Una vez caracterizados los 13 aislados, se diseñaron marcadores específicos con el fin de caracterizar una selección de 202 aislados del LNRS que presentaban características similares a los 13 originarios. En la nueva muestra se contabilizaron un total de 55 con alguna de las 5 deleciones caracterizadas en este trabajo por lo que el total de aislados que presentaban alguna de las deleciones ascendía a 68. Sin embargo, aunque el resto de aislados analizados no correspondieran a ninguna de las 5

deleciones caracterizadas en este estudio, si presentaron deleción del flagelo de segunda fase y a su vez mostraron al menos una inserción de la secuencia IS26.

Las amplificaciones de los fragmentos que limitaban las distintas deleciones y la posterior secuenciación de los fragmentos obtenidos mostraron los siguientes resultados:

Tipo 1: (2.ΔfljAB1) la deleción en estos aislados implicaba a 77 genes en lugar de los 79 detectados en el mapeo. El gen STM2693 estaba presente y únicamente tenía deleccionados los últimos 2 nucleótidos, y el gen STM2704 se detectó en el centro del fragmento insertado. Mediante la PCR de gran tamaño se obtuvo un fragmento de 8.827 pb desde el gen STM2692 al STM2773 y la secuenciación reveló que el fragmento insertado tenía una longitud de 5.654 nucleótidos. Mediante análisis comparativo se encontró que este fragmento era idéntico al descrito en la cepa 08-1736 de *Salmonella* Typhimurium procedente de Estados Unidos, cuyo genoma completo ha sido publicado recientemente (Strain y col., 2013, n° de acceso CP006602). En su mayor parte la secuencia consta de varios fragmentos detectados en varias cepas de *Salmonella* Typhimurium, entre ellas la cepa de referencia LT2 aunque sin presentar una homología completa, dejando algunas secuencias sin identificar. De los 5.654 nucleótidos, los primeros 4.769 comprenden desde el gen SE_19925 hasta el gen SE_19950 de la cepa 08-1736 de *Salmonella* Typhimurium. Los genes descritos codifican seis proteínas, dos proteínas diferentes del profago Gifsy-2 (correspondiente a los genes STM1053 y STM1054 de la cepa LT2, ninguno de ellos completo), la proteína UmuC al completo (STM 1997) y tres proteínas del profago Fels-2, dos de ellas encargadas del ensamblaje (*Tail fiber assembly protein*) y la tercera la proteína de la cola (*Tail protein*). Por otro lado, los

restantes 885 nucleótidos del fragmento de 5.654, se hibridaban con una ADN invertasa detectada también en la cepa 08-1735 de *Salmonella* Typhimurium, a 83 nucleótidos del gen SE_19950 (*Tail protein*). Las últimas tres proteínas de Fels-2 detectadas en la inserción en el genoma de la cepa de referencia LT2, corresponden a los genes STM2703, STM2704, STM2705 y STM2706, donde los genes STM2703, STM2705 y STM2706 en referencia a la LT2 están parcialmente delecionados. La deleción finalizaba en la zona intergénica *fljB* - *hin*, concretamente a 10 nucleótidos del extremo 3´del gen *fljB* (Fig. 22). Se contabilizaron un total de 4 cepas con esta deleción.

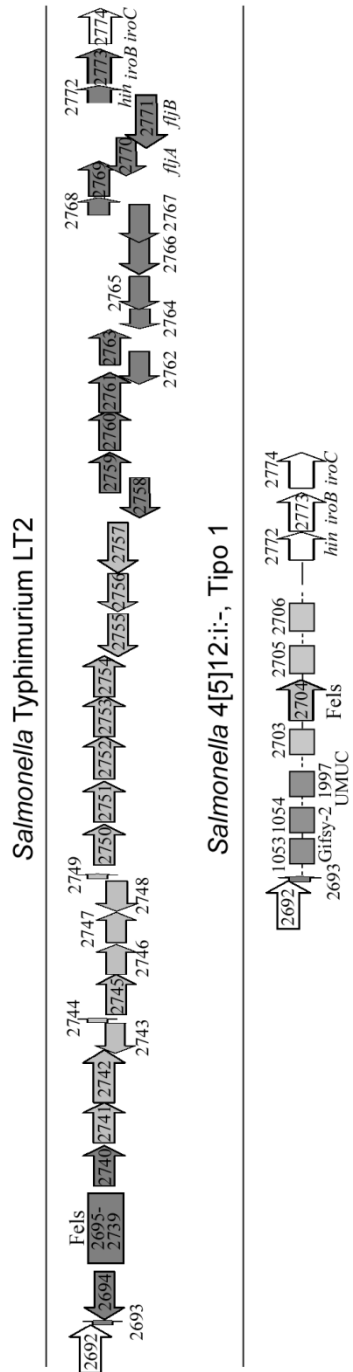


Figura 22. Se muestra la delección de Tipo 1, en comparación con el genoma de *Salmonella Typhimurium* LT2.

Tipo 2: (2.ΔfljAB2) En este caso mediante *Long-PCR* no se pudo obtener ningún fragmento entre los genes *fljA* e *iroB* (STM2770-STM2773). Por otro lado, los datos obtenidos mediante PCR convencional, mostraron únicamente la ausencia del gen *hin* (STM2772) en dos de los aislados y su presencia en un único aislado (1536/08). Sin embargo, mediante *Long-PCR* utilizando iniciadores localizados en los genes STM2770 y STM2774 si se pudo obtener un fragmento cuya secuenciación mostró el final e inicio de los genes *hin* e *iroB* (STM2773) y en la zona intergénica se detectó la secuencia de inserción IS26 (Fig. 26). Con el objetivo de hallar y aclarar el mecanismo genético implicado en la falta de expresión del flagelo de segunda fase, se enviaron a secuenciar completamente los tres aislados utilizados desde el inicio y clasificados como tipo 2.Δ*fljAB2* (1536, 1566 y 2054). Mediante los iniciadores diseñados en este trabajo, se amplió el estudio a nuevos aislados monofásicos de similares características de la colección del LNRS y se contabilizaron un total de 23 más, ascendiendo a un total de 26 aislados con el tipo 2.

Tipo 3: (2.ΔfljAB3) Mediante *Long-PCR* se obtuvieron dos fragmentos de diferente tamaño. Por lo tanto se subdividió este tipo en dos variantes A y B. En ambas variantes la delección finalizaba en el mismo nucleótido (Fig. 23).

Variante A: La delección comenzaba en el nucleótido 1.079 del gen STM2759 (longitud total de 1.679 pb). A continuación se detectó la inserción de la secuencia IS26 que finalizaba en la zona intergénica *hin* - *iroB*, concretamente a 612 pb del extremo 3' del gen *hin* y a 273 pb del extremo 5' del gen *iroB*.

Variante B: Los aislados pertenecientes a esta variante mostraron una deleción de menor tamaño. El gen STM2759 no presentaba deleción alguna, a continuación y a 142 pb del extremo 5' del gen STM2759 se encontraba IS26 cuya secuencia finaliza exactamente en el mismo nucleótido descrito en la variante A.

Como se ha comentado anteriormente, con el objetivo de ampliar el estudio a un mayor número de aislados, se emplearon los marcadores específicos para este tipo en una colección de aislados del LNRS que presentaban las mismas características, detectándose 25 aislados más, de los cuales 24 mostraron los dos fragmentos del tamaño correspondiente a la variante B (1.680 pb y 550 pb), y uno mostró los dos fragmentos correspondientes a la variante A (220 pb y 550 pb), contabilizando un total de 28 aislados del tipo 3 (2 del tipo 2.ΔfljAB3.A, 26 del tipo 2.ΔfljAB3.B).

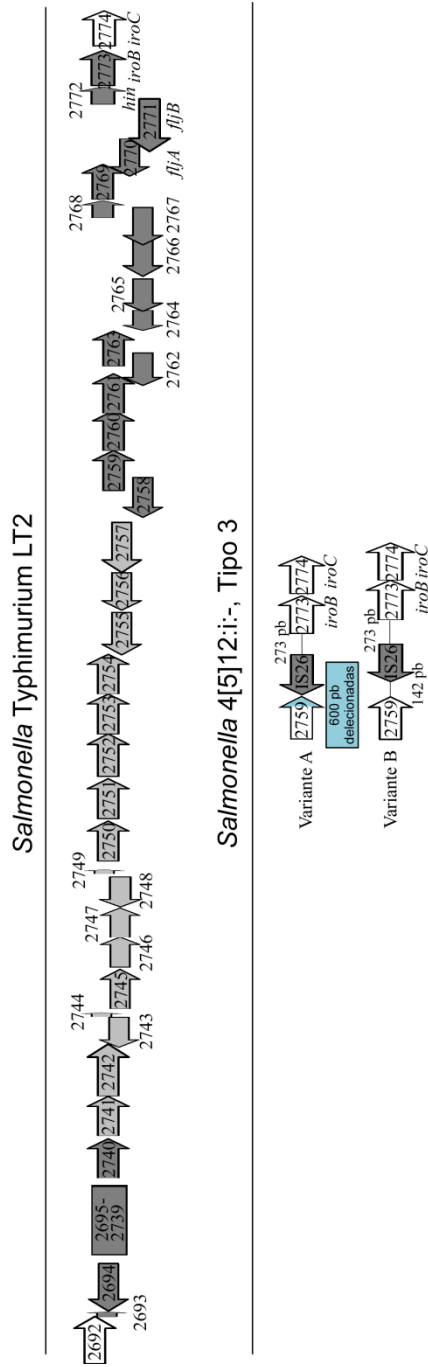


Figura 23. Se muestra la delección de Tipo 3, en comparación con el genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2.

Tipo 4: (2.ΔfljAB4) Únicamente la cepa 4525/08 mostró este tipo de deleción. En este caso comienza con la inserción de la secuencia IS1, colocada en sentido inverso, en la zona intergénica STM2767 - STM2768, concretamente a 118 pb del extremo 3' del gen STM2767. La secuencia de inserción IS1 presenta delecionados los primeros 133 nucleótidos debido a la inserción en éste punto de la secuencia de inserción IS26 (longitud total 820 pb). La secuencia IS26 concluye con la deleción del flagelo de segunda fase en la zona intergénica *hin* - *iroB*, exactamente en el mismo nucleótido descrito en la deleción tipo 2.ΔfljAB3 (Fig 24).

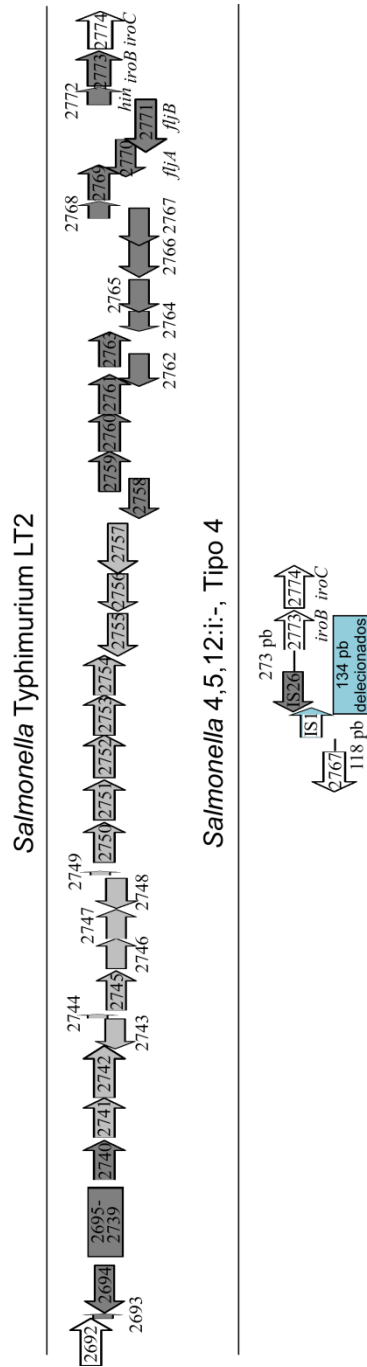


Figura 24. Se muestra la delección de tipo 4, en comparación con el genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2.

Tipo 5: 2.ΔfljAB5 es el tipo que mayor número de inserciones mostró. La deleción comenzaba en el nucleótido 1.125 del gen STM2761, parcialmente delecionado a causa de la inserción de la secuencia IS1. En este caso, a diferencia de la deleción 2.ΔfljAB4, la secuencia de inserción IS1 no está inversamente colocada, apareciendo en primer lugar el gen *insB* y a continuación el gen *insA*. Tras el último nucleótido de la secuencia IS1, se detectó un fragmento de 354 nucleótidos de un gen de 593 pb descrito en *S. Typhimurium* cepa T000240 (NCBI) que codifica un regulador transcripcional. Tras este fragmento se obtuvo una secuencia de varios genes descritos en el plásmido pSRC27-H de *Salmonella Typhimurium*: *tetA*, *tetR*, *jemC*, *jemB* y *jemA*. A continuación se encuentra la secuencia de inserción IS10 truncada en 973 de sus 1.238 pb. Este truncamiento se debe a la inserción de la IS26. El final de la secuencia de inserción IS26 se encuentra en el mismo punto entre los genes *hin* e *iroB*, tal y como se ha descrito en las deleciones anteriores. Cabe destacar que los genes *tetA*, *tetR*, *jemC* aparecen descritos también en la cepa de *S. Typhimurium* T000240. En conclusión, el fragmento insertado tiene una longitud total de 7.663 pb y fue el origen de la deleción de 12 genes, incluyendo el gen que codifica el flagelo de segunda fase (Fig. 25).

Con el fin de detectar más aislados de este tipo, se estudiaron aislados monofásicos de similares características de la colección del LNRS, detectándose 7 más con los dos fragmentos correspondientes a esta deleción (el primer fragmento de 1.500 pb y el segundo de 550 pb), ascendiendo a 9 el total de aislados con 2.ΔfljAB5. Mediante la plataforma BLAST del NCBI, se pudo comprobar la existencia de 14 nucleótidos idénticos entre la zona intergénica descrita (*hin-iroB*) y el comienzo de la primera copia de IS26 del plásmido

pU302L (es decir entre los nucleótidos 324-338 antes del comienzo del gen *iroB*).

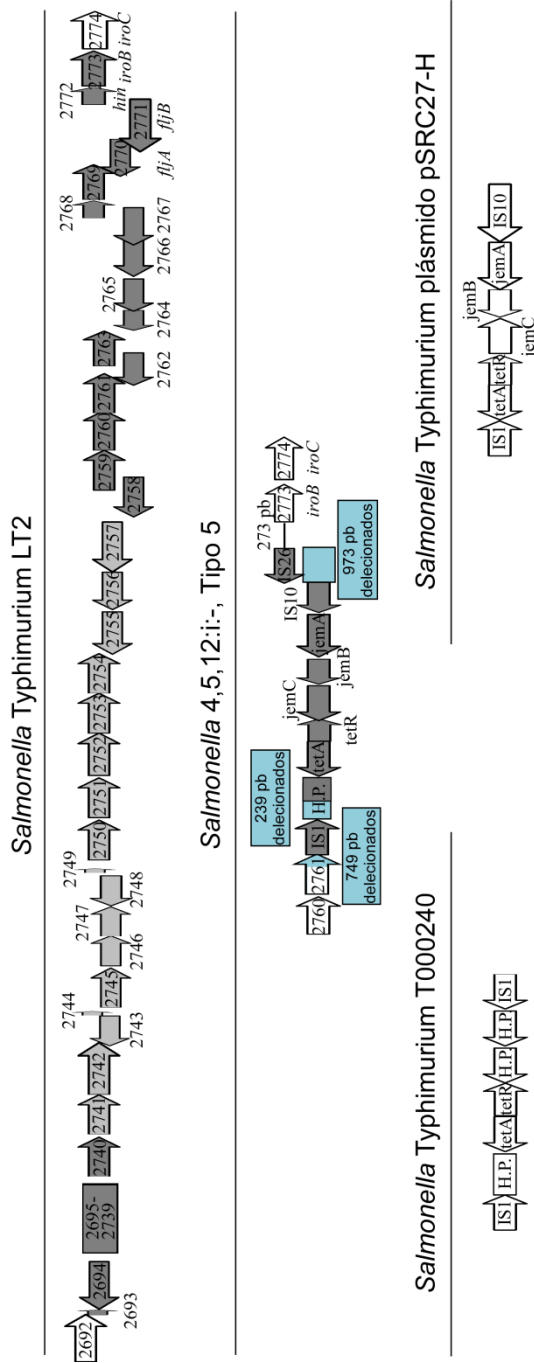


Figura 25. Se muestra la delección de Tipo 5, en comparación con el genoma de *Salmonella Typhimurium* LT2 y de *Salmonella Typhimurium* T000240 y el plásmido de *Salmonella Typhimurium* pSRC27-H.

2.3.3. Secuenciación del genoma completo (NGS)

Se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo en los tres aislados de la colección n°2 que en un principio se clasificaron con el tipo 2.Δ*fljAB*2. El análisis de las secuencias mostró diferencias entre las tres cepas.

En primer lugar, el aislado 1536/08 mostró la presencia de los genes *fljA*, *fljB* y *hin*, sin ningún tipo de delección. Tras el gen *hin*, en la zona intergénica *hin-iroB*, a 344 nucleótidos del gen *iroB*, comenzaba la secuencia IS26, tal y cómo se había detectado previamente por *Long-PCR* en este tipo de cepas. Mostraba un corte limpio, puesto que tras el final de la IS26, transcurría de nuevo la zona intergénica interrumpida y posteriormente los genes *iroB* e *iroC* sucesivamente.

En segundo lugar, el aislado 1566/08 presentaba también los genes *fljA* y *fljB* completos y a continuación se detectó el gen *hin*, parcialmente deletado en los últimos 33 nucleótidos. Esta delección, era debida a la inserción de los 520 pb finales de la secuencia de inserción IS26 (longitud total 820 pb). Con un solapamiento de 60 nucleótidos, seguido de la IS26, continuaba otro fragmento de 358 pb del inicio de otra IS26, tras la cual no se pudo determinar si continuaría el fragmento interrumpido del gen *hin*, u otra zona próxima en el genoma (Fig. 26).

Finalmente, el aislado 2054/08, mostró los genes *fljA* y *fljB* completos, y el gen *hin* interrumpido por dos secuencias de inserción IS26. Tal y cómo se muestra en la figura 26, en el nucleótido 374 del gen *hin*, se detectó un fragmento incompleto de 339 pb de una IS26. En su extremo final se insertaba otra copia completa de IS26, colocada en sentido 3'-5'. Tras esta segunda IS26,

aparecían los 205 nucleótidos restantes del gen *hin*, tras el cual, en la zona intergénica *hin-iroB*, exactamente en el mismo nucleótido descrito en el aislado 1536/08, se detectó otra copia de IS26 la zona intergénica interrumpida y el gen *iroB* (Fig. 26).

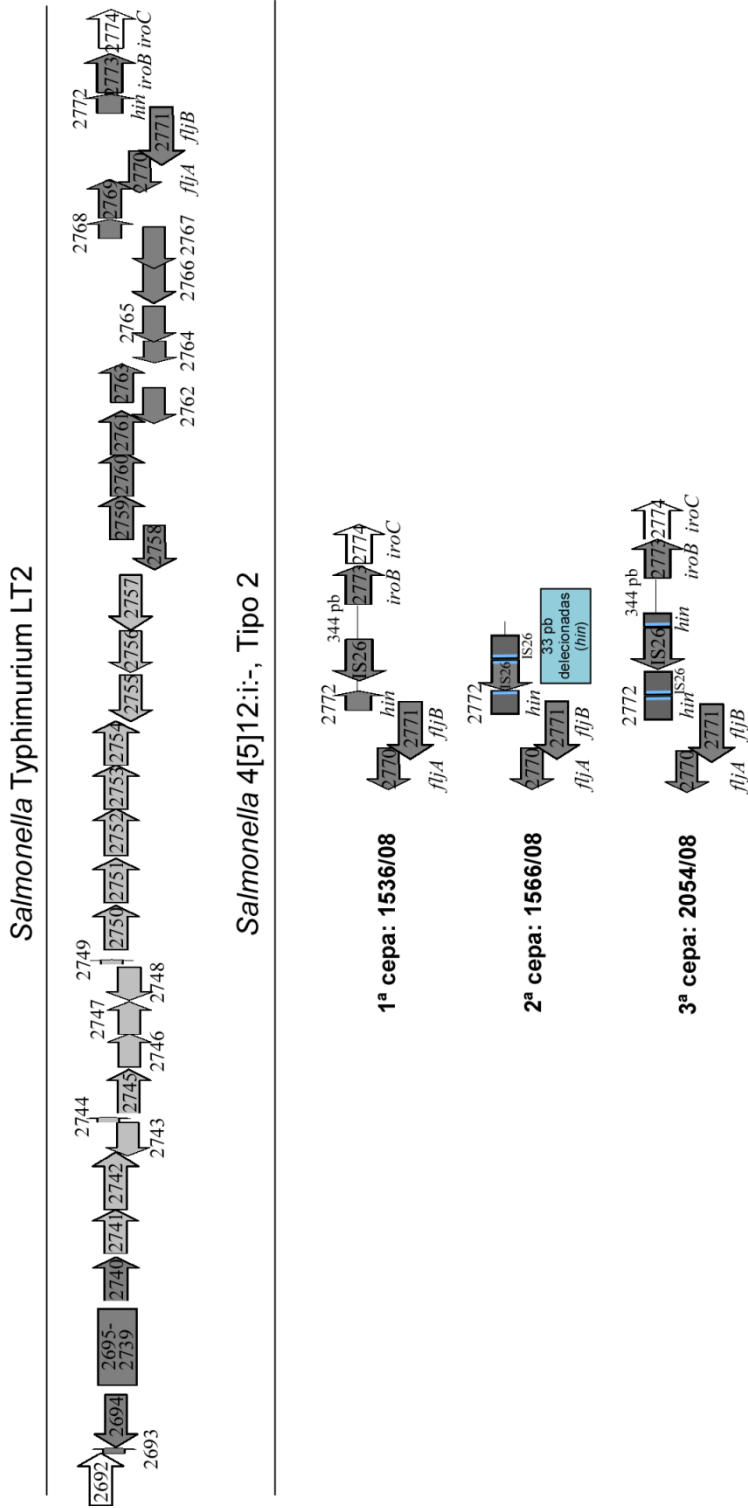


Figura 26. Se muestra la delección de Tipo 2, en comparación con el genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2. Se detalla la delección hallada en cada una de las tres cepas completamente secuenciadas.

3. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:b:-. Colección nº3.

3.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)

El análisis del PFGE mostró 10 perfiles diferentes entre los 39 aislados estudiados (Fig. 27). Entre los diferentes perfiles no había ninguno con un número menor de 12 bandas ni mayor de 15. Entre los distintos perfiles se contabilizaron más de cuatro bandas de diferencia por lo que se identificaron 5 pulsotipos diferentes A, B, C, D y E. El pulsotipo A se divide en 3 subtipos; A1 (28 aislados), A2 (1 aislado) y A3 (1 aislado). El pulsotipo B está formado por 3 aislados de idéntico perfil. El pulsotipo C lo compone un único aislado. El pulsotipo D está compuesto por los subtipos D1, D2 y D3 con un aislado cada uno. Los perfiles con mayor número de diferencias respecto al perfil mayoritario, se agrupan en el pulsotipo E compuesto por los subtipos E1 y E2 con un aislado respectivamente. Se obtuvo un SID de 0,48.

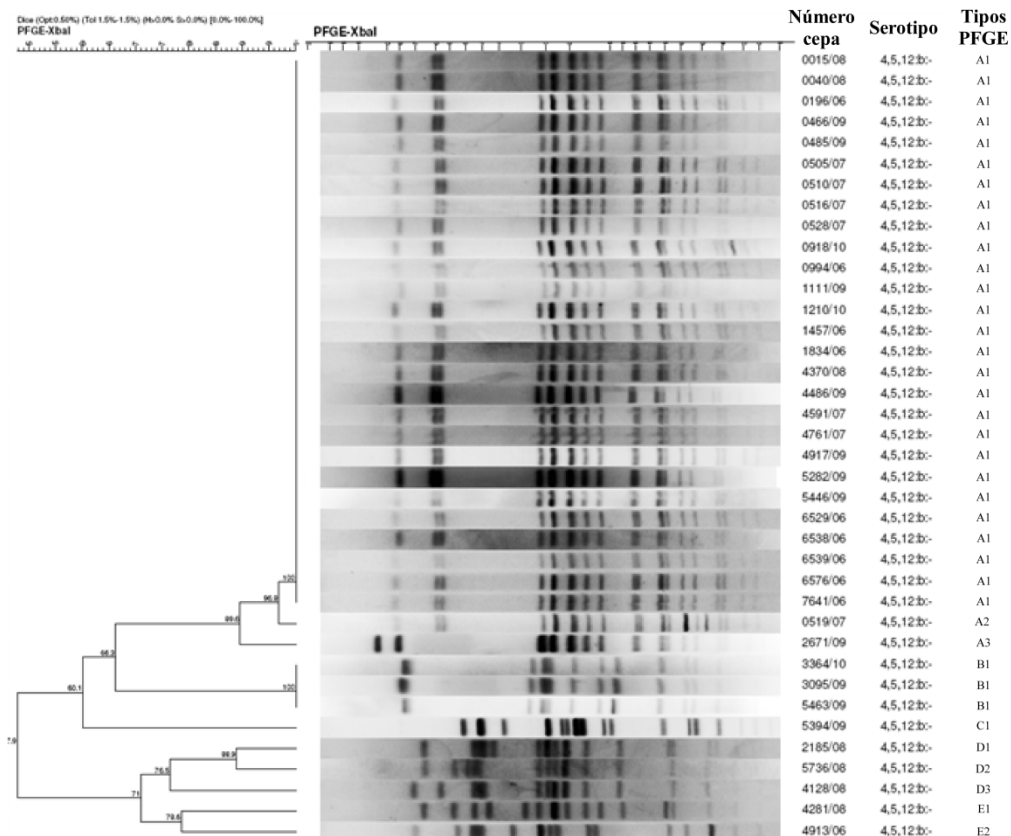


Figura 27. Dendrograma construido mediante el coeficiente de Dice y el agrupamiento por UPGMA.

3.2. PCR subespecie

Dado que existe un serotipo de la subespecie *salamae* (II) de *S. enterica* con la fórmula antigénica 4,12:b:-, para cumplir con el objetivo de caracterizar esta variante, se llevó a cabo una PCR con los aislados de la colección n° 3, para determinar su subespecie. Se confirmó que todos pertenecían a la subespecie *enterica* (I) de *Salmonella enterica*.

3.3. PCR variedad Java

Con el objetivo de determinar si los aislados de la colección n°3 pudieran provenir de la variedad Java de *Salmonella* Paratyphi B, se realizó una amplificación con iniciadores específicos para la amplificación de un gen relacionado con el metabolismo del tartrato, en la cual 38 de los 39 aislados de ofrecieron el fragmento del tamaño esperado, confirmando a los 38 aislados como una variante monofásica de *Salmonella* Paratyphi B variedad Java.

3.4. Caracterización de la delección del gen *fljB*

3.4.1. PCRs para la detección de los genes *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* e *iroC*

Se realizaron 5 PCRs para comprobar la presencia o ausencia de los genes *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* e *iroC*. En todos los aislados se obtuvo amplificación para los genes *iroB* e *iroC*. Sin embargo no se obtuvo amplificación de los genes *fljA*, *fljB* y *hin* (Tabla 18).

3.4.2. Mapeo de genes

Se realizaron 4 PCRs para comprobar la presencia/ausencia de 4 genes (Tabla 18) descritos en el único genoma completamente secuenciado de la cepa

SPB7 de *Salmonella* Paratyphi B (dT-) y disponible en la plataforma NCBI (n° acceso CP000886). Los genes seleccionados se encuentran contiguos al gen *fljB* en el genoma de *Salmonella* Paratyphi B (dT-) (Fig. 28). Sin embargo, no se obtuvo amplificación en los aislados monofásicos objeto de estudio, ni en las 2 cepas utilizadas como control de *Salmonella* Paratyphi B variedad Java (dT+) (LNRS).

Tabla 18. Se muestra los resultados de amplificación de los genes testados, tanto en los aislados monofásicos como en las cepas control.

Genes testados	Aislados pertenecientes a la colección n°3	<i>Salmonella</i> Paratyphi B Java (dT+). Control
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. Secuenciación inversa

Con el objetivo de determinar el inicio y final de la delección y dado que desconocíamos la disposición de los genes próximos a la delección en los aislados monofásicos, procedimos a llevar a cabo la técnica de secuenciación inversa, partiendo del único gen detectado, el gen *iroB*. Para ello, se seleccionaron 3 aislados, con perfiles de PFGE diferentes, para llevar a cabo la técnica. En un aislado (1111/09) con el perfil de PFGE más común (Pulsotipo A, en 30 aislados de 39), se obtuvo un fragmento de 1.600 pb cuya secuenciación reveló que los genes *iroB* e *iroC* aparecían contiguos como se describe en *Salmonella* Typhimurium (Fig. 28). También se comprobó que antes del gen *iroB* aparecían 396 pb de la zona intergénica *hin* - *iroB*, confirmando la proximidad entre ambos. A continuación, se encuentra una secuencia de 183 pb que presenta homología con un fragmento del gen *api81* descrito en una isla de patogenicidad de la cepa 32777 de *Yersinia pseudotuberculosis* denominada YAPI (nº acceso NCBI AJ627388.1). Este gen codifica para una transposasa descrita en *Y. pseudotuberculosis* y que a su vez coincide en 66 nucleótidos con una IS1351 e IS200 de *Salmonella* Enteritidis (nº de acceso Z83734). Tras esta secuencia de 183 pb, se obtuvo parte de la secuencia del gen STM2745 de *Salmonella* Typhimurium LT2. Únicamente aparecían los primeros 215 nucleótidos y a continuación los genes STM2744 y STM2743, sin delecciones ni inserciones (Fig. 28).

En los otros dos aislados monofásicos utilizados en la técnica, únicamente se pudo comprobar que los genes *iroB* e *iroC* aparecían contiguos, pero no se pudo determinar el motivo de la delección del gen *fljB*. Por tanto, tal y

cómo se muestra en la figura 28 la disposición de los genes previos al *fljB* es diferente de la cepa completamente secuenciada de *Salmonella* Paratyphi B (dT-). En los aislados cuya deleción queda caracterizada en este trabajo (30 de 39), es visible una zona con restos de elementos de transposición (transposasa presente en *Yersinia pseudotuberculosis*) del ADN en el centro de la deleción y a ambos extremos genes habituales en *Salmonella enterica* sin más inserciones ni deleciones (Fig. 28).

3.5. PCR y secuenciación.

Con el objetivo de corroborar los datos obtenidos en la técnica de secuenciación inversa se amplificó el fragmento entre el gen STM2744 y el gen STM2773 (*iroB*). Entre los 39 aislados monofásicos, se obtuvo el fragmento esperado de 737 pb en los 30 correspondientes al pulsotipo A. En los 9 aislados restantes, con diferentes perfiles de PFGE, no se obtuvo amplificación de esta zona, al igual que en las 6 cepas proporcionadas por el LNRS utilizadas como control de *Salmonella* Paratyphi B variedad Java (dT+).

Únicamente se secuenciaron 3 de los productos amplificados y se comprobó efectivamente que en el nucleótido 215 del gen STM2745 comenzaba la delección, que a continuación había una secuencia de 183 pb correspondiente a *Yersinia pseudotuberculosis*, tras la cual continuaban 396 pb de la zona no codificante entre *hin* e *iroB* (Fig. 28). Posteriormente se realizó una PCR con las 6 cepas de *Salmonella* Paratyphi B variedad Java (LNRS), con el objetivo de comprobar la proximidad entre el gen *fljB* y el gen *iroB* en el genoma en cepas de *S. Paratyphi B* Java aisladas en España. Todas fueron amplificadas mediante los iniciadores utilizados y la secuenciación confirmó la posición de estos dos genes, próximos entre sí tal y cómo se describe en el genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2 y no en el genoma disponible de *Salmonella* Paratyphi B (dT-) del NCBI (no se pudo realizar comparación con la variedad Java al no haber genomas disponibles secuenciados en las bases de datos).

4. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* variante monofásica 4,5,12:d:-. Colección nº4

4.1. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE)

El análisis del PFGE mostró 4 perfiles diferentes entre los 19 aislados de esta colección (Fig. 29). Entre los diferentes perfiles no se obtuvo ninguno con menos de 14 bandas ni más de 16. No se contabilizaron más de 3 bandas de diferencia entre los perfiles por lo que se agruparon todas las cepas dentro del mismo pulsotipo (A). Los 4 subtipos A1, A2, A3 y A4, obtenidos estaban formados por 16, 1, 1 y 1 aislado respectivamente con un valor de SID de 0,3.

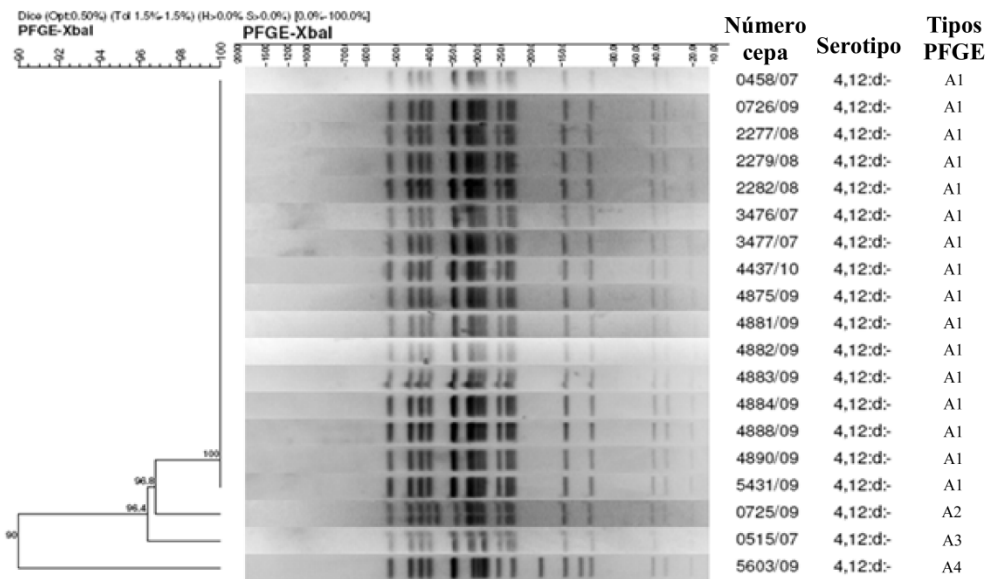


Figura 29. Dendrograma elaborado mediante el coeficiente de Dice y el agrupamiento por UPGMA.

4.2. Caracterización de la delección del gen *fljB*

4.2.1. PCRs para la detección de los genes *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* e *iroC*

Se realizaron 5 PCRs en los aislados que configuran la colección n°4 para comprobar la ausencia o presencia de los genes *fljA*, *fljB*, *hin*, *iroB* e *iroC*. En todos ellos se obtuvo amplificación para los genes *iroB* e *iroC*. Sin embargo no se obtuvo amplificación de los genes *fljA*, *fljB* y *hin* en ninguna de las 19 cepas objeto de estudio.

4.2.2. Mapeo de genes

Dado que la fórmula antigénica y el perfil de PFGE sugería la posibilidad de que esta variante monofásica derivara del serotipo *Salmonella* Schwarzengrund, se diseñaron 8 parejas de iniciadores para confirmar la presencia o ausencia de 9 genes descritos en *Salmonella* Schwarzengrund (CP001127.1) entre los genes SesA_A2901 y SesA_A2914 con el fin de determinar el inicio y final de la delección de los genes implicados en la síntesis del flagelo de segunda fase. De este modo se confirmó la presencia de los genes comprendidos entre SesA_A2901 y SesA_A2904 y la ausencia de los genes desde SesA_A2905 a SesA_A2913 (*hin*).

Mediante *Long-PCR* se intentó, sin éxito, obtener una amplificación entre los genes SesA_A2904 y SesA_A2914.

4.2.3. Secuenciación inversa

Se utilizó esta técnica en dos de los aislados objeto de estudio. Ambos mostraron idéntico resultado. Partiendo del gen *iroB* (SesA_A2915), se obtuvo un fragmento de entre 5.000 y 6.000 pb cuya secuenciación reveló lo siguiente: aparecen los genes *iroC* (SesA_A2916), *iroB* (SesA_A2915) y SesA_A2914, y a continuación 396 pb de la zona intergénica *iroB* - *hin* (SesA_A2913). Después, aparece un fragmento no identificado de 153 pb, seguido de otro fragmento de 400 pb con homología a una secuencia de *Enterobacter aerogenes* (nº acceso CP002824), dentro del cual 90 pb y 82 pb pertenecen a los extremos adyacentes y no codificantes de una proteína no caracterizada de 228 pb. Posteriormente, aparece una secuencia de 1.982 pb no identificada, seguida de un nuevo fragmento de 620 pb de una zona correspondiente al genoma de *Enterobacter aerogenes*, donde 596 pb corresponden al extremo final de la secuencia de inserción IS30 y 24 pb a la zona no codificante del extremo 5' de la IS30 (longitud total 998 pb) (Fig. 30).

4.2.4. Long-PCR y secuenciación

Con el objetivo de comprobar los datos obtenidos en la técnica de PCR inversa sobre el final de la delección del flagelo de segunda fase y poder determinar el inicio de la delección, se amplificó el fragmento entre el gen SesA_A2902 y el gen SesA_2915 (*iroB*). Los datos confirmaron la disposición de las secuencias y/o fragmentos hallados y descritos en el apartado anterior e incluso se pudo determinar el inicio

de la deleción. En este caso se obtuvo la secuencia de inserción IS30 al completo (1.022 pb: 998 pb de la IS30 y 24 pb de la zona no codificante contigua). Tras el primer nucleótido de la secuencia de inserción IS30 aparece el gen SesA_A2902 de *Salmonella* Schwanzengrund (Fig. 30). Del mismo modo se pudo confirmar que los genes SesA_A2903 y SesA_A2904 a pesar de encontrarse presentes en el genoma de los aislados de la colección nº 4 no se encontraban en la zona implicada en la deleción del flagelo de 2ª fase, hallándose posiblemente en otra región.

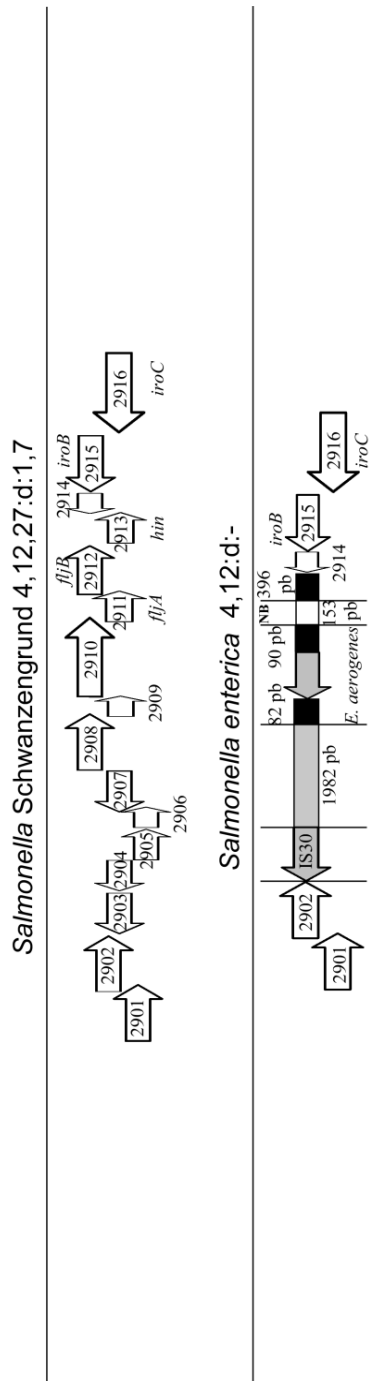


Figura 30. Se muestra la disposición de las diferentes secuencias halladas en el interior de la delección del flagelo de segunda fase en las cepas de la colección n° 4.

DISCUSIÓN

Las mutaciones espontáneas, la selección y el aislamiento son elementos clave en la evolución biológica (Arber, 1991). El desarrollo en las funciones de un gen es el resultado de procesos de reordenamiento del ADN y de alteraciones en las secuencias nucleotídicas, provocadas por sustituciones de nucleótidos, pequeñas deleciones, inserciones y duplicaciones, a menudo provocadas por la trasposición de elementos genéticos móviles (Arber, 1990 y 1991). Como pilar fundamental de la evolución, el organismo capaz de cambiar y adaptarse de forma más eficiente a su entorno es el que obtendrá ventajas evolutivas y favorecerá la supervivencia de su propia especie.

En la actualidad, en el esquema vigente de Kauffman y White, publicado en 2007, se recogen un total de 2.579 serotipos de *Salmonella*, entre los que se describen más de 350 serotipos monofásicos como Typhi, Dublin o incluso aflagelados como Gallinarum (Grimont y Weill, 2007). Por otro lado existen variantes originadas a partir de los más de 2.500 serotipos que no se recogen en el esquema de Kauffman y White pero se describen en varias publicaciones en todo el mundo (Barco y col. 2014, Prendergast y col. 2013, Mandilara y col. 2013, Gallati y col. 2013, Bugarel y col. 2012, Wasyl y col. 2012, Hopkins y col. 2012, Hernández y col. 2012, Gossner y col. 2012, Laorden y col. 2010, Hauser y col. 2010). En relación a la ventaja evolutiva que esta mutación les pueda suponer, estas variantes pueden desaparecer, o por el contrario pueden estabilizarse y ocupar o compartir el nicho de su antecesora. Este último es el caso de las variantes descritas en las colecciones uno y dos de la presente tesis doctoral, cuyos aislados se encuentran entre los más frecuentes en diversos países (EFSA, 2010).

En el año 1997 se aisló en España por primera vez la cepa monofásica de *Salmonella enterica* con fórmula antigénica 4,5,12:i:-, pasando a ser el cuarto serotipo más frecuentemente aislado en nuestro país en 1998 (Echeita y col., 1999). Debido a este incremento, se llevaron a cabo diversos estudios con el fin de establecer su posible origen (Echeita y col. 1999, Echeita y col. 2001, Garaizar y col. 2002, Guerra y col. 2000). En el estudio realizado por Echeita y col. en 2001, se demostró la relación entre *Salmonella* Typhimurium y el nuevo serotipo atípico de *Salmonella*. En dicho trabajo se investigaron dos secuencias específicas de *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT104 y fagotipo U302, las cuales fueron detectadas en *Salmonella enterica* 4,5,12:i:-, demostrando el vínculo evolutivo entre ambos serotipos (Echeita y col. 2001). La característica principal de esta variante es la delección del operon responsable de la síntesis del flagelo de segunda fase lo que las convierte en cepas monofásicas y explica la ausencia de reacción en la fórmula antigénica.

Otra de las características de la variante monofásica surgida en el año 1997 fue la multirresistencia antibiótica a ampicilina, cloranfenicol, sulfonamida, gentamicina, estreptomina, tetraciclina y sulfametoxazole-trimetoprim (R-ACSuGSTSxT), y que en más del 55% de los casos pertenecían al fagotipo U302 (de la Torre, 2006, Usera y col., 2001). Cabe hacer notar la resistencia de estas cepas frente a gentamicina, resistencia poco frecuente entre las cepas de origen humano recibidas en el LNRS (Echeita y col., 2005). En 2004 (Guerra y col., 2004) se realizó un estudio para determinar los mecanismos moleculares de las resistencias a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* Typhimurium multirresistentes entre las que se encontraba la variante monofásica que compone la colección nº1. Comprobaron que los

determinantes de resistencia que posee esta variante se encuentran en diferentes plásmidos de resistencia a antibióticos. En el trabajo detectaron un plásmido híbrido de 200 kb (pUO-St-VR3) con genes que confieren resistencia a antimicrobianos como *dfrA12* para resistencia a trimetoprim y *aadA2* para estreptomicina y que sólo se había descrito en esta variante monofásica emergente. También concluyen que los perfiles de multirresistencia y la localización de los determinantes de virulencia en el cromosoma o en plásmidos permite realizar agrupamientos entre las cepas que pertenecen a diferentes líneas evolutivas y dichos agrupamientos muestran una estrecha relación con los agrupamientos realizados mediante PFGE. Señalan incluso que en la década de los 90, se detectó un linaje de *S. Typhimurium* DT104, con un perfil de tetrarresistencia R-ACSuST ampliamente extendido. Los cinco determinantes de resistencia (pentarresistencia) formaban parte de la isla de patogenicidad SGI del cromosoma de *Salmonella*, que contiene dos integrones de clase 1 (Guerra y *col.*, 2004). Como se ha visto en las cepas monofásicas de la colección n° 1 con fagotipo U302, incluyen las resistencias a gentamicina y sulfametoxazol-trimetoprim, la última localizada en el nuevo plásmido descrito y detectado únicamente en la variante monofásica. En este linaje clonal, los determinantes de resistencia se encuentran en plásmidos, que también llevan integrones de clase 1. Este dato indica por un lado el posible origen evolutivo de la variante monofásica 4,5,12:i:- en *Salmonella* Typhimurium y por otro lado nos permite apoyar el origen común de todos los aislados de la colección n°1 a pesar de la pérdida de alguna de las resistencias en 13 de los aislados. Los plásmidos confieren características añadidas a la bacteria que los posee pero no son imprescindibles en su supervivencia o replicación, por lo que durante la

replicación de la bacteria pueden perderse a causa de la presión selectiva o los genes que contienen pueden acumular con mayor facilidad mutaciones o deleciones. De este modo tras detectar que de los 60 aislados de *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- U302 analizados 47 muestren el perfil de resistencia característico de esta variante y de los otros 13 aislados 9 difieren únicamente en la pérdida de una sola resistencia, nos permite apoyar la homogeneidad de este grupo y apoyar la teoría planteada por Guerra sobre un origen cercano y común entre estos aislados señalándolos como miembros de una misma línea evolutiva y clonal.

La identificación de diferentes tipos de organismos dentro de una especie se denomina tipificación (Sabat y *col.*, 2013). Los métodos de tipificación que discriminan entre diferentes aislados bacterianos de la misma especie, son herramientas epidemiológicas esenciales para la prevención y control de la infección. Los métodos tradicionales de tipificación basados en el fenotipo, como el serotipo, biotipo, fagotipo o antibiograma, han sido muy utilizados durante muchos años. Sin embargo, métodos más recientes han examinado la relación que existe entre los aislados a un nivel molecular, lo cual, ha revolucionado nuestra habilidad para diferenciar entre los tipos y subtipos bacterianos. Significativamente, el desarrollo de nuevos métodos moleculares nos ha provisto de nuevas herramientas para la vigilancia y detección de brotes (Sabat y *col.*, 2013). La elección de un método de tipificación molecular apropiado depende de la cuestión que se desee resolver y del contexto epidemiológico en el que el método será empleado. Lo ideal sería que cada método pudiera discriminar entre cepas estrechamente relacionadas, para mostrar la transmisión, lo cual es de gran importancia para diseñar estrategias

para prevenir la expansión del microorganismo. Sin embargo, algunos de los métodos actuales no cumplen todos los requisitos, en todas las situaciones. Cuando la tipificación se aplica para una vigilancia continua, el método elegido ha de ofrecer unos resultados que sean estables a lo largo de los años, para la implementación de medidas eficientes para el control de la infección. Incluso, un buen método de tipificación que se utilice en trabajos internacionales, debería producir resultados que puedan ser fácilmente transferidos a una base de datos y puedan ser también accesibles mediante plataformas o webs vía internet, y la nomenclatura del método debería ser estandarizada internacionalmente (Sabat y col., 2013).

Hasta la fecha, el método de tipificación molecular mejor considerado para la tipificación de *Salmonella* es la electroforesis de gel en campo pulsante (PFGE), la cual sigue siendo considerada como la técnica *Gold standard*, a pesar de la aparición de una gran variedad de métodos alternativos (van Belkum, 2006). Durante muchos años, el PFGE se ha utilizado con gran éxito en numerosas investigaciones epidemiológicas. El gran éxito de esta técnica radica en su excelente poder de discriminación y en su elevada concordancia epidemiológica (Sabat y col., 2013). Aunque este poder de discriminación depende del serotipo, en *Salmonella* Typhimurium es elevado y adecuado para caracterizar y estudiar la diversidad de los aislados en la colección nº1. Siguiendo las directrices de PulseNet de no considerar bandas menores de 33 kb, la macrorrestricción del ADN de los 60 aislados generó un único tipo (A). Dentro de dicho tipo se determinaron 19 subtipos diferentes, para los que se calculó un índice de discriminación de Simpson de 0,89. Entre los perfiles obtenidos, la región superior del gel apenas mostró diferencias, por lo que la

asignación de diferentes perfiles se obtuvo como resultado de las diferencias en la región inferior del gel con fragmentos de peso molecular menores de 190 kb. La clasificación de los 60 aislados dentro del mismo tipo A, junto con el hecho de que el 46,7% estén agrupados en dos grandes subtipos, y las pocas variaciones que presentan en 10 años, incluso habiendo sido aislados en diferentes regiones de todo el país, nos indica claramente la elevada clonalidad de las cepas monofásicas de *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- fagotipo U302.

Los genomas bacterianos poseen numerosas regiones con repeticiones nucleotídicas en zonas codificantes y no codificantes del ADN. Cuando estas repeticiones están adyacentes una de otra y el número de veces en las que se repiten varía entre los aislados, a estas regiones del genoma se las denomina *loci* de repetición en tándem de número variable (VNTR) (Sabat y col., 2013). En los últimos años, varios grupos de investigación han desarrollado una nueva técnica de tipificación denominada MLVA (Lindstedt y col. 2003, van Belkum 2006, Laarson y col. 2009). El MLVA determina el número de VNTRs existentes en diferentes locis en un genoma bacteriano. Este nuevo método de tipificación, se ha desarrollado para casi todas las especies bacterianas de importancia clínica y se puede realizar con el apoyo o sin el apoyo de la secuenciación, aunque está comprobado que la secuenciación aumenta considerablemente la resolución de la técnica (van Belkum, 2006). Mediante la secuenciación de ADN de un locus específico se pueden establecer las mutaciones en las unidades de repetición (van Belkum, 2006). En numerosos trabajos en los que se describe esta técnica (van Belkum 1997 a-b, Laarson y col. 2009, Sabat y col. 2013), los autores realizan una comparación exhaustiva del PFGE frente al MLVA. En dichos estudios el MLVA se presenta como una

técnica menos laboriosa y más específica para el estudio epidemiológico de diversos microorganismos, como en el caso de *Salmonella* Typhimurium DT104 (Lindstedt y col. 2003 y 2004, Torpdahl y col. 2007). En el trabajo publicado por Lindstedt y col., 2004, se consiguió una mayor discriminación entre cepas pertenecientes al fagotipo DT104 que mediante la técnica del PFGE. Aunque no existe ningún protocolo de MLVA descrito para la variante monofásica 4,5,12:i:-, basándonos en las conclusiones obtenidas en el artículo anteriormente mencionado y en los resultados obtenidos por Echeita y col. (2001), en los que se demuestra la estrecha relación entre *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- y *Salmonella* Typhimurium fagotipos DT104 y U302, consideramos conveniente realizar esta técnica para comprobar si entre las cepas del serotipo atípico se obtenía una mayor diferenciación y por lo tanto una mayor especificidad en su caracterización que mediante el PFGE. Se decidió seguir el protocolo de MLVA para *Salmonella* Typhimurium descrito por Lindstedt y col. en 2004. Se aplicó el método descrito por el grupo danés en los 60 aislados monofásicos, y en las cepas de otros serotipos utilizadas como control. Los resultados confirmaron la ausencia del plásmido pSLT en todos los aislados de la colección nº1, ya que no se obtuvo amplificación con el iniciador STTR 10pl. En el análisis de los datos correspondientes al VNTR STTR 3, se siguieron las recomendaciones de Laarson y col., 2009, en cuyo trabajo detectaron que los iniciadores diseñados para este *loci* amplificaban dos VNTRs próximos entre sí (dato no descrito por Lindstedt y col. 2004). Todos los aislados mostraron el mismo número de repeticiones, cuatro del primer VNTR y diez repeticiones en el segundo VNTR. En el caso del STTR 9 todos los aislados ofrecieron el mismo fragmento, indicativo de la escasa diversidad. En el STTR 5, 21 aislados

y 19 aislados mostraron un fragmento del mismo tamaño. Conjuntamente suponen el 67% de toda la colección, lo que refuerza la hipótesis de la clonalidad de esta colección. El loci STTR 6 es el que mostró mayor diversidad. Por tanto de las cinco variables que constituyen el método, tres son idénticas para todos los aislados, existiendo variaciones únicamente en los VNTRs 5 y 6. Finalmente, se obtuvieron 32 perfiles con un valor de SID de 0,97. Estos resultados son similares a los observados por otros grupos con los cuales coincidimos en que los datos del MLVA son más discriminativos que los de PFGE y que podrían alternarse en la genotipificación de las bacterias (van Belkum y col. 1998, Lindstedt y col. 2003, Laarson y col. 2009, Wuyts y col. 2013, Boland y col. 2014). Los datos de PFGE y MLVA demuestran la homogeneidad de los aislados de la colección nº 1.

Recientemente se ha publicado un trabajo realizado con más de 1.400 cepas de *Salmonella*, en el que se ha comprobado la viabilidad del MLVA (Wuyts y col., 2013). En dicho estudio, observaron que en el ensayo de reproducibilidad y estabilidad de los VNTRs, de los cinco VNTRs utilizados en la técnica del MLVA el STTR6 fue el más variable y mostró diferente número de repeticiones en la misma cepa, la cual había sido sometida a diferentes pases en un período determinado de tiempo. No obstante, el STTR6 no fue el único VNTR que mostró variación en las repeticiones, puesto que en este ensayo, en diferentes cepas, se observó que todos los VNTRs variaban en el número de repeticiones, excepto el STTR3. Por ello, a pesar de que el MLVA ofrece un poder de discriminación mayor que el PFGE o ATB, los autores del estudio destacan que además de la capacidad de discriminación de un método de subtipificación, la estabilidad de los marcadores evaluados debe tenerse en

cuenta. Wuyts advierte que por otra parte, como algunos de los loci del MLVA mostraron ser inestables, la interpretación de estos marcadores genéticos para la subtipificación debe hacerse con cautela y que estos experimentos de países señalan que no podemos descartar la posibilidad de que los aislamientos con perfiles de MLVA diferentes pero estrechamente relacionados no sean clonales.

Basándonos en los datos obtenidos, podemos confirmar que los aislados analizados de *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- fagotipo U302 son más homogéneos que los grupos aislados en otros países (Soyer y col. 2009), apoyando la hipótesis de su origen en un único clon. Por tanto la caracterización llevada a cabo mediante el antibiograma (ATB), PFGE y MLVA de estos aislados nos señala el origen común en una cepa o clon el cual con el transcurso de los años y en una amplia distribución geográfica, habría evolucionado, adquiriendo pequeñas modificaciones en su genoma, suficientes para poder diferenciar genéticamente los aislados de esta colección y poder clasificarlos en 55 cepas altamente relacionadas cuya característica principal sigue siendo el perfil de multirresistencia (R-ACSuGSTSxT), el fagotipo U302, el patrón de PFGE tipo A, con delección del plásmido pSLT y patrón de MLVA con al menos los alelos 3 y 410 para los VNTRs 9 y 3 respectivamente.

En el año 2002 nuestro grupo de investigación caracterizó varias cepas de este serotipo mediante la tecnología de las micromatrices de ADN (*microarray*), frente al genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2 (Garaizar y col, 2002). En el estudio se utilizaron cuatro aislados del Centro Nacional de Microbiología (CNM), pertenecientes al serotipo emergente 4,5,12:i:-. Los cuatro mostraron los mismos resultados, se observó una delección parcial del

plásmido pSLT y varias deleciones de cinco grupos de genes cromosómicos entre las que se encontraba la sección genética responsable de la síntesis del flagelo de segunda fase. Además, en este trabajo las zonas flanqueantes a la deleción del operón *fljAB*, fueron amplificadas mediante PCR y posteriormente secuenciadas. Dichas secuencias supusieron la base para el presente trabajo ya que se comprobó que en el fragmento de 16 genes delecionados se había insertado la secuencia de inserción IS26. Las secuencias de inserción como la IS26, son secuencias de ADN con la capacidad de escindir y migrar entre células o entre moléculas de ADN. No confieren caracteres fenotípicos a la bacteria y entre las secuencias de inserción hay muchas variaciones de estructura, pero normalmente se caracterizan por tener en los extremos repeticiones invertidas. Muchas secuencias de inserción tienen genes que codifican una transposasa y su propia regulación. Al ser fragmentos móviles del genoma, pueden provocar deleciones, duplicaciones, inversiones, etc, en definitiva, variaciones en el genoma de considerable importancia para la transferencia horizontal de genes entre los microorganismos. La secuencia de inserción IS26 se encuentra en numerosas bacterias, pero en *Salmonella* Typhimurium fagotipo U302 existe un plásmido denominado pU302L de 84,5 kb en el que se encuentran cinco copias de esta secuencia de inserción (Chen y col., 2007). Es por ello que se llevó a cabo la técnica descrita por Barton y col., (1995), PFGE-S1, para la obtención de plásmidos de gran tamaño. La técnica se llevó a cabo con 11 aislados de la colección nº 1, los cuales se seleccionaron por presentar diferentes deleciones de los genes próximos al gen *fljB*. Los resultados obtenidos mostraron que en los 11 aislados ensayados se encontraba un plásmido de gran tamaño, siendo el menor de 125kb y el mayor hallado de

180kb. Posteriormente se comprobó mediante hibridación con una sonda específicamente fabricada para la detección de la secuencia IS26, que en todos los plásmidos de gran tamaño detectados en los aislados, se encontraba la secuencia IS26, lo que podría implicar un evento de transposición replicativa (Turlan y Chandler 1995). Cabe destacar que en el transcurso del análisis de las secuencias obtenidas en la caracterización de la deleción, se detectó en los aislados monofásicos una secuencia corta de 14 pb (5'-AAG XCG CTX TGA AT-3') en los restos del gen STM 2758. Esta secuencia es adyacente al inicio de la deleción (desde el nucleótido 85 al 99 del gen STM 2758). Estos 14 nucleótidos dan comienzo a la secuencia de inserción IS26 en todas las deleciones descritas, de la colección n° 1. Curiosamente, en el plásmido pU302L descrito por Chen y col., flanqueando el final de la 3ª copia de IS26, se detectó la secuencia complementaria a estos 14 nucleótidos (con 3 *mismatches*), sin embargo esta secuencia homóloga también se detectó en otros plásmidos de *Typhimurium* como el R46 o pSTMDT12_L. La presencia en esta secuencia corta podría explicar la inserción conservada en los cuatro tipos al inicio de la inserción de la IS26 y el motivo de que se encuentre en esta región y en la misma posición en todos los tipos de deleción. Sin embargo, el análisis de las secuencias de nucleótidos posteriores a la deleción no mostró ninguna homología con el otro extremo de la IS26, lo que sugiere que los reordenamientos pueden estar asociados con el evento de transposición inicial o representan una recombinación con otros elementos IS26. De acuerdo con Cooper y col. y Schneider y col., estos eventos genéticos diferentes (transposiciones y recombinaciones) podrían tener lugar simultáneamente o sucesivamente. El mecanismo por el cual esta región es una zona diana para la

delección sigue siendo desconocido. Sin embargo, es posible que esta zona del flagelo de segunda fase sea de por sí un punto caliente para la sucesión de delecciones vía secuencias de inserción tipo IS26.

Concluimos por tanto que el plásmido hallado en las cepas de *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- de la colección nº 1, podía tratarse del plásmido pU302L, sin embargo dada la amplia distribución de la secuencia IS26 en *Salmonella* Typhimurium, la confirmación requiere de un estudio en mayor profundidad del plásmido detectado. En este aspecto es muy significativa la conclusión del trabajo doctoral de Patricia García Fernández, en el cual proponen como antecesor más probable cepas con el plásmido pUO-STmRV1 que contiene 10 copias de la secuencia IS26, y que dicho plásmido había sido previamente descrito por su grupo de investigación (Guerra y col., 2004) como responsable de la multirresistencia de este tipo de aislamientos. No obstante no se ha podido confirmar que la secuencia homóloga de 14 nucleótidos detectada en los plásmidos mencionados en este trabajo aparezca también en el plásmido pUO-STmRV1.

La secuencia de inserción IS26, es una secuencia de 820 pb de longitud y ha sustituido en su totalidad a los genes delecionados en todos los aislados de la variante 4,5,12:i:- del fagotipo U302. Estos resultados se comprobaron mediante la amplificación de los 2 fragmentos correspondientes a ambos extremos de la delección. El primer fragmento transcurre desde el gen STM2758 en el que comienza la delección hasta el centro de la secuencia de inserción IS26. Este fragmento es de 705 pb en todos los aislados monofásicos de la colección nº1, por lo que estos iniciadores (4512F y 4512R) pueden ser de gran utilidad

para la detección rápida de esta variante monofásica (Álvarez y col. 2004). El segundo fragmento, es de mayor tamaño y variable, comenzando en el centro de la secuencia de inserción IS26 hasta el final de la deleción, la cual varía y en la que se obtuvo hasta un total de 4 variantes (1.ΔfljAB1, 1.ΔfljAB2, 1.ΔfljAB3 y 1.ΔfljAB4). Los dos primeros tipos diferían únicamente en el tamaño de la deleción, con una diferencia de 232 pb delecionadas de más en el gen *iroB*, donde el tipo 1.ΔfljAB1 (52 aislados) y el tipo 1.ΔfljAB2 (5 aislados) englobaban al 95% de la colección. El tercer tipo (1.ΔfljAB3), mostró una deleción algo mayor, con el gen *iroB* completamente delecionado y el *iroC* parcialmente (236 pb) (2 aislados). Sin embargo, la caracterización del 4 tipo necesitó de un mayor número de amplificaciones para hallar el final de la deleción en el gen STM 2814, clasificando la última cepa en el tipo 1.ΔfljAB4. En resumen, los cuatro tipos de deleción descritos fueron ocasionados por una secuencia de inserción IS26, la cual se insertó en el nucleótido 99 del gen STM 2758 y concluyó en 4 puntos diferentes comprendidos entre el gen *iroB* (STM 2773) y el gen *emrA* (STM 2814). Las secuencias están disponibles en el servicio del NCBI, GenBank (N° acceso GQ402163.1, GQ402164.1, GU939595.1 y HM595411).

Debido a la diversidad resultante con esta segunda pareja de iniciadores (IS26-3F, 2774-2R), nos hace proponerlos como excelentes marcadores para la diferenciación de cepas de este serotipo, pero no para la detección rápida como sucede en el caso de la primera pareja de iniciadores.

En el género *Salmonella*, existe un mecanismo único regulado a nivel molecular, que permite la alternancia en la expresión de dos genes flagelares, *fljC* y *fljB*. La expresión del gen *fljB* impide la expresión del flagelo codificado por el gen *fljC*. Los dos antígenos flagelares históricamente, fueron denominados “fases” y a las cepas que presentaban ambos tipos de flagelos se las denominó bifásicas. En anteriores trabajos (Burnens y col. 1996, Garaizar y col. 2002), se han formulado dos teorías que explicarían el origen de este serotipo, entre las cuales, las cepas monofásicas de *Salmonella* podrían ser el ancestro de las bifásicas o por otro lado, podrían ser un mutante de las bifásicas que han perdido la habilidad para expresar el segundo antígeno flagelar. Con los resultados obtenidos podemos confirmar que la delección de varios genes del operón *fljAB* es el resultado de la inserción de la secuencia IS26. Por lo tanto, apoyando la hipótesis planteada, concluimos que este evento se produjo en una cepa, naturalmente bifásica, de *Salmonella* Typhimurium fagotipo U302 con plásmido pU302L y con perfil de multirresistencia R-ACSSuT, la cual evolucionó, permitiendo una reubicación de la secuencia de inserción IS26. Sin embargo, serían necesarios más estudios para determinar si la delección 1.Δ*fljAB*1 podría ser el origen de los otros 3 tipos o, por el contrario, si los cuatro eventos genéticos surgieron de forma independiente.

La emergencia de la variante monofásica 4,5,12:i:- de *Salmonella enterica*, demostró su éxito evolutivo al convertirse rápidamente en uno de los serotipos más prevalentes en humanos en numerosos países (EFSA, 2010). En España, tras la aparición y rápida expansión en 1998 de las cepas caracterizadas en la colección nº 1 y su posterior disminución en 2006, comenzó la emergencia de otra variante monofásica la cual presentaba varias diferencias con la variante

anteriormente descrita. Desde el año 2000, se han publicado diversos artículos, en los que se caracterizaba una variante monofásica con perfil de tetrarresistencia (R-ASSuT), cuya fórmula antigénica (4,[5],12:i:-) podía variar en la presencia del antígeno somático O5, y cuyo fagotipo no era U302 si no variable (104b, 18, 7, 193, 195, 138...). Esta variante presenta mayor distribución geográfica que el llamado clon español tal como se recoge en la opinión científica redactada por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010), donde además se señala la existencia de diferentes líneas evolutivas y que la pérdida del flagelo de segunda fase, no impidió la emergencia y difusión mundial de *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:i:-, pero sin embargo no diferenciaron entre la variante multirresistente (colección nº 1) y la variante tetrarresistente (colección nº 2).

El flagelo (antígeno H), situado en la superficie de *Salmonella* Typhimurium ha sido caracterizado como factor de virulencia que ayuda a la bacteria a desplazarse y adherirse a las células huésped (Lockman y Curtis 1990). Sin embargo, Lockman y Curtis concluyen que inserciones independientes de la transposasa *Tn10*, localizadas en diferentes genes relacionados con la síntesis y movilidad del flagelo, no han afectado a la virulencia de *Salmonella* Typhimurium en ratones, sugiriendo por tanto que la movilidad puede ser irrelevante como factor de virulencia para este patógeno intracelular facultativo e invasivo.

En 2010, Hopkins y col., observaron un incremento en los aislados de cepas monofásicas de *S. Typhimurium* 4,[5],12:i:- con resistencia a ampicilina, estreptomicina, sulfonamida y tetraciclina (R-ASSuT). Este mismo aumento fue

observado en otros países europeos incluido España, por lo que se decidió llevar a cabo un estudio con una selección de 13 aislados monofásicos de *Salmonella enterica* 4[5]12:i:- con los fagotipos más comunes detectados en el LNRS: 18, 104b, 193, 195, 138 y 7. Al final del estudio, se amplió la colección hasta un total de 215 aislados, para estudiar mediante los iniciadores específicos diseñados una muestra mayor y tener una idea de la prevalencia de la deleción detectada en la población de aislados monofásicos tetrarresistentes.

En esta colección se comenzó con los 13 aislados mencionados anteriormente, a los que se les aplicaron las mismas técnicas de PFGE y MLVA descritas en la colección nº1. En el caso del PFGE las diferencias entre perfiles mostraron más de 4 bandas de diferencia por lo que se constituyeron un total de 3 pulsotipos diferentes (A, B y C), dentro de los cuales se agruparon los diferentes subtipos hallados, contabilizando un total de 10 perfiles diferentes, para los que se calculó un SID de 0,97. En el caso del MLVA se obtuvieron un total de 11 patrones numéricos diferentes. En esta ocasión el MLVA mostró una amplia variedad de repeticiones en los 5 VNTRs que constituyen la técnica. Cabe destacar que en el 23% de los aislados se obtuvo amplificación en el VNTR 10 pl, el cual está localizado en el plásmido pSLT que no había sido detectado en la colección nº1, dejando patente una vez más la diferencia entre ambas colecciones y por ende ambas variantes. Respecto al resto de repeticiones las diferencias entre ambas colecciones fueron muy significativas mostrando una mayor heterogeneidad entre los aislados, en comparación con las cepas de la colección nº1. Por tanto en este caso los datos obtenidos del MLVA fueron de gran utilidad en la diferenciación de ambas colecciones y caracterización de este segundo grupo. Con las técnicas llevadas a cabo en la

caracterización de esta segunda colección, hemos podido comprobar que las cepas monofásicas con perfil de tetrarresistencia, muestran mayor variabilidad en los perfiles de ATB, PFGE y MLVA. Si bien es cierto, en esta segunda colección el criterio de selección de los aislados se basó únicamente en el perfil de tetrarresistencia y no en pertenecer todos al mismo fagotipo, como en la primera colección cuyos criterios fueron la multirresistencia y el fagotipo U302. En esta segunda colección de entre los 13 aislados se detectaron 11 perfiles diferentes de PFGE y entre las dos parejas de aislados que mostraron el mismo PFGE sólo una de las parejas mostró el mismo patrón de MLVA. Por tanto podemos confirmar que entre estos 13 primeros aislados de la colección nº2 se contabilizaron 12 cepas genéticamente diferenciables, dato que señala la heterogeneidad de las cepas tetrarresistentes en nuestro país. Los datos recogidos a continuación ofrecieron información complementaria a esta caracterización.

En el estudio de los eventos genéticos implicados en la delección del gen *fljB*, se realizó un mapa de presencia/ausencia de esta zona, entre los genes STM2692 y STM2775. De esta forma se agruparon los 13 aislados en 5 tipos de delecciones y dentro de los cuales incluso se detectaron variantes. A continuación mediante 5 parejas de iniciadores específicas para cada tipo de delección, se pudo determinar el inicio y final de 4 de los 5 tipos de delecciones, y del mismo modo se observó que en cada delección había diferentes inserciones. En 2009, en un estudio publicado por Soyer y *col.* se presentaba una delección muy similar a la detectada en nuestra colección y a la que hemos denominado 2.Δ*fljAB1*. En ambos trabajos la delección afecta a 77 genes previos al gen *hin*. En nuestro caso el fragmento insertado en su lugar es de 5.654 pb, en

comparación con el inserto descrito por Soyer de 7 kb. Este fragmento de 5.654 nucleótidos coincide con dos fragmentos descritos en la cepa 08-1736 de *Salmonella* Typhimurium procedente de Estados Unidos y cuyo genoma completo ha sido publicado recientemente. El estudio y comparación del inserto mostró que la primera parte coincidente con la cepa 08-1736 codificaba 5 proteínas de los profagos Gyfsi-2 y Fels-2, y entre ellas una proteína denominada UmuC, descritas por Soyer y *col.* La segunda parte del inserto que coincidía con la cepa 08-1736, correspondía a una ADN invertasa relacionada con la síntesis de una proteína de la cola (*tail protein*). En el trabajo de Soyer y *col.*, denominan a la primera sección “región STM1053-1997”. Sin embargo detectamos pequeñas diferencias entre ambos grupos, en primer lugar en cuanto a la longitud total del inserto, y en segundo lugar a las secuencias identificadas en el inserto, puesto que en las cepas americanas Soyer señala la delección parcial del gen STM2704 en el comienzo de la “región STM1053-1997” y en nuestra colección el gen STM2704 estaba al completo, sin ninguna delección y adyacentes al mismo, se detectaron secuencias parciales de los genes STM2703, STM2705 y STM2706. Basándonos en las diferencias y similitudes halladas en estos 4 aislados clasificados en 3 cepas mediante ATB, PFGE, MLVA, PCR y secuenciación, llegamos a la conclusión que los aislados con este tipo de delección detectados en España, podrían pertenecer a la misma línea evolutiva que las cepas americanas descritas por Soyer. En este caso el proceso de inserción y delección se habría originado del mismo modo, para posteriormente sufrir divergencias evolutivas con el transcurso de los años acumulando cambios por reordenamientos o delecciones en el inserto detectado y conservando el inicio y final de la delección.

En el estudio de Soyer y col. de 2009, concluyen que las cepas monofásicas 4,[5],12:i:- representan múltiples clones con distribuciones geográficas distintas que surgieron a través de eventos independientes. Nuestros datos apoyan esta hipótesis y amplían la información proporcionada por Soyer sobre las cepas monofásicas españolas, puesto que en nuestro caso hemos podido confirmar que las cepas de la 1ª colección pertenecen a un mismo clon, y posteriormente entre las cepas de la colección 2, las cepas del primer tipo (2.Δ*fljAB1*) pertenecerían a la misma línea evolutiva que las cepas de Estados Unidos, constituyendo por tanto la 2ª línea evolutiva entre cepas monofásicas tetrarresistentes de *Salmonella* Typhimurium.

En el transcurso de esta tesis doctoral, la delección denominada 2.Δ*fljAB2* pudo ser caracterizada gracias a la secuenciación del genoma completo de tres de los aislados que presentaban este tipo de delección. En contraste con los métodos convencionales de caracterización molecular, la secuenciación del genoma completo (*whole genome sequencing*, WGS) tiene el potencial para comparar diferentes genomas con una resolución de un solo nucleótido (Sabat y col., 2013). Esto permitiría una caracterización precisa de los eventos de transmisión y de brotes, e incluso como ha sucedido en este trabajo, la confirmación de los datos obtenidos mediante PCR. Pese a que mediante PCR no se obtuvo amplificación del gen *hin* en 2 de los aislados de este tipo 2.Δ*fljAB2*, gracias a la secuenciación del genoma completo se comprobó que se encontraba presente, pero estaba truncado al presentar en el centro varias inserciones de la secuencia IS26. Por otro lado el tercer aislado secuenciado (1536/08) por PCR convencional no mostró delección ninguna y en la secuenciación de su genoma se confirmaron estos resultados. Por un lado,

podemos confirmar que estas inserciones en el gen *hin* han afectado a su amplificación mediante PCR y también han influido en la expresión del flagelo de segunda fase codificado por el gen *fljB*. Al no codificarse la recombinasa del gen *hin* no se cataliza la inversión del promotor del operón *fljBA* y se obstaculiza la codificación del gen *fljB* y del gen *fljA*, y por lo tanto no se codifica el represor del gen *fliC*, facilitando la expresión del flagelo de primera fase. El análisis de las secuencias obtenidas mostró también que aunque la IS26 estaba presente en la zona intergénica *hin-iroB* (a 344 pb del gen *iroB*), el número de copias era distinto entre ellos. Así en el primer aislado esta fue la única IS26 detectada, en el segundo aislado se detectaron al menos dos IS26 delecionando los últimos 33 nucleótidos del gen *hin*, y en el tercero se detectaron al menos 3 secuencias IS26, dos de ellas en el centro del gen *hin* y la última en la zona intergénica. En el primer aislado secuenciado (1536/08), se detectaron todos los genes del operon *fljBA* y ninguno presentaba ninguna modificación en su secuencia, donde la única variación detectada fue la inserción de la IS26 en la zona intergénica *hin-iroB*. En este caso, los resultados obtenidos no han ofrecido ninguna explicación del fenotipo monofásico. La única anomalía detectada fue la inserción en la zona intergénica posterior al gen *hin*, por lo que posteriores estudios en los que se indujera una modificación mediante la inserción de un fragmento en esta zona, revelaría si realmente esta zona no codificante puede afectar a la expresión del flagelo de segunda fase que en este trabajo concluimos representa una zona caliente para eventos de transposición o de diferentes inserciones.

En relación a este punto, en un trabajo publicado recientemente por Boland y *col.* (2014), se presenta un estudio de 253 cepas serotipadas como

4,[5]:i-, con delección del flagelo de segunda fase. Sin embargo se les aplicó una PCR para comprobar la delección del gen *fljB* y en 59 de las cepas (23,3%) la amplificación fue positiva, demostrando la presencia del gen. En dicho trabajo no secuenciaron el resto de genes implicados en el operon *fljAB*, por lo que no pudieron detectar como en nuestro caso las inserciones de IS26 en el operon *fljAB*, las cuales han influido en la falta de expresión del flagelo de segunda fase. Sin embargo, en el estudio concluyen que la presencia del gen *fljB* es mayor en muestras procedentes de animales (43%) que en muestras procedentes de humanos (5%). Teniendo en cuenta que nuestras cepas proceden de aislamientos clínicos puede explicar el motivo por el que se hayan detectado entre las 4 colecciones de este trabajo únicamente 3 cepas monofásicas con presencia del gen *fljB*.

Vistas las diferencias genéticas entre los tres aislados, podemos determinar que cada uno de ellos constituye una cepa genéticamente diferenciable puesto que presentan perfiles de PFGE con más de cuatro fragmentos de diferencia y un patrón de MLVA diferente en tres de los cinco marcadores que configuran la técnica. Sin embargo dada la semejanza detectada en la ausencia de reacción en la fórmula antigénica del flagelo de segunda fase, y vistos los resultados muy similares detectados durante el estudio, podemos concluir que estas tres cepas están estrechamente relacionadas y podrían tener un origen común más cercano que al resto de cepas de las colecciones 1 y 2.

Los aislados con la delección 2.Δ*fljAB3* presentaban una ausencia de 14 genes previos al gen *iroB*. En esta delección la delección finalizaba en el mismo punto pero comenzaba en dos zonas diferentes (2.Δ*fljAB3*-A, 2.Δ*fljAB3*-B), en

ambos casos la deleción fue originada por la inserción de una copia de IS26. En un estudio publicado en 2012 por Lucarelli *y col.*, describen una deleción de tamaño similar en la que sin embargo detectaron la presencia de dos copias de IS26 en cepas similares, tetrarresistentes y monofásicas. En el estudio concluyen que las secuencias de inserción como la IS26, realizan la inserción en diferentes lugares del genoma por duplicado, insertándose dos secuencias idénticas pero algo distanciadas. Por el contrario en la deleción 2.ΔfljAB3 únicamente hemos detectado una IS26, por lo que o bien se insertaron dos y una se escindió posteriormente, o el proceso implica la inserción de una primera IS26 y favorece que pueda insertarse en esa zona una segunda IS26 o incluso más copias como ha sucedido en la deleción 2.ΔfljAB2 con hasta 3 copias. Mediante los iniciadores diseñados para la caracterización de este tipo de deleción, se detectaron un total de 28 aislados de los 215 testados en la colección nº 2. De este modo pudimos comprobar que la deleción 2.ΔfljAB3-B es más común en nuestro país que la variante A, presentándose en 26 de los 28 aislados. Dados los resultados de ATB, PFGE, MLVA y tipo de deleción los 3 aislados caracterizados, supondrían una cepa cada uno, que compartirían un ancestro común.

La principal característica de la deleción tipo 2.ΔfljAB4 es la presencia de una IS1 parcialmente delecionada, a causa de una inserción posterior de una copia completa de IS26. Este tipo de deleción sólo fue detectada en uno de los 215 aislados analizados, lo cual apunta a la baja prevalencia de este tipo en nuestro país. La hipótesis planteada para explicar la baja prevalencia, es la necesidad de que sucedan dos eventos genéticos independientes, espaciados en el tiempo. En primer lugar se insertaría la IS1, y posteriormente la inserción de

la IS26 deleccionaría parcialmente la IS1. Si estos sucesos hubieran ocurrido recientemente, esta variante no habría tenido suficiente tiempo para extenderse, pero si por el contrario estos cambios hubieran sucedido en conjunto con otros cambios no detectados en este trabajo, pero que hubieran supuesto una desventaja evolutiva para esta cepa, explicaría el motivo de la baja prevalencia en este caso.

Finalmente, la delección tipo 2.ΔfljAB5 fue detectada en un total de 12 aislados de 215. La principal característica de este tipo es la presencia de un fragmento de 7.663 pb entre los genes STM 2761 e *iroB* con 3 tipos de secuencias de inserción, dos genes implicados en la resistencia a tetraciclina y 3 genes que codifican 3 proteínas cuya función no ha sido determinada. En un trabajo publicado por Chalmers y col. en 2000, se secuenció y caracterizó el transposón Tn10 de 9.147 pb que comprenden nueve ORFs con homología a varias secuencias en las bases de datos. De los nueve, tres eran desconocidos y fueron designados como *jemA*, *jemB*, y *jemC* presentes en este inserto de tipo 2.ΔfljAB5. Dada la composición genética similar descrita en el plásmido de *Salmonella* Typhimurium pSRC27-H y en el genoma de una cepa de *Salmonella* Typhimurium (cepa T000240), nos planteamos la posibilidad de que la secuencia de inserción IS1 se habría insertado arrastrando consigo los genes que aparecen en la cepa T000240. Posteriormente la secuencia IS10, posiblemente localizada en el plásmido pSRC27-H, habría reconocido la secuencia de los genes *tetA*, *tetR* y *jemC* insertándose tras la secuencia y deleccionando parcialmente la proteína no determinada descrita en la cepa T000240, he incluyendo consigo los genes *jemB* y *jemA* y la propia secuencia IS10. La secuencia de inserción IS26 se habría insertado en último lugar en esta

zona caliente del genoma, delecionando parcialmente la secuencia IS10. El hecho de que en las delecciones 2.ΔfljAB3, 2.ΔfljAB4 y 2.ΔfljAB5 se halla insertado la secuencia IS26 en el mismo nucleótido en la región intergénica entre *hin* e *iroB*, y muy próximo a la zona donde se ha insertado en la delección 2.ΔfljAB2, indica una zona caliente o punto diana en el genoma para este tipo de eventos genéticos. Mediante los iniciadores empleados para detectar este último tipo de delección, se detectaron un total de 12 aislados de los años 2008 y 2010, a pesar de que el gran número de inserciones que componen el inserto, sugieren una propagación clonal de este tipo.

En definitiva, los aislados caracterizados en esta colección, nos permite plantear la existencia de una primera línea clonal de *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- fagotipo U302 y perfil de multirresistencia, una segunda línea de *Salmonella enterica* 4[5]12:i:-, PNR y perfil de resistencia R-ASuST, pulsotipo C y con una delección de 77 genes previos al gen *hin*, y cuyo origen compartiría con cepas de Estados Unidos, y cuatro líneas más, una línea por cada una de las otras cuatro delecciones caracterizadas en la segunda colección. Estas últimas cuatro estarían más estrechamente relacionadas entre ellas en comparación con las dos primeras líneas descritas, puesto que presentan varios resultados similares entre ellas, muestra de un origen en común, pero unos tipos de delección muy específicos y diferenciables entre los cuatro tipos, resultado de una evolución divergente.

A lo largo de los años, han sido muy cuestionados los modelos que explican el origen o génesis de los transposones en relación a las secuencias invertidas de los elementos IS, así como las implicaciones evolutivas de estos

mecanismos (Iida y col., 1981). En un estudio publicado por Halling y Kleckner en 1982, se comentaba que el transposón Tn10 se insertaba en varios lugares en el cromosoma bacteriano, pero preferentemente se insertaba en concretos *hotspots* (puntos calientes). En el actual trabajo presentamos evidencias sobre la capacidad de las secuencias de inserción para delecionar diversos genes de la zona del segundo antígeno flagelar y para producir reordenamientos e inserciones de genes, como por ejemplo los implicados en la resistencia a antimicrobianos (como en el caso de la tetraciclina en el tipo 5). Estas inserciones han dado origen a la evolución de cepas de *Salmonella* Typhimurium, obteniendo un amplio abanico de cepas monofásicas con diferentes genes insertados en el genoma que comúnmente se localizan en plásmidos de *Salmonella* Typhimurium.

En el trabajo presentado se refleja el importante papel que juegan las secuencias de inserción en la evolución bacteriana, la cual en este caso en particular no ha supuesto una desventaja evolutiva ya que se ha detectado un considerable incremento de casos en los que esta bacteria ha sido aislada en pacientes de diferentes países de todo el mundo. No obstante, sigue sin estar claro el papel que la secuencia de inserción IS26 parece jugar en este tipo de cepas, puesto que parece reconocer un punto concreto en las cepas monofásicas con fagotipo U302 (Laorden y col., 2010) en el gen STM 2758, pero incluso como se ha observado en los datos obtenidos en la colección nº2, también reconoce otro punto específico en la región intergénica entre *hin* e *iroB*. Esto plantea la existencia de al menos dos puntos calientes en el operon *fljBA*, donde a lo largo de los años esta zona concreta del genoma de *Salmonella* Typhimurium ha sido objeto de inserciones, delecciones y reorganizaciones

genéticas. Por otro lado cepas con similares características han sido detectadas y publicadas en trabajos de numerosos países, pero no se ha determinado el motivo de la deleción, por lo que podrían haberse originado por los mismos motivos descritos en esta Tesis doctoral o por otros motivos incrementando el abanico de posibilidades de inserciones y transposiciones en esta zona. Por todo ello, podría ser de gran interés un estudio de la frecuencia de estos eventos para un posterior estudio de este punto diana en *Salmonella*.

Por consiguiente, sugerimos que las secuencias de inserción han provocado la emergencia de cepas monofásicas de *Salmonella* Typhimurium, pero no han sido el origen principal de las cepas monofásicas de *Salmonella* Typhimurium de Estados Unidos, al no detectar en este último ninguna IS en el fragmento insertado. Posteriores estudios serían de utilidad para poder determinar el mecanismo de inserción de este tipo de secuencias y en particular de la secuencia de inserción IS26.

Por otro lado y como se ha comentado anteriormente, las mutaciones como herramienta clave para la evolución, pueden ocasionar cambios en ciertas poblaciones dando lugar a nuevas variantes, pero al no ofrecerle una ventaja ni desventaja evolutiva, no se haya dado un elevado incremento y por ello no haberse detectado aún. Tal es el caso de otras dos variantes monofásicas estudiadas en este trabajo de tesis doctoral, en el cual se incluyen dos colecciones de variantes monofásicas que aunque no son muy prevalentes en nuestro país si se aíslan en casos de salmonelosis humanas, por lo que decidimos estudiarlos con mayor detenimiento tratando de caracterizar el motivo de la deleción del flagelo de segunda fase para detectar mecanismos

comunes con las colecciones anteriores y comprobar su posible origen evolutivo.

Salmonella Paratyphi B se agrupa junto con *S. Paratyphi* A y C dentro de las salmonellas paratifoideas, las cuales causan fiebre paratifoidea. Su detección y posterior información de casos es de obligado cumplimiento dada su patogenicidad. Dentro de *Salmonella* Paratyphi B existe una variedad conocida como variedad Java que se diferencia entre otras características por poseer la capacidad para metabolizar el d-tartrato (dT +) y por ser menos virulenta para los humanos que la variante que no metaboliza el d-tartrato (dT-). Aunque la mayor parte de los casos de salmonelosis producidas por esta variedad son cuadros gastrointestinales, se han informado casos de infección invasiva en humanos (Denny y col., 2007). *S. Paratyphi* B (dT+) es un organismo complejo con un amplio rango de líneas clonales genéticamente distintas (Denny y col., 2007). En los últimos años, se han caracterizado dos líneas clonales con resistencia a antimicrobianos los cuales se han distribuido ampliamente. Uno de ellos, se detecta frecuentemente en explotaciones de aves de corral en los Países Bajos, y entre los años 2000-2004 fue una de las causas principales de infecciones en humanos en varios países europeos a causa de las exportaciones procedentes de este país (Denny y col., 2007). La segunda línea clonal, caracterizada por la posesión de la isla genómica de *Salmonella* SGI1, se ha distribuido ampliamente en todo el mundo. Estas cepas generalmente presentan resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, espectinomicina, sulfonamida y tetraciclina y suelen asociarse con acuarios y peces tropicales en acuarios particulares (Denny y col., 2007). En los últimos años se han publicado varios trabajos informando sobre un aumento de casos de

salmonelosis por *S. Paratyphi B* (dT+), especialmente en niños, como consecuencia del contacto con diversas mascotas entre las cuales se encuentran peces tropicales o tortugas (Musto y col. 2006, Harris y col. 2009, Hernández y col. 2012). Cabe destacar que las tortugas fueron prohibidas para la venta por la FDA en 1975 para reducir la salmonelosis asociada a tortugas (Harris y col., 2009), sin embargo entre 2001-2006, el número de tortugas utilizadas como mascotas aumentó un 86% en Estados Unidos. Posteriormente, en 2007, el CDC informó sobre un brote multiestatal de salmonelosis, causado por la variedad Java asociado con tortugas compradas en tiendas de mascotas. En los últimos años, en las granjas de cría para eliminar a *Salmonella* de las tortugas y estanques, se ha abusado de los antibióticos, llegando a originar cepas de *Salmonella Paratyphi B* multirresistentes (CDC, 2008). El CDC ha dado recomendaciones para prevenir el contagio de *Salmonella* a partir de reptiles sin mucho éxito, por lo que la prohibición en la venta y distribución de tortugas parece ser la manera más efectiva de prevenir este contagio. Sin embargo, en nuestro país no se refleja en la legislación vigente ninguna prohibición en la comercialización de este tipo de mascotas. En el transcurso de esta tesis, el CNM detectó un aumento en el número de aislados con fórmula antigénica 4,5,12:b:- que presentaba perfiles de PFGE intercambiables con aquellos descritos en *S. Paratyphi B* (dT+) por lo que decidimos incluir esta nueva variante monofásica en esta tesis doctoral partiendo como hipótesis que el origen de esta variante radicaba en *Salmonella Paratyphi B* (dT+).

Se seleccionaron un total de 39 aislados con fórmula antigénica 4,5,12:b:-, procedentes de diferentes regiones entre los años 2006 – 2010. Con el fin de determinar su perfil de resistencia a antimicrobianos, se ensayaron

frente a ampicilina, cloranfenicol, sulfonamida, gentamicina, ciprofloxacino, kanamicina, estreptomina, cefalosporina, ácido nalidíxico, ceftriaxona, tetraciclina y sulfametoxazol-trimetoprim, siendo sensibles a todos ellos. Por lo tanto, en base a los datos publicados por Denny y *col.*, sobre dos líneas clonales de Paratyphi B (dT+), nos hizo plantearnos la posibilidad que esta variante monofásica pudiera emerger de una tercera línea clonal de Paratyphi B (dT+) sin resistencias a antimicrobianos. Según el esquema de Kauffmann y White, cepas con fórmula antigénica 4,5,12:b:- podrían pertenecer al serotipo Paratyphi B, pero también a Abony (4,[5],12,[27]:b:e,n,x o incluso a la subespecie II (1,4,[5],12,[27]:b:[e,n,x]). Para confirmar o descartar este último serotipo como ancestro de nuestra variante, se llevó a cabo un análisis comparativo de la secuencia del gen *phoE* (McQuiston y *col.*, 2008). Los resultados confirmaron que todos los aislados pertenecían a la subespecie I de *Salmonella enterica*. En segundo lugar, como técnica de referencia para la tipificación de *Salmonella*, se aplicó el PFGE en los 39 aislados de la colección nº 3, con el fin de analizar y poder encontrar semejanzas con Paratyphi B (dT+) en los patrones de bandas. Cabe destacar que 30 de los 39 aislados (88,3%) presentaron el mismo pulsotipo de un total de cinco detectados en la colección, demostrando la alta homogeneidad de esta colección. Comparando los resultados de PFGE con la base de datos de pulsotipos del CNM y de PulseNet Europa, se pudo apreciar las similitudes entre los perfiles de *Salmonella* Paratyphi B dt(+) y la variante monofásica 4,[5],12:b-, apoyando la hipótesis sobre su relación evolutiva y descartando los serotipos Abony y II 4,12:b:- como posibles antecesores. Con el objetivo de obtener una mejor caracterización y poder asegurar con mayor fiabilidad el origen del ancestro de esta variante monofásica con antígeno b,

procedimos a amplificar mediante PCR un gen relacionado con el metabolismo del tartrato. El análisis de los resultados de amplificación confirmó que 38 de los 39 aislados poseían el gen, al ofrecer el fragmento del tamaño esperado, apoyando su pertenencia a la variedad Java y señalando que el origen del aislado que mostró resultados negativos en este método podría ser *Salmonella* Paratyphi B dT(-), formando parte por tanto de otra línea evolutiva diferente a las 3 anteriores mencionadas de *Salmonella* Paratyphi B dT(+). Resumiendo los datos obtenidos, la nueva variante monofásica se caracterizaba por la fórmula antigénica 4,5,12:b:-, por ser sensible a los antimicrobianos, poseer la capacidad de metabolizar el tartrato, y pertenecer a las subespecie I de *Salmonella enterica*. Teniendo en cuenta estos datos, entre los 39 aislados se observan cinco grupos de cepas diferenciables principalmente por el PFGE, y concretamente en el primer pulsotipo con 30 de los 39 aislados, se podrían diferenciar genéticamente tres cepas pero que estarían estrechamente relacionadas. Entre los otros cuatro pulsotipos se diferenciarían hasta un total de siete cepas diferentes entre los nueve aislados restantes entre los cuales tres cepas estarían estrechamente relacionadas al pertenecer al mismo pulsotipo D y donde una de las cepas no pertenecería a la variedad Java.

Para completar la caracterización de esta variante, había que esclarecer el motivo de la delección del gen *fljB*. Por ello, se comprobó mediante PCR la delección de los genes *fljA*, *fljB* y *hin* y la presencia de *iroB* e *iroC*. La caracterización del origen de la delección del gen *fljB* en esta variante supuso un nuevo reto al no existir un genoma completamente secuenciado de *S. Paratyphi* B dT(+). La utilización del genoma de *S. Paratyphi* B dT(-) como referencia, arrojó resultados negativos. No obstante, estos resultados negativos fueron de

utilidad para demostrar una vez más que el origen de los aislados monofásicos estaría próximo a una cepa de *Salmonella* Paratyphi B dT(+) y no de dT(-).

Como solución se empleó la técnica de PCR inversa utilizando como gen de origen de replicación el gen *iroB*, puesto que mediante PCR habíamos podido determinar su presencia en el genoma de esta variante monofásica y porque de anteriores trabajos habíamos podido comprobar la proximidad entre el *fljB* y el *iroB*. Al ser una técnica muy laboriosa se decidió aplicar en uno de los 39 aislados objeto de estudio, perteneciente al perfil de PFGE más común (A1). El fragmento obtenido mediante PCR inversa mostró el inicio de la delección en el gen STM2745 (parcialmente delecionado) y el final en la zona intergénica *hin-iroB*, concretamente a 396 pb del gen *iroB*. Al detectar únicamente en el centro de la delección la inserción de un fragmento de 183 pb parte de un gen (*api81*) descrito en *Yersinia pseudotuberculosis* (YAPI), que codifica una transposasa y que coincide en parte con una IS1351 e IS200 de *Salmonella* Enteritidis, concluimos que los genes situados entre el STM2745 e *iroB* (STM2773) habían sido completamente escindidos aunque se desconoce si por acción de una transposasa cuyo origen podría estar en *Yersinia pseudotuberculosis*, o por otro mecanismo o evento genético el cual no ha dejado indicios que nos permitan esclarecer esta situación. El hecho de hallar la zona intergénica entre *hin* e *iroB* en estas cepas, y una vez comprobada la proximidad entre *iroB* e *iroC*, podemos confirmar que esta zona del genoma de esta variante monofásica es diferente a la analizada en el genoma de *Salmonella* Paratyphi B dT(-) disponible en la base de datos del NCBI, por lo que apoya la hipótesis de su origen evolutivo en *Salmonella* Paratyphi B dT(+).

Finalmente y para comprobar si los 39 aislados de la colección n° 3 poseían la misma delección, procedimos a amplificar mediante PCR ambos extremos de la delección. Para ello se diseñó una pareja de iniciadores específicamente colocados en los genes *STM2744* e *iroB*, mostrando amplificación en 30 de los 39 aislados. Cómo cabía esperar los 30 positivos pertenecían al pulsotipo mayoritario, perfil A, lo que nos llevó a concluir que el ancestro de los otros 9 aislados no sería la misma cepa cuyo origen común comparten los 30 aislados positivos. En el caso de los 9 aislados, la delección sucedería por otras causas que no pudieron ser determinadas en el presente trabajo. Visto el interés que confieren este tipo de cepas sería necesario un posterior estudio para caracterizar estas delecciones y se puedan detectar más indicios sobre el motivo de la delección, o sobre los eventos genéticos implicados en el mismo, o que apoyen su relación con *Salmonella* Paratyphi B dT(+).

Curiosamente, y como dato a destacar en el presente trabajo, de entre los 9 aislados que ofrecieron perfiles de PFGE diferentes al del Pulsotipo A y que no ofrecieron amplificación con los iniciadores diseñados según la delección encontrada en el tipo mayoritario, 8 de los aislados en el procedimiento de serología fueron los únicos autoaglutinables donde 3 de ellos presentaron idéntico PFGE por lo que pertenecerían a la misma cepa, otros 3 aislados al presentar un PFGE diferenciable en una o dos bandas serían una cepa cada una pero estrechamente relacionadas y las otras 2 cepas al mostrar unos patrones de PFGE diferenciables y pertenecer a otro pulsotipo serían cepas alejadas del resto y por tanto de pertenecer al mismo ancestro común. El aislado no autoaglutinable es la cepa que no metaboliza el tartrato y que podría provenir de

Salmonella Paratyphi dT(-) por lo que no es de extrañar que mostrara un PFGE y deleción diferenciable del resto. Por lo tanto la mayoría de las cepas cuya deleción no ha podido determinarse en este trabajo son cepas que presentaron notables diferencias en el resto de procesos de caracterización de esta nueva variante monofásica y dejando abierta la posibilidad de realizar un trabajo futuro para la determinación del evento genético implicado en la deleción de cada una de las siete cepas.

Como se ha mencionado anteriormente, existen variantes monofásicas, que en un determinado momento han experimentado tal éxito evolutivo que han propiciado un aumento del número de casos de salmonelosis en humanos. Tal es el caso de las dos primeras variantes estudiadas en este trabajo de tesis doctoral. Por otro lado, existen variantes que no han emergido de manera tan explosiva, que se aíslan de manera poco frecuente a lo largo de los años, pero que su estudio y caracterización puede ser de gran interés científico. La última variante monofásica caracterizada (colección nº 4) con fórmula antigénica 4,12:d:- comenzó a detectarse en el año 2007 tanto en muestras de origen humano como en muestras de origen porcino. Desde entonces el LNRS recibe un número limitado cada año. Según el esquema de Kauffmann y White, cepas con antígeno somático 4,12 y a su vez con el antígeno flagelar de 1ª fase d, podían pertenecer a varios serotipos de la subespecie I de *Salmonella enterica*, como 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,z₁₅), Chennai (4,12:d:z₃₅), 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:z₆) y II 4,12:d:e,n,x. La detección del antígeno 27 no se realiza de manera rutinaria en los laboratorios de referencia

dado su elevado coste, por lo que desconocíamos si los aislados de la colección nº 4 podrían tener también el antígeno 27 en su fórmula. Por ello no descartamos estos otros cuatros serotipos en la búsqueda del origen de esta nueva variante monofásica.

En un principio se seleccionaron 19 aislados con la fórmula antigénica 4,12:d:-, remitidas al LNRS entre los años 2007 – 2010. En la caracterización de esta nueva variante el idéntico perfil de ATB mostrado en todos los aislados de la colección y el hecho de que mediante PFGE los 27 aislados se agruparan en un mismo pulsotipo, nos indica la gran homogeneidad existente entre ellos, siendo cepas genéticamente diferenciables entre sí, pero estrechamente relacionadas. Entre los 27 aislados se contabilizan cuatro cepas genéticamente diferenciables, las cuales sólo se diferencian por una única banda en el patrón de restricción. Por otro lado, los datos del PFGE arrojaron una hipótesis sobre el origen de esta nueva variante, al asemejarse los patrones de PFGE al serotipo de *Salmonella* Schwarzengrund. Dado también los datos epidemiológicos de nuestro país, este serotipo se encuentra entre uno de los detectados en aislamientos de pacientes en España, a diferencia de otros serotipos que podrían encajar en la fórmula antigénica. Apoyando una vez más que el origen de la nueva variante podría ser *Salmonella* Schwarzengrund.

Tras la experiencia previamente obtenida en la caracterización de variantes monofásicas, conocíamos la importancia de los resultados que el análisis de la delección del segundo antígeno flagelar arrojaba en la determinación del origen evolutivo de las cepas. Por ello se confirmó mediante PCR la delección de los genes *fljA* (SesA_2911), *fljB* (SesA_2912) y *hin*

(SesA_2913) y la presencia de *iroB* (SesA_2915) e *iroC* (SesA_2916). Con el objetivo de comprobar la relación de esta variante con *Salmonella* Schwarzengrund se trató de amplificar los genes de *S. Schwarzengrund* previos al *fljB*. Los resultados mostraron la presencia de los genes SesA_2901, 2902, 2903, 2904 y SesA_2914, y la ausencia de los genes comprendidos entre SesA_2905 y SesA_2910. Estos datos reforzaron la hipótesis sobre el origen de esta variante monofásica, puesto que algunos genes como SesA_2901, 2902, 2903 y 2904 se hallan única y exclusivamente en *Salmonella* Schwarzengrund, por lo que la detección de los mismos confirmaba la cercanía entre la nueva variante y el serotipo mencionado. Los datos indicaban que la delección podría comenzar tras el gen SesA_2904 y finalizar en el gen SesA_2914. Por ello se intentó mediante *Long-PCR* amplificar ambos extremos de los dos genes mencionados, para obtener una secuencia que aclarará la delección de 9 genes del operon *fljBA*. Sin embargo tras infructuosos intentos, se procedió a emplear la técnica de secuenciación inversa partiendo del gen detectado *iroB* (SesA_2915). Mediante esta metodología se obtuvo un fragmento de 5 kb insertado en la zona delecionada y en cuya secuenciación se identificaron dos zonas descritas en *Enterobacter aerogenes* y otras dos aún hoy en día no identificadas y de las que no se pudo determinar su origen. La segunda de las zonas identificadas desveló la presencia, una vez más, de una secuencia de inserción denominada IS30. Pese a que el fragmento de 5 kb secuenciado no mostró el inicio de la delección, si mostró el final concretamente en la región intergénica de *hin* (SesA_2913) y SesA_2914, muy similar a la región intergénica de *hin* e *iroB*. Por lo tanto esas 396 pb de esta región, señalan de nuevo el mismo punto caliente donde finalizaban las delecciones descritas en la

colección nº 2, por lo tanto este resultado nos conmina una vez más a señalar esta zona del operón *fljBA* como punto diana para la sucesión de deleciones en diferentes serotipos de *Salmonella enterica*, posiblemente por secuencias de inserción. Finalmente el inicio de la deleción pudo ser determinado mediante otra *Long-PCR* entre los genes *SesA_2902* y *SesA_2915 (iroB)*. El fragmento de 6.000 pb obtenido reveló que la deleción comenzaba tras el gen *SesA_2902*, causada por una IS30 detectada al completo y confirmando la ausencia en esta zona de los genes *SesA_2903* y *SesA_2904*, que probablemente a causa de la IS30 habrían podido ser reubicados en otra región, puesto que su presencia en el genoma de las cepas monofásicas había sido confirmado previamente.

Una vez más la deleción de los genes implicados en la síntesis del segundo antígeno flagelar ha sido causada por la inserción de una IS30, la cual al integrarse en el genoma ha deleccionado 9 genes y a su vez ha translocado otros dos genes más. Por otro lado, las dos secuencias desconocidas de 1.982 pb y 153 pb no nos han permitido obtener más datos sobre su origen o el mecanismo por el que aparecen en el inserto junto a la IS30 y a la proteína de *Enterobacter aerogenes* con función no determinada. En este punto nos planteamos dos hipótesis; en primer lugar que una IS30 procedente de *Enterobacter aerogenes*, junto con la proteína del mismo genoma, se habría insertado en un microorganismo no identificado aún, a quien pertenecerían estas dos secuencias desconocidas y posteriormente insertarse en las cepas de *Salmonella* Schwarzengrund en este punto caliente del operón *fljBA* causando la deleción, o por otro lado, que ambos eventos genéticos procedan de microorganismos no relacionados y se hayan insertado de forma independiente a causa de otro mecanismo de transposición que posteriormente se escindiera

sin dejar más indicios. No obstante, lo que si podemos plantear como conclusión final en esta colección, es que las cepas detectadas en el CNM con fórmula antigénica 4,12:d:-, sin resistencias a antimicrobianos, provienen de *Salmonella* Schwarzengrund. Si bien es cierto que no existe una extensa bibliografía sobre *Salmonella* Schwarzengrund, en los últimos años, varios trabajos han informado sobre un aumento en el número de casos de salmonelosis originados por este serotipo (Chen y col. 2010, Aarestrup y col. 2007). Este aumento podría haber facilitado la evolución y dispersión a lo largo de todo el mundo de cepas de este serotipo y del mismo modo, de cepas cuyo ancestro se encuentra en este serotipo pero que tras sufrir diversos cambios han evolucionado en estas variantes monofásicas.

Finalmente, en el transcurso de la presente tesis doctoral, figura como conclusión reseñable la elevada tasa de mutación en la zona del flagelo de segunda fase, hecho que favorece la obtención de un amplio abanico de variantes originadas a partir de una única inserción. Por ello es muy probable que a lo largo de los años se hayan originado un sinnfín de variantes, las cuales no han sido detectadas aún o por el contrario la mutación que las ha originado haya supuesto una gran desventaja evolutiva provocando su desaparición. Si bien es cierto, las variantes monofásicas que no han sido detectadas aún o incluso puede que no lleguen a detectarse o a caracterizarse nunca, sea a causa de no emerger y presentar un incremento importante en el número de aislados. Al margen de este hecho, en conclusión a este trabajo se ha demostrado que las primeras dos colecciones de cepas proceden de *Salmonella* Typhimurium, pero que los diferentes elementos de transposición han originado una dispersión y divergencia de las mismas, mostrando dos líneas claramente diferenciables pero

que podríamos considerarlas como un clon en el caso de las cepas españolas con fagotipo U302, multirresistencia, pulsotipo A y delección originada en el mismo punto por una sola IS26 y una segunda línea evolutiva con las cepas tetrarresistentes, pulsotipo C y con la delección americana de 77 genes. Por otro lado mostramos una tercera vía que agrupa el resto de cepas de la segunda colección con diversos tipos de delecciones pero características de ATB, PFGE y MLVA más similares entre sí que respecto a las otras dos líneas, y que a su vez han sido detectadas prácticamente en todo Europa y otros países del resto del mundo. También se ha podido demostrar el origen de las cepas de las otras dos colecciones y determinado en gran parte el mecanismo por el que se delecionó el flagelo de segunda fase. En el caso de las cepas procedentes de *Salmonella* Paratyphi B dT(+) se diferencian claramente los aislados homogéneos caracterizados por la cepa con pulsotipo A y cuya delección se ha determinado en este trabajo, de las otras siete cepas de la colección la causa de la delección debería ser analizada con mayor detenimiento en un futuro trabajo. Por otro lado las cuatro cepas caracterizadas como cepas monofásicas de *Salmonella* Schwarzengrund y que engloban a los 27 aislados de la colección cuatro han presentado una homología incluso mayor que la detectada en las cepas que hemos considerado como clon español de la primera colección. Por ello esta última variante podría llegar a considerarse como un clon de cepas monofásicas 4,12,27:d-.

Por otro lado, la capacidad que tienen las secuencias de inserción para producir delecciones, duplicaciones y transposiciones había sido estudiada y publicada anteriormente, pero sin embargo en este trabajo se ha observado la relevancia de los efectos producidos por las IS provocando la aparición de

nuevos microorganismos y de cómo pueden llegar a provocar delecciones de miles de nucleótidos y sin embargo en ocasiones como la presentada en esta tesis, no suponer una desventaja evolutiva a la bacteria que lo padece.

En la bibliografía, referente a los flagelos de *Salmonella*, hay diferentes posturas que se presentan a favor o en contra de la teoría que apoya la capacidad de *Salmonella* para alternar la expresión de sus antígenos flagelares y poder evadir la respuesta inmune del huésped. Tras este trabajo mi postura se inclina a favor de no considerar este mecanismo de cambio de fase en la expresión de los antígenos flagelares como una ventaja para la evasión de los mecanismos de defensa del huésped tras comprobar que estas cuatro variantes monofásicas no han sufrido desventaja evolutiva alguna por no poder realizar un cambio de fase de sus antígenos flagelares y que han sido aisladas de numerosos pacientes con cuadro de gastroenteritis.

CONCLUSIONES

1. La aparición de variantes monofásicas de *Salmonella enterica* es un proceso continuo y dinámico, tal y cómo han mostrado las colecciones analizadas originadas a partir de diferentes serotipos y a causa de diferentes eventos genéticos.
2. Las cepas monofásicas de *Salmonella* Typhimurium pertenecen a dos líneas multirresistentes circulantes en Europa caracterizadas cómo clon español y clon europeo. Se identifica una tercera línea de cepas monofásicas de *Salmonella* Typhimurium circulantes en Estados Unidos, detectadas también en nuestro país.
3. Mediante aplicación de diferentes técnicas moleculares se confirmó que los aislados 4,5,12:b:- son una variante monofásica genéticamente relacionada con aislamientos bifásicos de Paratyphi B dt (+), serotipo que constituye su antecesor más probable.
4. Mediante aplicación de diferentes técnicas moleculares se confirmó que los aislados 4,12:d:- son una variante monofásica genéticamente relacionada con aislamientos bifásicos de Schwarzengrund, serotipo que constituye su antecesor más probable.
5. El mecanismo más frecuentemente implicado en la generación de las diferentes variantes monofásicas son las secuencias de inserción.
6. La zona de síntesis del flagelo de segunda fase y en concreto la zona intergénica de *fljB* e *iroB*, supone un punto caliente para las inserciones de secuencias de inserción o transposones afectando a la capacidad de síntesis de la flagelina de segunda fase en cepas de *Salmonella enterica*.

7. Sin embargo, esta deficiencia, no ha supuesto una desventaja evolutiva para este tipo de variantes, dada su capacidad para adaptarse y sobrevivir en sus nichos de origen, llegando en ocasiones a desplazar a su ancestro bifásico.
8. La caracterización molecular del fenotipo monofásico permite el diseño de iniciadores específicos que resultan excelentes marcadores epidemiológicos para la detección y control de dichas poblaciones monofásicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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., Tsolis 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
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

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
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. 9th 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., Muniozguen 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 abequose 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., Sebaihia 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, 7th 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. 8th 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 Ghallchóir 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

TRABAJOS PUBLICADOS

La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos de Investigación:

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.

El trabajo incluido en la presente tesis doctoral ha sido objeto de las siguientes comunicaciones a congresos:

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[†]

Lorena Laorden,¹ Silvia Herrera-León,² Ilargi Martínez,¹ Ainhoa Sanchez,² Lefteris Kromidas,¹ Joseba Bikandi,¹ Aitor Rementeria,¹ Aurora Echeita,² and Javier Garaizar^{1*}

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco, Campus de Álava, Vitoria-Gasteiz, and Campus de Bizkaia, Leioa, Spain,¹ and Sección de Enterobacterias, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Spain²

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.

[†] Published ahead of print on 13 October 2010.

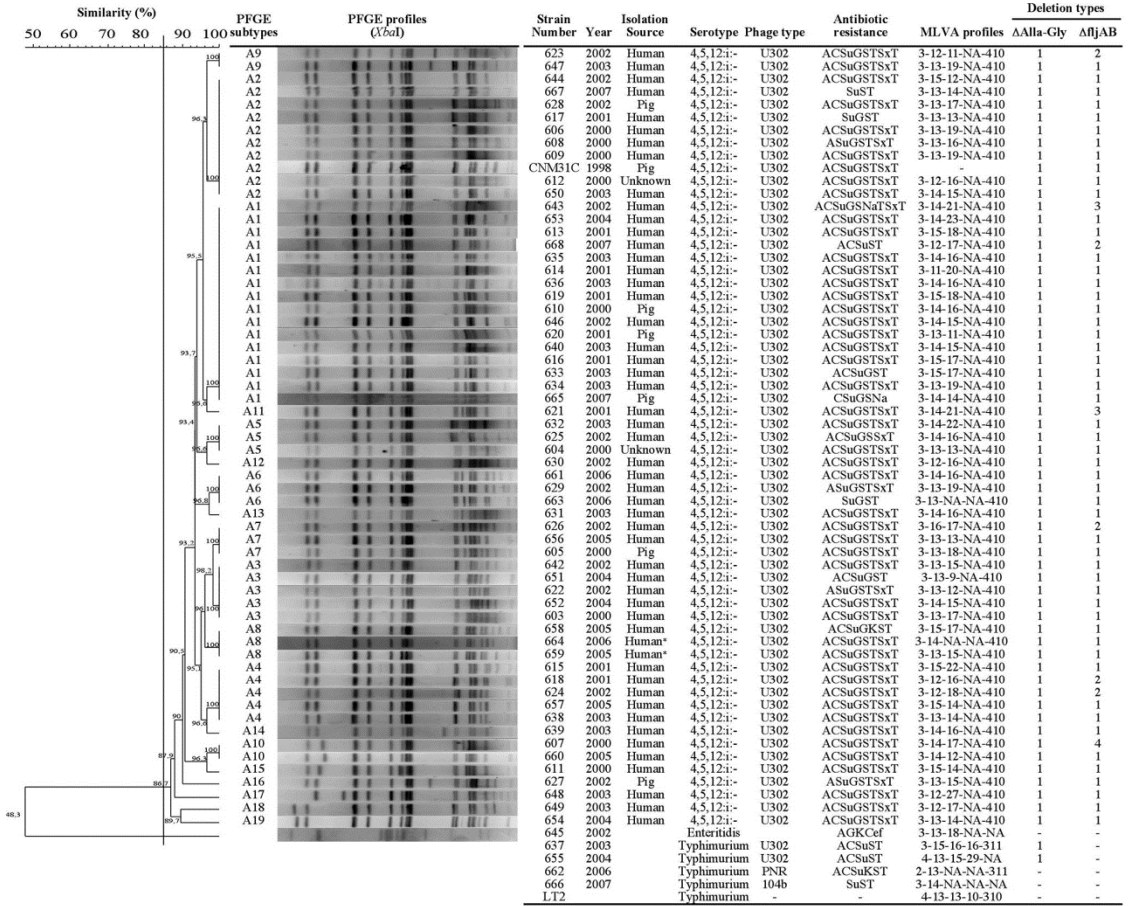


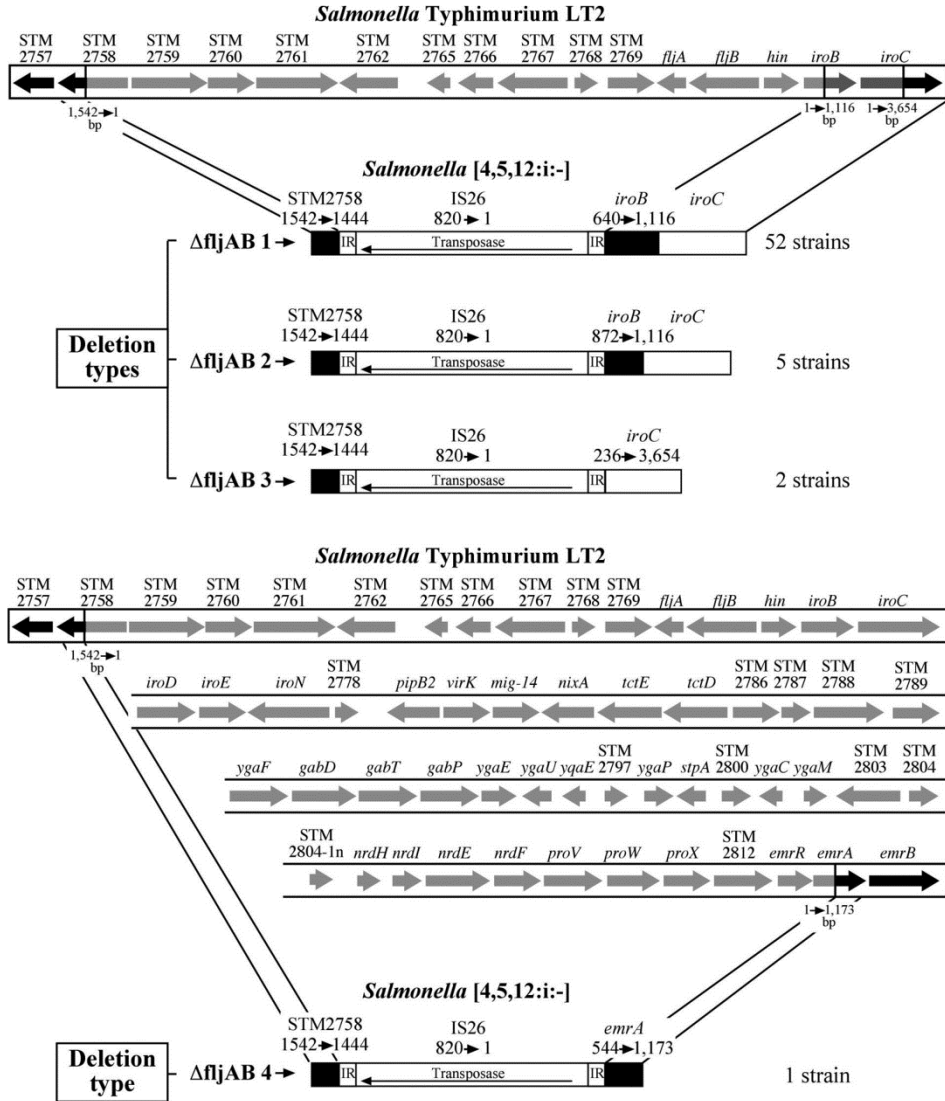
FIG. 1. Results of PFGE typing, characteristics of the strains used in this study, and type assignment by different typing methods. PFGE dendrogram, types, and profiles obtained with XbaI restriction enzyme following the PulseNet International protocol using Dice and UPGMA (optimization, 0.50%; tolerance, 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 (Δ Alla-Gly) operon or *fljAB* (Δ *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: Δ *fljAB1*, Δ *fljAB2*, Δ *fljAB3*, and



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

FIG. 2. Structure of the different *fliAB* 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).

Δ *fliAB4* (Fig. 2). Δ *fliAB1* 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 Δ *fliAB2* deletion ended at nucleotide 871 of the *iroB* gene (accession no. GQ402164.1); the Δ *fliAB3* deletion ended at nucleotide 235 of the *iroC* gene (STM2774) (accession no. GU939595.1); and Δ *fliAB4* 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 *fliAB* 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 Δ 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 Δ 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 Δ 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.

