



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
Facultat de Veterinària
Departament de Sanitat i d'Anatomia Animal s

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA
COMO HERRAMIENTA DE MARCAJE EPIDEMIOLÓGICO
PARA CEPAS DE SALMONELLA DE
ORIGEN PORCINO

Tesis
doctoral
Marzo 2006

Maria Eugènia de la Torre Martínez
Programa de Doctorado de Medicina y Sanidad Animal
Dirigida por: Elvira Torre Mañas y Montse Tello Bretcha

La Dra. Elvira Torre Mañas professora titular del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals y la Dra. Montse Tello Bretcha tècnic superior de suport a la recerca del Laboratori Veterinari de Diagnosi de Malalties Infeccioses del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Fan constar:

Que el treball “Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de *Salmonella* de origen porcino”, presentat per na Maria Eugènia de la Torre Martínez per a la obtenció del grau de Doctor, ha estat realitzat en aquest departament i sota la nostra direcció.

Per que consti, firmem la present a Bellaterra, el 8 de febrer de 2006.

Elvira Torre Mañas

Montse Tello Bretcha

Dedicada a aquells que m'estimen i més m'estimo:

especialment a la meva mare,

a en Billy,

a la meva família,

als meus amics,

que tot us ho mereixeu i no demaneu res a canvi.

Agraïments

Quan acabes un treball de les dimensions d'aquest, no tant pel que fa a text com pel que fa a temps i esforç, i fas repàs per tal de recordar totes aquelles persones que d'una o d'altre manera han estat involucrades en el mateix, te n'adones que han estat moltes i que no hauria estat possible portar-lo a terme sense el seu ajut. Aquest és doncs l'espai pel meu agraïment més sincer a totes elles.

M'agrada saber que tots aquests anys no només han estat profitosos pel que fa a aquest estudi, sinó que ha estat un temps en el que he tingut l'oportunitat de fer molts i molt bons amics. Aquest, entre d'altres, és el cas de les meves dues directores. La soferta Montse, que s'ha convertit per a mi en una persona entranyable, a qui m'estimo i a qui no agrairé mai prou el seu ajut i la seva amistat: "recorda Montse que les *amèriques* un dia o altre s'hauran de visitar". També l'Elvira, que no menys soferta, ha estat sempre generosa, fent-me costat des del principi i a qui voldria fer saber que té una amiga per sempre i, que encara que ho sembli, no viu tan lluny.

Una persona que m'ha ajudat de forma incondicional i inestimable en l'elaboració dels articles, posant límits a la meva retòrica inefable, ha estat l'Enric. Durant tots aquest anys ha estat a més d'un bon amic, el que m'ha donat un dels millors consells per posar en pràctica la meva afecció literària, que s'entreveu curta i no massa profitosa: "ves al gra" (de l'anglès "go to the grain"). També vull esmentar a la Marga i a en Jordi, que sempre m'han fet sentir com a casa, tot i que com si fos una adolescent, m'hi he deixat caure ben poc.

De totes les persones que varen passar pel departament des que jo vaig arribar, i que han anat marxant poc a poc, recordo al Jaime, la Lorena, el Gustavo i els excepcionals William i Denice, dins la secció que podríem anomenar "estrangera". Totes elles han estat persones estimables, que recordo amb gratitud ja que em varen ajudar d'una o altre manera a integrar-me en el "grup" i que varen fer la meva vida en aquí, més agradable.

No voldria oblidar-me de la Dolo, tot un caràcter, de qui es impossible no fer-se amic i que sempre recordes amb enyorança. També de la Mercè, a qui també trobo a faltar i li desitjo sort. Agraïments també a la Laila que no ha tingut mai un no per resposta, i que ara ens ha deixat per una feina, he sentit, "super" interessant. "Molta sort a tu i al Rafa".

El meu agraïment per l'ajut i l'amistat del Gaby, de l' Anna Coll, de la Chiara, de la Bibiana, de l' Anna Alba, de la Maribel, de l' Eva, de l' Iván i de l' Alberto, que a banda de ser uns 200 anys, any amunt any avall, més joves que jo, m'han tractat com un més. Com no, el meu agraïment a la Paqui i la Núria, que no m'han fet fora de la secretaria cada cop que he entrat amb presses. També a la Rosa i a la Montse Galí que em varen ajudar tantes vegades al laboratori. Més recentment he conegut a la Mònica i la Carme, que tot i que no hem treballat juntes son gent encantadora que no voldria oblidar. I parlant de recent, també m'agradaria anomenar a la Elisabet, que encara que fa poc que ens coneixem segur que hauríem estat bones amigues.

D'aquells despatxos de més avall no voldria oblidar-me d'esmentar a l' Anna Ortuño, que arrel de la seva amistat amb la Montse he tingut l'oportunitat i la sort de conèixer. No recordo haver rigut tant en molt de temps mentre dinàvem juntes a la "facu". "Gràcies a les dues".

Moltes gràcies a en Roger de la Torre i a en Miquel Vilafranca, que m'han fet aquests dibuixos tan encantadors de la portada y que entre els dos deuen sumar uns 14 anys. També a l' Anna Vivancos pel seu disseny de portada, al Gaby Quero per materialitzar-lo i a la Patrícia que sense saber-ho també em va donar idees.

També hauria d'agrair els llargs i profitosos monòlegs amb la meva gossa "coseta" durant tot el temps que m'he passat sola a terres llunyanes i, definitivament "estranyes", durant els dos últims anys: "gràcies coseta per haver-me ajudat a mantenir el seny".

Per últim, i tanmateix no menys important, el meu agraïment a en Billy, sense la tossuderia del qual aquest treball no s'hauria acabat. La seva paciència, els seus coneixements de l'anglès, la seva traça, el seu suport i esforç no només com a company sinó com amic, han fet que això fos possible. Per tu Billy, el meu amor i el meu sincer agraïment.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 EVOLUCIÓN E IMPORTANCIA DE *SALMONELLA*

1. 1.1 Descripción histórica	3
1. 1.2 Ecología	5
1. 1.3 Salmonelosis humana y porcina	6

1. 2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO *SALMONELLA*

1. 2. 1 Características generales	7
1. 2. 2 Aislamiento	8
1. 2. 3 Caracterización fenotípica	9
1. 2. 3. 1 Perfil bioquímico	10
1. 2. 3. 2 Serotipo	11
1. 2. 3. 3 Fagotipo	13
1. 2. 3. 4 Antibiorresistencia	13
1. 2. 4 Caracterización genotípica	14
1. 2. 4. 1 Perfil plasmídico	15
1. 2. 4. 2 Patrones de restricción cromosómica	16
1. 2. 4. 3 Técnicas de hibridación	16
1. 2. 4. 4 Electroforesis en campo pulsado	17
1. 2. 4. 5 Reacción en cadena de la polimerasa	18
1. 2. 5 Revisión crítica de los métodos de caracterización	19

1. 3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS

1. 3. 1 Distribución geográfica	22
1. 3. 2 Prevalencia	23
1. 3. 3 Vigilancia epidemiológica	24

2. HIPÓTESIS 27

3. OBJETIVOS 27

4. PUBLICACIONES

4.1 Estudio 1	28
4.2 Estudio 2	35

5. DISCUSIÓN 42

6. CONCLUSIONES	48
7. RESUMEN	49
8. BIBLIOGRAFÍA	51

1.1 EVOLUCIÓN E IMPORTANCIA DE SALMONELA

1.1.1 Descripción histórica

Salmonella spp fue observada inicialmente el año 1880 por Karl Joseph Eberth (1835-1926) en cortes histológicos de muestras de bazo y nódulos linfáticos mesentéricos procedentes de personas fallecidas por “fiebre tifoide”. Posteriormente, fue descrita por Daniel Elmer Salmon (1850-1914) y Theobald Smith (1859-1934), en el año 1885, a partir de una cepa aislada de cerdo con Peste Porcina Clásica (Salmon *et al.* 1886). El bacteriólogo francés Joseph Léon Marcel Lignières (1868-1933) sugirió en 1900 que estas bacterias se llamaran *Salmonella*, en honor a Salmon.

La clasificación y consiguiente nomenclatura del género *Salmonella* es aún, hoy en día, muy controvertida, utilizándose distintos sistemas para referirse a los miembros de este género. La terminología introducida por White en 1929 y modificada por Kauffmann en 1966, establecía un tipo específico para cada cepa de *Salmonella* que fuera distinguible antigénicamente (equivalente al actual serotipo), teniendo en cuenta el polimorfismo de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), atribuyendo en un inicio a cada tipo el nombre del lugar donde se aisló por primera vez. La propuesta de Kauffmann implicaba que cada tipo era en realidad una nueva especie. La primera lista publicada contenía unos 20 nombres, hoy el número de serotipos sobrepasa ampliamente los 2000.

Mediante métodos de hibridación ADN-ADN se demostró que las cepas de *Salmonella* formaban un solo grupo de hibridación, con 7 subgrupos o subgéneros (Crosa *et al.*, 1973), distinguibles entre sí fenotípicamente. Los subgéneros propuestos pertenecían así a una misma especie, que posteriormente recibió el nombre de *Salmonella choleraesuis* (Le Minor *et al.*, 1982, 1986). Esta denominación sin embargo se prestaba a confusión, debido a la existencia del serotipo Choleraesuis que además mostraba un perfil bioquímico distinto al de la mayoría. Le Minor y Popoff en el año 1987 propusieron que los 7 subgéneros (I, II, IIIa, IIIb, IV, V y VI) definidos anteriormente, fueran considerados subespecies. Recomendaron además, el cambio de nombre de la especie *Salmonella choleraesuis* por el de *Salmonella enterica* (publicado por Penner, 1988). La propuesta fue denegada por parte de la Comisión Judicial del *Comité Internacional de Bacteriología Sistemática*, al considerarse que

Salmonella Typhi podría pasar desapercibida. En 1989, Revees *et al.* elevaron al rango de especie a la hasta entonces *Salmonella choleraesuis* subespecie *bongori*, pasando a ser así, la segunda especie del género (Tabla 1). Euzéby, en el año 1999, propuso una enmienda para adoptar la nomenclatura de especie *enterica* que tuviera en cuenta la excepción del serotipo Typhi, pasando a denominarse *Salmonella typhi*. A día de hoy, esta propuesta continúa pendiente de resolución.

Aunque continúa sin definirse una fórmula concreta para la nomenclatura de *Salmonella*, la OMS adoptó la denominación de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* como únicas especies del género, y la subsiguiente división en subespecies (o subgrupos fenotípicamente distintos) de *S. enterica* como: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Los serotipos o serovariedades, siguiendo el esquema de Kauffmann-White, se escriben al final sin cursiva y con la inicial en mayúscula, o bien si carecen de nombre, añadiendo su fórmula antigénica.

Recientemente, en 2004, Shelobolina *et al.*, han propuesto 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 ADNr de la subunidad 16S, una gran similitud con *Salmonella bongori* y con *Enterobacter cloacae*. El nombre ha sido validado en el año 2005.

TABLA 1. Especies y subespecies del género *Salmonella* y subgrupos correspondientes (Crosa *et al.*, 1973, Popoff *et al.*, 2001, Validation list n°102/IJSEM*, 2005)

1. <i>Salmonella enterica</i>	
1.1 <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i>	(subgrupo I)
1.2 <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>salamae</i>	(subgrupo II)
1.3 <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>arizonae</i>	(subgrupo IIIa)
1.4 <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i>	(subgrupo IIIb)
1.5 <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>houtenae</i>	(subgrupo IV)
1.6 <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>indica</i>	(subgrupo VI)
2. <i>Salmonella bongori</i>	(subgrupo V)
3. <i>Salmonella subterranea</i>	

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

1.1.2 Ecología

El principal hábitat de *Salmonella* es el tracto intestinal de humanos y animales homeotermos y poiquilotermos (puede formar parte de la flora natural de reptiles y anfibios). Existen serotipos adaptados al huésped como *S. Typhi* (hombre), *S. Abortus ovis* (oveja) o *S. Gallinarum* (aves), entre otros, aunque la mayoría son ubiquitarios. Los principales reservorios son los animales de abasto (tanto de carne roja como aves), y en menor medida las aves silvestres, roedores, insectos, peces, moluscos, tortugas y reptiles. En general, todo alimento es susceptible de ser contaminado por efluentes fecales. *Salmonella* se disemina en el medio natural a través de excreciones humanas y animales, sin multiplicarse de forma significativa, aunque puede sobrevivir durante semanas en agua y durante años en suelo en condiciones favorables de temperatura, humedad y pH.

El género *Salmonella* es uno de los principales causantes de enfermedades transmitidas a través de agua y alimentos. Es común encontrar *Salmonella* en aves de corral, en la cáscara de huevos crudos, y en carne roja. En concreto, el problema que supone la presencia de *Salmonella* en las aves de corral y en las cáscaras de huevo se atribuye básicamente a las prácticas utilizadas en este tipo de explotaciones. *Salmonella* es además un posible contaminante en operaciones de transporte de animales de abasto, y consecuentemente de la carne durante el sacrificio.

Uno de los serotipos de *Salmonella* más importantes transmitidos a través del agua es *Salmonella Typhi*, aunque con frecuencia son salmonelas no tifoideas, productoras de procesos patológicos menos graves, las responsables de los brotes epidémicos por esta vía de transmisión (Madigan *et al.* 1996). El tratamiento del agua destinada al consumo público ha disminuido la incidencia de *Salmonella* en todo el mundo. Así, los brotes epidémicos están a menudo relacionados con fallos en la depuración, por contaminación cruzada entre tuberías de la red y aguas residuales, inundaciones, efluentes de industrias cárnicas o explotaciones ganaderas.

1.1.3 Salmonelosis humana y porcina

La salmonelosis puede presentar variedad de cuadros clínicos en función del serotipo implicado en el proceso y de la especificidad de huésped (Pier *et al.*, 1998), entre ellos cuadros de gastroenteritis, fiebre entérica, septicemia, y raramente encefalitis (Martin *et al.*, 1994). Los niños, ancianos, enfermos y/o personas inmunodeprimidas son los que presentan las manifestaciones clínicas más graves. A ello hay que añadir la existencia de portadores asintomáticos. En general, los serotipos Typhi y Paratyphi A, B y C producen fiebre entérica en humanos (fiebre tifoidea y paratifoidea, respectivamente); el serotipo Choleraesuis produce septicemia o infecciones localizadas en cerdo; los serotipos Enteritidis, Typhimurium o Newport producen gastroenteritis en humanos y animales, frecuentemente agudas pudiendo variar de leves a fulminantes.

La fiebre entérica o tifoidea, la más grave de las salmonelosis humanas, cursa con fiebre, malestar, anorexia, mialgias, cefalea, dolor abdominal y/o diarrea dependiendo de la magnitud del inóculo ingerido. Puede aparecer también tos y epistaxis. Los síntomas se agravan y se presenta fatiga, letargia y desorientación, pudiendo aparecer a la semana exantema maculoso o maculopapuloso. Sin tratamiento la letalidad llega al 10% (Parry *et al.*, 2002, Maskalyk, 2003). En el caso de las salmonelas no tifoideas, la gastroenteritis, es el más común de los cuadros clínicos. La infección sobreviene por la ingestión de alimentos contaminados y es clínicamente indistinguible de otras gastroenteritis producidas por otros patógenos gastrointestinales. Aproximadamente 48 h después de la ingestión se inicia un cuadro de dolor abdominal con vómito y diarrea en cantidad moderada, con sangre, moco y tenesmo rectal, acompañado de fiebre y/o cefaleas y mialgias. Normalmente se autolimita al cabo de 4-8 días. Ocasionalmente requiere rehidratación parenteral y hospitalización (Grisaru-Soen *et al.*, 2004, Abe *et al.*, 2004).

La salmonelosis porcina, tradicionalmente asociada a *Salmonella* Choleraesuis, aunque producida con mucha más frecuencia por *Salmonella* Typhimurium, cursa de forma septicémica o enterocolítica. La septicemia se presenta en cerdos de 3 semanas a 5 meses siendo rara en lactantes. Los lechones aparecen inmóviles, anoréxicos, con temperaturas de 40,5 a 41,6° C y tos profunda, ya que

puede existir neumonía. Al cabo de unos días las heces se tornan amarillas. Los animales afectados suelen agruparse y algunos aparecen muertos con las extremidades cianóticas. La letalidad es muy alta (Reed *et al.*, 1986). La forma enterocolítica suele ser leve y se observa con mayor frecuencia en cerdos entre el destete y los 4 meses de edad. Se presenta con diarreas acuosas, amarillentas, inicialmente sin sangre ni mucosidad. En general, las diarreas remiten a los 7 días, aunque pueden ser recurrentes, alargando el proceso varias semanas. La letalidad es baja y se asocia a la pérdida de potasio. Algunos cerdos pueden desarrollar estenosis rectales secundarias (Reed *et al.*, 1986, Oliveira *et al.*, 2005).

1.2 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GÉNERO *SALMONELLA*

1.2.1 Características generales

El género *Salmonella* se sitúa dentro de la familia Enterobacteriaceae, Phylum Proteobacteria. *Salmonella* es un bacilo acapsular, de 2-4µm de largo por 0,6 µm de ancho, que muestra colonias de entre 2 y 3 mm de diámetro, de color blanco-gris y textura viscosa, cuando se aíslan en placas de agar-sangre durante 24h a 37° C.

Este género se caracteriza por tener requerimientos nutricionales muy sencillos, siguiendo un modelo de fermentación ácido-mixta. La mayoría de cepas son prototróficas, aunque algunas cepas principalmente huésped-específicas, necesitan la adición en el medio de factores de crecimiento (auxotróficas): uno o más aminoácidos o vitaminas.

Los miembros del género *Salmonella*, si bien acordes con las características que definen la familia a la que pertenecen, se caracterizan por no formar acetilmetilcarbinol, producir ácido y gas a partir de la fermentación de glucosa, de manitol y casi siempre de sorbitol. También por ser ureasa y fenilalanina desaminasa negativos, aunque positivos para lisina y ornitina descarboxilasas. Son indol negativo y citrato positivo, y no fermentan ni la sacarosa ni el adonitol. En medio TSI (Triple Sugar Iron) *Salmonella* produce normalmente H₂S. No crece en medio con cianida potásica y salvo pocas excepciones (*S. gallinarum*, *S pullorum*) *Salmonella* es móvil por disponer de flagelos peritricos, mostrando la mayoría de las cepas variación difásica de los antígenos flagelares (Madigan *et al.*, 1996).

La temperatura óptima de crecimiento para *Salmonella* es de 35 a 37° C, aunque crece dentro de un intervalo de 7° a 54° C, y el pH óptimo se sitúa entre 7- 7,5, pudiendo crecer entre 4,1 y 9. *Salmonella* crece en alimentos con valores de actividad de agua del 0,93, aunque el valor óptimo se sitúa en 0,995. No crece a valores por debajo de 0,93, aunque el tiempo de supervivencia puede durar meses. Sobrevive a la refrigeración, a la congelación y a ambientes secos. Es sensible a la mayoría de desinfectantes y se destruye a altas temperaturas (60° C durante 2 ó 3 minutos). Puede sobrevivir meses fuera de su hospedador.

1.2.2 Aislamiento

El aislamiento de *Salmonella* se realiza mediante métodos de cultivo tradicionales, que consisten en pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medios líquidos selectivos y aislamiento sobre medios sólidos selectivos.

Los medios de pre-enriquecimiento, como pueden ser el agua de peptona tamponada (APT), el caldo universal (UB) o el medio M9 (APS) son necesarios para muestras con una carga bacteriana presumiblemente baja (portadores tratados, muestras ambientales,...). La eficacia de estos medios varía dependiendo de su capacidad tampón (Hoofar *et al.*, 1998). Por otro lado, el uso de estos medios en muestras fecales no está tan claro, incluso se cree que pueden ser contraproducentes (Aho, 1992). Hoy, sin embargo el uso de pre-enriquecimiento se propone como práctica común en el aislamiento de *Salmonella* en muestras fecales de cerdo, aunque su eficacia no está suficientemente probada (Hoofar *et al.*, 1998, Davies *et al.*, 2000b).

El enriquecimiento en medios líquidos selectivos permite, de forma competitiva, la proliferación de *Salmonella* hasta niveles que la hacen detectable en medios sólidos al cabo de aproximadamente 24h. Ejemplos de caldos enriquecidos son Rappaport-Vassiliadis (RV), Caldo Selenito o Caldo tetracionato. El caldo RV es posiblemente el más utilizado, y hay que tener en cuenta que los caldos selenito y tetracionato pueden inhibir el crecimiento de algunos serotipos auxotróficos de *Salmonella*. La elección de uno u otro método en función de su mayor eficacia o sensibilidad, continúa siendo hoy tema de estudio (Michael *et al.*, 1999, Nollet *et al.*,

2001). También se han desarrollado medios semisólidos como posible alternativa al caldo de enriquecimiento, como el medio semisólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV), o el medio DIASALM. Ambos medios aprovechan, por un lado, la propiedad selectiva de RV y, por otro, la motilidad que caracteriza a la mayoría de cepas de *Salmonella* (Hoofar *et al.*, 2000, Davies *et al.*, 2001 Nollet *et al.*, 2001, Voogt *et al.*, 2001).

Los medios sólidos selectivos y/o diferenciales para *Salmonella*, se basan tanto en la inhibición del crecimiento de otras bacterias entéricas, como en la discriminación visual de las colonias. A menudo se utilizan tanto la producción de H₂S como la no fermentación de lactosa como características diferenciales para dicha discriminación visual. Dentro de este grupo, existe una gran variedad de medios, con mayor o menor especificidad para aislar cepas de *Salmonella*. Podemos destacar los siguientes como los más comúnmente utilizados: agar MacConkey, xilosa-lisina-deoxicolato (XLD), xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4), Hektoen-Enteric (HE), Rambach (Ra), Salmonella-Shigella (SS), agar verde brillante novobiocina-glicerol-lactosa (NBGL), identificación de *Salmonella* SM-ID (SM), CHROMagar (CAS), ABC médium, o COMPASS Salmonella agar, entre otros.

Existen numerosos estudios que comparan la sensibilidad y especificidad de unos medios con otros. En cualquier caso los mejores resultados se dan, para cualquier medio, después del proceso de enriquecimiento (Dusch *et al.*, 1995, Ruiz *et al.*, 1996, Gaillot *et al.*, 1999, Maddocks *et al.*, 2002).

1.2.3 Caracterización fenotípica

Como ya es sabido, el fenotipo es la expresión del genotipo y ello es lo que lo convierte en un método útil para caracterizar las distintas especies de un mismo grupo de microorganismos. Aunque el desarrollo de la biología molecular ha abierto nuevas y mejores posibilidades para la caracterización y el posterior estudio de la taxonomía y epidemiología bacteriana, los resultados obtenidos con técnicas de caracterización fenotípica como pueden ser el perfil bioquímico, el serotipo, el fagotipo, o el perfil de antibiorresistencia, les confieren un valor como herramientas complementarias útiles para el marcaje epidemiológico.

1.2.3.1 Perfil bioquímico

El perfil bioquímico confirma la identidad de *Salmonella* frente a otras enterobacterias que hayan podido ser aisladas, conjuntamente, en los medios selectivos. La determinación del perfil bioquímico se establece como técnica de identificación, ya que se trata de una característica distintiva y “estable”, capaz de diferenciar a la mayoría de géneros del grupo de las enterobacterias (Farmer *et al.* 1985). Así pues, la determinación del perfil bioquímico es el paso siguiente al aislamiento.

Las pruebas bioquímicas tradicionalmente se han llevado a cabo mediante una serie de medios específicos como son: TSI, Citrato de Simons, SIM (Sulfide-indol-motility), Ureasa, Oxidasa, Catalasa, Vogues-Proskauer, fenilalanina desaminasa,..., para detectar y visualizar en ellos una serie de resultados clave en la identificación de *Salmonella*.

Las técnicas sistematizadas de identificación de microorganismos se basan principalmente en la realización simultánea de determinadas pruebas bioquímicas en formato miniaturizado. Así, tenemos por ejemplo procedimientos manuales como el sistema API (bioMérieux Inc., Durham, NC), con un periodo de identificación estimado de 21 horas, y los sistemas automáticos de identificación, como puede ser Vitek (bioMérieux), con tiempos de identificación de entre 4 y 18 horas. Estas técnicas, que han evolucionado rápidamente desde su aparición (Stager *et al.*, 1992), han aumentado la eficacia de la identificación de los métodos tradicionales, introduciendo un mayor número de pruebas bioquímicas específicas. Así, en el caso de Vitek se pueden alcanzar porcentajes de entre el 98 y el 99% de identificación positiva a las 8 horas (Visser *et al.* 1992, O’Hara *et al.* 1993), frente a identificaciones positivas con un error estimado de más del 20% en el caso de métodos tradicionales.

El perfil bioquímico de *Salmonella* es estable para la mayoría de los serotipos pertenecientes a los 7 subgrupos identificados. El subgrupo I (subespecie *enterica*) que engloba aproximadamente al 60% de los serotipos descritos, los cuales representan la práctica totalidad de los aislamientos en muestras clínicas (Brenner *et al.*, 2000), se caracteriza bioquímicamente por utilizar el citrato como única fuente de

carbono, y ser arginina dihidrolasa, lisina y ornitina positivo. Este subgrupo consta de al menos 5 excepciones al perfil típico: los serotipos Typhi, Choleraesuis, Paratyphi A, Gallinarum i Pullorum. Ninguno de estos 5 serotipos es capaz de utilizar el citrato, con la excepción del serotipo Choleraesuis, con un 25 % de cepas positivas. Con respecto a la presencia de enzimas, el serotipo Paratyphi A es negativo para lisina decarboxilasa. Todos son prácticamente negativos para arginina dihidrolasa, exceptuando el serotipo Choleraesuis en el que está presente en un 55% de los casos. Los serotipos Typhi y Gallinarum son ambos negativos para ornitina decarboxilasa (Farmer *et al.*, 1985). Se observan además diferencias en el porcentaje de fermentación de algunos azúcares entre estos serotipos y los del resto del subgrupo I de *Salmonella* (Tabla 2).

TABLA 2. Serotipos de *Salmonella* del subgrupo I y porcentajes de fermentación de azúcares (Farmer *et al.*, 1985).

Serotipos	Azúcares ⁽¹⁾												
	Lac	Sac	Raf	Glu	GluG	Mal	Man	Xil	Ram	Ara	Dul	Ino	Sor
subgrupo I	1	1	2	100	96	97	100	97	95	99	96	35	95
Typhi	1	0	0	100	0	97	100	82	0	2	0	0	99
Choleraesuis	0	0	1	100	95	95	98	98	100	0	5	0	90
Paratyphi A	0	0	0	100	99	95	100	0	100	100	90	0	95
Gallinarum	0	0	10	100	0	90	100	70	10	80	90	0	1
Pullorum	0	0	1	100	90	5	100	90	100	100	0	0	10

⁽¹⁾ Lac: lactosa, Sac: sacarosa, Raf: rafinosa, Glu: glucosa, GluG: producción de gas, Mal: maltosa, Xil: xilosa, Ram: ramnosa, Ara: arabinosa, Dul: dulcitol, Ino: Inositol, Sor: sorbitol.

1.2.3.2. Serotipo

El serotipado permite identificar cepas del género *Salmonella* mediante la determinación de su composición antigénica: antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H), que mayoritariamente constan de 2 fases (H₁ y H₂), siendo ésta una característica exclusiva del género, y para ciertos serotipos, el antígeno capsular (Vi) (Tabla 3).

La identificación de los serotipos se basa en el esquema propuesto por Kauffman y White (Popoff *et al.*, 1997), incluyendo sólo los antígenos de superficie de importancia diagnóstica (Le Minor *et al.*, 1984). Así, a cada *Salmonella* se le

asigna una “fórmula” antigénica determinada, habiéndose identificado un total de 2.541 serotipos hasta el año 2002 (Centers for Disease Control and Prevention, 2004).

La fórmula antigénica se representa mediante una combinación de números y letras. A modo de ejemplo, la fórmula antigénica de *Salmonella* Typhimurium es 1,4,5,12:i:1,2. En primer lugar, aparecen los antígenos O separados por comas. En ocasiones alguno de estos números figura entre corchetes, lo que significa que no siempre está presente. A continuación, para aquellos serotipos que lo presentan, aparece el antígeno capsular, separado de los anteriores también por comas. Y, finalmente separados de los anteriores mediante dos puntos, los antígenos flagelares, cuyas fases se separan asimismo por dos puntos. La primera fase (H₁) se representa con letras minúsculas, aunque los nuevos antígenos descubiertos tienen asignados valores del tipo: z6, z10, etc. La segunda fase (H₂) se representó inicialmente con números arábigos, aunque hoy los nuevos antígenos se representan con letras (Popoff *et al.*, 2001). Los antígenos flagelares pueden presentarse de forma monofásica en algunas cepas, de manera que no expresan la segunda fase flagelar y se representa con el signo “-”. Existen cepas monofásicas que pueden presentar ocasionalmente la segunda fase flagelar, opcionalmente en la fórmula figura el signo “-” ó bien el antígeno entre corchetes. Aunque el serotipado no es una técnica rutinaria en los laboratorios de diagnóstico, es una referencia obligada en los estudios de salmonelosis.

TABLA 3. Algunos ejemplos de serotipos y sus fórmulas antigénicas (Espigares *et al.* 2002, CDC, 2004).

Serotipos	Antígenos Somáticos y flagelares			Fórmula Antigénica
	O	H ₁	H ₂	
S. Paratyphi A	1,2,12	a	[1,5]	S. I ⁽¹⁾ 1,2,12:a:- ó 1,2,12:a: [1,5]
S. Paratyphi B	1,4,[5],12	b	1,2	S. I 1,4,[5],12:b:1,2
S. Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2	S. I 1,4,[5],12:i:1,2
S. Virchow	6,7	r	1,2	S. I 6,7:r:1,2
S. Typhi	9,12, [Vi]	d	-	S. I 9,12, [Vi]:d:-
S. Enteritidis	1,9,12	g,m	[1,7]	S. I 1,9,12:g,m:- ó 1,9,12:g,m: [1,7]
S. Pullorum ⁽²⁾	1,9,12	-	-	S. I 1,9,12:-:-

⁽¹⁾ abreviatura de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (o subgrupo I)

⁽²⁾ serotipo inmóvil

1.2.3.3. Fagotipo

Las cepas pertenecientes a un mismo serotipo de *Salmonella*, pueden diferenciarse en función de sus patrones de sensibilidad, frente a un grupo seleccionado de bacteriófagos. El fagotipo o lisotipo es de gran valor en el estudio epidemiológico de *Salmonella*, ya que existe un alto porcentaje de correlación entre fagotipo y origen epidémico. Aunque algunos de los recursos serológicos pueden utilizarse para distinguir cepas de serotipos como Typhimurium, las diferencias se evaluarán con mayor precisión mediante el fagotipado (Rabsch *et al.* 2002), permitiendo ampliar la información necesaria para establecer posibles relaciones epidemiológicas.

Los serotipos Typhi, Paratyphi A y B, Typhimurium y Enteritidis han sido los más fagotipados desde un inicio. Existen más de 100 fagotipos distintos de *S. Typhi* (Craigie *et al.* 1938) y se han identificado hasta el momento más de 300 para *S. Typhimurium* (Callow, 1959, Anderson *et al.* 1977), de los cuales más de 200 son fagotipos definitivos (DTs) (Liebana *et al.*, 2002). Se han desarrollado, además, esquemas de fagotipado para otros serotipos de importancia clínica: Braenderup (Sechter *et al.* 1968), Newport (Petrow *et al.* 1974), Virchow (Chambers *et al.* 1987) o Agona (Tyc, 1990) entre otros.

En general, al igual que el serotipado, la técnica de fagotipado, no se lleva a cabo de forma rutinaria en todos los laboratorios, pero se establece como marcador epidemiológico complementario al serotipado. De hecho, a raíz de la caracterización de la cepa pentarresistente de *S. Typhimurium* DT104 en el Reino Unido (Threlfall *et al.*, 1994, Low *et al.*, 1997) y los EEUU (Angulo F, 1997, Glynn *et al.*, 1998), el fagotipo ha pasado a formar parte de la taxonomía de este serotipo para la mayoría de estudios de caracterización de cepas (Wray *et al.*, 1998, Briggs *et al.*, 1999, Liébana *et al.* 2002, Lan *et al.*, 2003).

1.2.3.4. Antibiorresistencia

La aparición de antibiorresistencias en *Salmonella*, y otras bacterias zoonóticas, está ligada al abuso de antibióticos como tratamiento terapéutico y promotor de

crecimiento en el ganado (Witte, 1998, Schroeder *et al*, 2002). Esto ha producido una inevitable selección de cepas resistentes de la flora comensal y patógena de los animales. Posiblemente por ello, los niveles de antibiorresistencia de la flora comensal del intestino en humanos se han visto también incrementados (van den Bogaard *et al* 2000).

En la adquisición de resistencias frente a antimicrobianos están implicados numerosos mecanismos relacionados con elementos genéticos móviles (de transmisión horizontal): plásmidos, transposones e integrones, jugando estos un papel importante en su diseminación (Davies, 1994).

Conocer los niveles de resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* es de interés tanto sanitario como epidemiológico. Las técnicas utilizadas para determinar antibiorresistencias se clasifican en general, en manuales (métodos de difusión y métodos de dilución) y semiautomáticas/automáticas (Ej. miniAPI, Vitek System o Walkway System). La mayoría de estas técnicas determinarán si la bacteria es resistente o sensible frente a la acción de un determinado antimicrobiano, existiendo además un valor de sensibilidad intermedio, cuya interpretación en clínica supondrá la adopción de distintas actuaciones frente a la infección como por ejemplo las dosis a suministrar. Las pruebas de sensibilidad por métodos de dilución además, permiten determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), con lo cual se obtiene una medida *in vitro* más precisa de la actividad de un antimicrobiano.

Establecer un perfil de antibiorresistencia es una práctica común, sencilla, rápida y accesible para la caracterización de cepas de *Salmonella* en estudios epidemiológicos. Un patrón de resistencias similar puede indicar cierta clonalidad, siempre y cuando las cepas en estudio sean geográficamente cercanas. Aunque las resistencias hayan sido transferidas de forma horizontal, se ha demostrado en *Salmonella* Typhimurium DT104 la integración de ciertas antibiorresistencias a nivel cromosómico (Threlfall *et al.*, 1994, Briggs *et al.*, 1999).

1.2.4 Caracterización genotípica

La ingeniería genética y la biología molecular nos permiten conocer y estudiar el genoma de las bacterias para su ordenación y clasificación, de acuerdo a un

criterio mucho más amplio que el obtenido a través de los métodos de caracterización fenotípica. Los métodos de caracterización genotípica disponen en general de mayor poder de discriminación, reproducibilidad y tipabilidad que los métodos fenotípicos, aunque estos últimos sean de gran interés por su mayor sencillez, rapidez, y en general, menor costo. Para la caracterización de *Salmonella* destacan el perfil plasmídico, los patrones de digestión de ADN por endonucleasas (como los patrones de restricción cromosómica y la electroforesis en campo pulsado (PFGE)), el revelado de fragmentos específicos mediante hibridación con sondas (como el ribotipado y la presencia de la secuencia de inserción IS200) y los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.2.4.1 Perfil plasmídico

Los plásmidos son fragmentos de ADN circular, que pueden replicarse autónomamente dentro de la bacteria, funcionando como vectores de clonación y permitiendo la transmisión horizontal de resistencias o de factores de virulencia, entre otros.

El perfil plasmídico (número y tamaño de plásmidos) de un microorganismo permite su caracterización y la detección de similitudes y diferencias entre cepas, pudiendo utilizarse como marcador epidemiológico.

La mayoría de métodos utilizados para la extracción de plásmidos son *kits* comerciales de purificación (Gibco BRL, QIAGEN, etc.) basados, mayoritariamente, en los métodos descritos por Birnboim *et al.* en 1979 y Kado *et al.* en 1981.

Para la caracterización, el estudio y la vigilancia epidemiológica de *Salmonella*, la determinación del perfil plasmídico es casi rutinaria junto a determinados métodos fenotípicos y, como mínimo, a algún otro método genotípico de análisis cromosómico (Ridley *et al.*, 1998, Echeita *et al.*, 2001, Gebreyes *et al.*, 2002, Liébana *et al.*, 2002, Lindqvist *et al.*, 2004). El análisis plasmídico es también importante para el estudio del mecanismo de adquisición de antibiorresistencias en *Salmonella* (Batchelor *et al.*, 2005, Reddy *et al.* 2005).

1.2.4.2 Patrones de restricción cromosómica

La técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) descrita por Kan y Dozy en 1978, se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular, después de someterlo a un proceso de digestión con una enzima de restricción determinada. Dependiendo de si la enzima utilizada es de corte frecuente o no, obtendremos mayor o menor número de fragmentos. Inicialmente se utilizaron enzimas de restricción de corte frecuente que proporcionaban patrones de restricción electroforéticos con un gran número de bandas. La tecnología RFLP se utiliza como primer paso en los métodos de hibridación como el IS200-RFLP (Jeoffreys et al. 2001) entre otros y se considera variante del método PCR, cuando se aplica a una secuencia conocida de ADN amplificada, es decir, PCR-RFLP (Allen *et al.*, 2002, Kisiela *et al.*, 2005).

1.2.4.3 Técnicas de hibridación.

En general, para la caracterización de cepas de *Salmonella* las técnicas de hibridación más utilizadas son el ribotipado y la detección de la secuencia de inserción IS200. El ribotipado se basa en el estudio del polimorfismo de patrones de restricción de genes muy conservados de ARN ribosómico y secuencias asociadas. El ADN se extrae de la bacteria y se corta, mediante enzimas de restricción, en fragmentos de distintos tamaños. Posteriormente se transfieren a una membrana y son detectados con una sonda de la región del operón del ADN_r (sonda universal). El patrón de bandas obtenido (ribotipo) variará, además de en función de la cepa, en función de las enzimas utilizadas (Esteban *et al.* 1993, De Cesare *et al.* 2001), aumentando el poder de discriminación cuando se utilizan un mayor número de enzimas. Esta técnica, se estableció a principios de los 90, como una de las de elección para la caracterización genotípica de *Salmonella* (Lagatolla *et al.*, 1996, Fontana *et al.*, 2003, Pasquali *et al.*, 2004).

Las secuencias de inserción son elementos repetitivos y conservados de ADN que se encuentran tanto en bacterias como en células eucariotas. La secuencia de inserción IS200 se encuentra en más del 90% de los aislamientos del género

Salmonella, a excepción de *Salmonella enterica* serotipo Agona. También se han detectado en algunas cepas del género *Shigella*. Al igual que el ribotipado, la detección de la secuencia de inserción IS200 específica de *Salmonella* (Gibert *et al.* 1990), se basa en la técnica de hibridación, en la cual los fragmentos de restricción se hibridan con un fragmento de dicha secuencia (Sanderson *et al.*, 1993, Threlfall *et al.*, 1994, Echeita *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2003, Lindqvist *et al.*, 2004).

1.2.4.4 Electroforesis en campo pulsado

En 1982, Schwartz y Cantor introdujeron el concepto de que moléculas de ADN mayores de 50kb hasta más allá de 10 Mb, podían separarse mediante el uso alternado de dos campos eléctricos (Schwartz *et al.*, 1982, 1984). Hasta ese momento sólo fragmentos de ADN de entre 100 a 200 pares de bases hasta 50kb eran separados rutinariamente a través de técnicas convencionales de electroforesis. La capacidad de separar fragmentos de pesos distintos en un campo eléctrico estático y continuo, se pierde cuando se trata de separar moléculas de gran tamaño. Si el ADN se fuerza a cambiar de dirección durante la electroforesis, fragmentos de distintos pesos empezarán a separarse entre ellos. Con cada reorientación del campo eléctrico, los fragmentos de ADN más pequeños se moverán hacia la nueva dirección más rápidamente que los fragmentos mayores. Estos se quedarán atrás separándose de los primeros. Se han descrito distintos modelos que explicarían el comportamiento del ADN durante la PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis). Entre estos se encuentran el “chain model” ó el “bag model” (Chu *et al.*, 1991).

La manipulación del ADN intacto se lleva a cabo mediante la fijación de todo el material celular dentro de pequeños bloques de agarosa de bajo punto de fusión. Tras eliminar los restos celulares, el ADN es digerido por enzimas de restricción específicas de corte poco frecuente. La PFGE nos permite analizar un número pequeño de grandes fragmentos frente a un número elevado de fragmentos pequeños con la electroforesis convencional.

Los distintos sistemas utilizados para llevar a cabo la electroforesis en campo pulsado se pueden clasificar en 2 categorías. La más sencilla está basada en la inversión periódica de la polaridad de los electrodos durante la electroforesis, así el

ADN se somete a un ángulo de reorientación de 180° (Field Inversión Gel Electrophoresis, FIGE) (Carle, 1986), asegurando la linealidad de los resultados y simplificando así las comparaciones de los patrones obtenidos. La segunda categoría implica instrumental que reorienta los fragmentos de ADN en ángulos oblicuos (96° hasta 165°) resultando en un movimiento en zigzag y hacia delante, produciendo una separación más rápida con un rango mayor de fragmentos en un mismo gel (Birren *et al.*, 1988). Para asegurar la linealidad de los patrones resultantes, se han diseñado sistemas como el de Contour-clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis (CHEF) (Chu *et al.*, 1986) o el de Rotating Gel Electrophoresis (RGE) (Southern *et al.*, 1987, Serwer *et al.*, 1990). El primero utiliza varios electrodos dispuestos hexagonalmente, con campo eléctrico homogéneo y con cambios de dirección del campo llevados a cabo electrónicamente. En el segundo el campo eléctrico está fijado y se hace rotar el gel para cambiar la dirección del ADN.

Esta técnica fue estandarizada por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) en el año 1996, para el programa de vigilancia conocido como *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 permitiendo caracterizar la práctica totalidad de cepas patógenas estudiadas con gran poder de discriminación (Swaminathan *et al.*, 2001). Actualmente, se establece como el método de elección para los estudios epidemiológicos de patógenos, y entre ellos, de *Salmonella* (Threlfall *et al.*, 1996, Ridley *et al.*, 1998, Kariuki *et al.*, 1999, Lindstedt *et al.*, 2000, Garaizar *et al.*, 2000, Baggesen *et al.*, 2000, Lailler *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2003, Lawson *et al.*, 2004, Güerri *et al.*, 2004, Eriksson *et al.*, 2005).

1.2.4.5 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Kary B. Mullis en 1983 (Mullis *et al.*, 1987) y perfeccionada por Saiki *et al.* en 1985 y White *et al.* en 1989, se basa en el reconocimiento y la amplificación de una fracción de ADN *in vitro* mediante la acción de una ADN-polimerasa termoestable.

La PCR se utiliza para obtener la suficiente cantidad de ADN para su análisis, siendo su aplicación principal el diagnóstico. Sin embargo, la PCR *per se*, no es útil como marcador molecular, aunque es la base de un número cada vez mayor de técnicas que, a partir de pequeñas cantidades iniciales de ADN, permiten amplificar secuencias al azar (Random Amplified Polymorphic DNA RAPD, Arbitrarily Primed-PCR AP-PCR, Amplified Fragment Length Polymorphism AFLP), las más utilizadas para la caracterización de *Salmonella*, o específicas (Simple Sequence Repeats SSR, Cleaved Amplified Polymorphic Sequence CAPS).

Entre las PCR de secuencias al azar, el RAPD utiliza oligonucleótidos cortos (10 pb) de secuencias arbitrarias y de baja especificidad, que permiten amplificar fragmentos pequeños de ADN (Welsh *et al.* 1990, Williams *et al.* 1990). La AP-PCR es esencialmente parecida a la anterior, con la salvedad de que el oligonucleótido es mayor (>20pb), y de que combina un ciclo de baja especificidad con ciclos de alta astringencia. En el caso de la AFLP se utilizan dos enzimas, una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente. Los fragmentos obtenidos posteriormente se amplifican utilizando “primers” de extremos compatibles con el punto de corte enzimático (Janssen *et al.* 1997). En este caso se utilizan geles de poliacrilamida para la resolución de los fragmentos obtenidos.

1.2.5 Revisión crítica de los métodos de caracterización

Para establecer la validez y utilidad de un método de caracterización epidemiológico se consideran, básicamente, criterios de reproducibilidad, tipabilidad y poder de discriminación. Sin embargo, existen otros criterios importantes a tener en cuenta a la hora de elegir un método frente a otro, como son el tiempo necesario para obtener resultados, el coste, la disponibilidad de material adecuado, la existencia de personal cualificado con experiencia adecuada, etc.

Se han llevado a cabo varios estudios comparativos para valorar la eficacia de los distintos métodos de caracterización fenotípica y/o genotípica de *Salmonella* (Holmberg *et al.*, 1984, Olsen *et al.*, 1994, Olive *et al.*, 1999, van Belkum *et al.*, 2001, Liébana, 2002).

Los métodos fenotípicos como el perfil bioquímico y el serotipado, se utilizan básicamente para la identificación. Consecuentemente, ambos métodos tienen un poder de discriminación bajo. En el primer caso, la determinación del perfil bioquímico de manera automática ha mejorado sin embargo su reproducibilidad y tipabilidad. Tanto la valoración del perfil bioquímico como el serotipado son métodos imprescindibles para la identificación y estudio epidemiológico de *Salmonella*.

El fagotipado permite diferenciar cepas (fagotipos) dentro del mismo serotipo, pero su uso no es sistemático en la mayoría de laboratorios. Además, algunos fagotipos aparecen con una alta prevalencia en ciertas áreas geográficas, por lo cual posee un poder de discriminación insuficiente y no refleja necesariamente clonalidad (Liébana *et al.*, 2002). En cambio, sí es interesante, aunque no concluyente, como marcador epidemiológico intraserotípico en el estudio de brotes.

La metodología para determinar el patrón de sensibilidad a los antimicrobianos está disponible en cualquier laboratorio, siendo un método reproducible y fácilmente interpretable. Aunque posee un insuficiente poder de discriminación como método de tipificación, es útil como marcador epidemiológico complementario (van Belkum *et al.*, 2001). En general, al igual que el fagotipado, se utiliza como marcador epidemiológico complementario de métodos de caracterización genotípica (Holmberg *et al.*, 1984, Kariuki *et al.*, 1999, Gebreyes *et al.*, 2002, Lailler *et al.*, 2002).

Los métodos basados en marcadores moleculares se han establecido como los que mejor cumplen los criterios iniciales, aunque con importantes diferencias entre ellos.

Respecto al perfil plasmídico, algunos autores han defendido la idea de utilizarlo como único marcador genético en el estudio epidemiológico de cepas de *Salmonella* (Wray *et al.* 1990, Wray *et al.*, 1998), debido a su rapidez y simplicidad entre otras ventajas. Esta metodología se demuestra más eficaz para los serotipos Typhimurium o Virchow (Baggesen *et al.* 2000, Torre *et al.* 1993) que para Enteritidis (Liébana *et al.*, 2001a). La identificación de plásmidos es útil como marcador epidemiológico complementario intraserotípico, mientras exista una cantidad mínima de presión selectiva en el medio ambiente, aunque esto incrementa la inestabilidad del perfil obtenido (Pohl *et al.* 1980, Liébana E., 2002).

El patrón de restricción cromosómica se establece como un método sensible y relativamente fácil de llevar a cabo, útil si se comparan un número pequeño de cepas, cuando se utilizan de forma exclusiva endonucleasas de corte frecuente, ya que se generan perfiles muy complejos para interpretar y comparar a gran escala. Sin embargo, los fragmentos de gran peso molecular no se resuelven en la electroforesis convencional, lo cual no permite la obtención de un patrón cromosómico completo.

Los métodos basados en la técnica PCR tienen, en general, baja reproducibilidad. Así, la técnica RAPD que puede utilizarse como único método de caracterización genotípico en *Salmonella* (Hilton *et al.*, 1997, Soto *et al.*, 1999, Betancor *et al.*, 2004) suele acompañarse de técnicas con una mayor reproducibilidad (Eriksson *et al.*, 2005), al igual que la técnica AP-PCR (Burr *et al.*, 1998). La técnica AFLP, sin embargo, mejora estos resultados (van Belkum *et al.*, 2001) confirmándose como un buen marcador epidemiológico para *Salmonella* (Savelkoul *et al.*, 1999, Nair *et al.*, 2000, Mmolawa, *et al.*, 2002, Hu *et al.*, 2002, Lan *et al.*, 2003).

El ribotipado, que muestra un menor poder de discriminación que la PFGE, permite obtener resultados más rápidamente mediante métodos automáticos como puede ser el RiboPrinter. Varios estudios de principios de los 90, llevados a cabo con distintos serotipos de *Salmonella*, demuestran la utilidad del ribotipado como marcador epidemiológico complementario al perfil plasmídico, y a métodos fenotípicos como el fagotipado y el perfil de antibiorresistencia (Martinetti *et al.*, 1990, Nastasi *et al.*, 1991, Olsen *et al.*, 1992). Por su parte, la técnica para la detección de la secuencia de inserción IS200, aunque es reproducible, tiene una utilidad en ocasiones cuestionable debido a la presencia variable y limitada de esta secuencia dentro de algunos serotipos de *Salmonella* (Torre *et al.*, 1993).

La PFGE, establecida como la técnica de elección para el estudio de clones de *Salmonella enterica* (Usera *et al.*, 1998, Liébana *et al.*, 2001b) es sin duda la mejor herramienta de caracterización genética de que disponemos actualmente. Sin embargo, muestra ciertas limitaciones para diferenciar cepas de *S. Enteritidis* (Thong *et al.*, 1995, Liébana *et al.*, 2002a). Por otro lado, la elección correcta de la enzima (o enzimas) de restricción y las condiciones óptimas de carrera, así como el tiempo y los medios necesarios para llevarla a cabo, siguen siendo el punto débil de la técnica.

1.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS

1.3.1 Distribución geográfica

La salmonelosis es la toxiinfección alimentaria transmitida a través de productos y subproductos de origen animal más importante en los países desarrollados. Su seguimiento y control se ha convertido en una cuestión prioritaria de salud pública. En Europa se declaran una media de 73 casos por cada 100.000 habitantes, con una variación de entre 1,8 a 136 casos dependiendo del método diagnóstico, la comunicación de los datos y los hábitos culinarios de cada país. Se estima sin embargo que la cifra real está alrededor de los 450 casos por cada 100.000 habitantes (Berends *et al.*, 1998), causando 3 muertes por cada millón de habitantes. El CDC en Estados Unidos comunicó en 2001 una media de 400 muertes por salmonelosis al año (Voetsch *et al.*, 2004).

En el año 2000, la OMS fundó la Global Salm-Surv (WHO-GSS) para reducir el peso y a la vez, el efecto global que representan las enfermedades de origen alimentario, mediante la recopilación de la información obtenida en los laboratorios de referencia de cada país. Estos datos se analizaron para detallar la distribución global de los serotipos de *Salmonella* en muestras tanto humanas como no humanas. Cuarenta y siete de los 138 países pertenecientes a esta organización en todo el mundo enviaron datos del periodo 2000-2002, de un total de casi 300.000 casos de salmonelosis humanas y poco más de 65.000 no humanas (España, Francia, Holanda, Gran Bretaña, e Irlanda fueron algunos de los ausentes a nivel Europeo). En general, los serotipos más comunes distribuidos en los 5 continentes son Enteritidis (63%), Typhimurium (14%) y Newport (2,6%) en muestras de origen humano y Typhimurium (22,3%), Heidelberg (9,3%) y Enteritidis (8,9%) en las de origen no humano. *Salmonella* Typhimurium en muestras humanas es el serotipo más frecuente en Oceanía, África y América del Norte, mientras que Enteritidis lo es en Europa, América del Sur y Asia (Galanis *et al.*, 2004).

En España, al igual que en el resto de Europa, los serotipos con mayor prevalencia son Enteritidis y Typhimurium, habiendo mostrado el segundo un descenso importante en relación al primero en los últimos años.

1.3.2 Prevalencia

El estudio de la prevalencia de *Salmonella* en las explotaciones animales y la industria cárnica de bovino, porcino, aves y subproductos es importante, además de por su efecto sobre la sanidad animal, por la necesidad de elaborar planes de salud pública y programas de control, ya que el contagio en países desarrollados se debe generalmente a la ingestión de alimentos contaminados.

En granjas de producción porcina en la UE, se estudiaron las prevalencias en cerdas jóvenes en granjas de desarrollo y, después del transporte, en granjas de reproducción. La prevalencia de *Salmonella* aumentó de <4% a >20% (Davies *et al.*, 2000). Se observó también el aumento en la prevalencia en animales evaluados en granja y posteriormente en matadero. El incremento podía pasar del 9% al 80%, respectivamente (Davies, 1999, Hurd *et al.*, 2001).

La carne de cerdo, causante del 10% al 23% de los casos de salmonelosis humana en varios países de la UE (Steinbach *et al.*, 1999) presenta en las canales una prevalencia del 3,8 %, cuyo origen puede deberse al propio animal positivo (70% de los casos), a la contaminación cruzada con otros animales (Berends *et al.*, 1997), o haberse contaminado en el matadero sin tener nada que ver con las condiciones de la granja de origen.

Entre los años 1998 y 2001 la Food Safety and Inspection Service (FSIS) de Estados Unidos detectó una prevalencia en muestras de carne de pollo y cerdo del 10,7% y el 5,4% respectivamente, destacando un 29,2% en carne picada de pavo.

En general los sistemas de producción "todo dentro-todo fuera", rigurosas prácticas de limpieza, la correcta separación de animales enfermos, etc, en un ciclo cerrado de producción, reducen la prevalencia de *Salmonella* evitando la formación de ciclos continuos de reinfecciones procedentes del ambiente (van der Wolf *et al.*, 2001a, Lo Fo Wong *et al.*, 2004, Miller *et al.*, 2005). Los programas de control adoptados por países como Suecia o posteriormente Dinamarca, han reducido la prevalencia de *Salmonella* de forma drástica. En Dinamarca, Bager en 1996, estimó una prevalencia del 20% de *Salmonella* Enteritidis en las cáscaras de huevo, antes del programa de control iniciado para reducir la presencia de *Salmonella* en las gallinas

ponedoras. Estas tenían una prevalencia inicial de >7%, que se redujo después del programa a <2% en 2001 (Wegener *et al.*, 2003).

La prevalencia de los serotipos Enteritidis y Typhimurium en el conjunto de aislamientos informados en España en el año 1997 al Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (LNRSSSE), fue del 45% y el 32% respectivamente en el año 1997 y del 61% y el 20% en el 2001 (Echeita *et al.*, 2005). La prevalencia media estimada durante estos años se sitúa en el 51% y el 24%, respectivamente. La aparición de la variante monofásica de Typhimurium (4,5,12:i:-) en el año 1997, con una prevalencia del 4% en 1998 y un 2,3% en el 2001 han hecho que este variedad pase a situarse en el 4º lugar en cuanto a aislamientos en nuestro país, por detrás del serotipo Hadar y ligeramente por encima de Virchow. Su prevalencia en los últimos años se ha situado en el 3% (de Frutos *et al.*, 2005).

En España, los fagotipos más comunes del serotipo Enteritidis son 1, 4, 6A y 6. El fagotipo 1, ha aumentado considerablemente en los últimos años, pasando de un 25% a un 40% en el período de 1997 hasta 2001, con el doble de casos informados en ese último año. El fagotipo 4, sin embargo, ha pasado de un 40% a un 21%, durante el mismo período de tiempo. Estos porcentajes se han mantenido estables durante los años 2002 y 2003 (Echeita *et al.*, 2005). En cuanto a los fagotipos del serotipo Typhimurium, los más frecuentes son 104, 104B, 193 y U302 en orden de incidencia en el año 1998. Cabe destacar que en ese año se describió por primera vez el fagotipo U302 ya que fueron incorporados 2 nuevos fagos adicionales al esquema del serotipo de Typhimurium. La prevalencia de este fagotipo ha aumentado considerablemente desde entonces, pasando a ser el más aislado en el año 2001, ligeramente por encima del fagotipo 104, y doblando el porcentaje de aislamientos pertenecientes al fagotipo 104b. En el 2003, el fagotipo U302 volvió a ser el más frecuente, mientras que los fagotipos 104 y 104b se mantuvieron por detrás del fagotipo 193.

1.3.3 Vigilancia epidemiológica

La recopilación sistemática de datos proporcionados por los servicios de diagnóstico y laboratorios de referencia, así como la investigación y el análisis sobre

la incidencia y prevalencia de *Salmonella*, son de gran importancia para el control y la prevención de la salmonelosis.

La eficacia de un sistema de vigilancia epidemiológica, requiere un planteamiento plural que implique la participación integral de organismos de salud pública, tanto locales como estatales. Un programa de vigilancia a nivel supraestatal o mundial, necesita buenos sistemas y estrategias de detección dentro de cada país y el compromiso de los países participantes de informar sobre la incidencia y prevalencia de la infección. Así tenemos programas como la Red Básica de Vigilancia (Basic Surveillance Network) (2000) financiada por la Comisión Europea y la WHO-GSS (2000), entre otras. Sin embargo, para el estudio de brotes epidémicos, no es suficiente con proporcionar datos relacionados únicamente con el serotipo, ya que prácticamente el 80% de las salmonelosis en humana en todo el mundo pertenecen a los serotipos Enteritidis y Typhimurium, siendo también los más aislados en muestras no humanas. La introducción del fagotipo y otros métodos fenotípicos como la antibiorresistencia, son de gran ayuda aunque no son métodos concluyentes, haciendo necesario el uso de algún método de caracterización molecular.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades del Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (HHS/CDC), propusieron elaborar, a través del programa PulseNet (1993), un banco de datos a partir de los patrones de restricción obtenidos mediante la técnica de PFGE, de patógenos aislados en personas enfermas y alimentos sospechosos de estar contaminados, utilizando tanto equipos como métodos estandarizados (Swaminathan *et al.*, 2001). De manera que el rápido acceso a la base de datos permitiría la comparación de los perfiles para determinar la similitud o no de las cepas. Este método se ha empleado también en Canadá, América del Sur y varios países de Asia. A diferencia de lo que sucede en Europa, el fagotipado de cepas de Enteritidis y Typhimurium no es sistemático en los EEUU.

El proyecto Salm-Gene en Europa valoró además los resultados obtenidos tras combinar la información resultante de los patrones de PFGE para el estudio epidemiológico de brotes de *Salmonella* con el serotipo y el fagotipo (Peters *et al.* 2003). Durante el desarrollo del proyecto Salm-gene, también se realizaron consultas

con PulseNet en los EEUU y Canadá para garantizar que los datos fueran comparables entre Europa y Norteamérica.

Salm-Gene se ha convertido en una base de datos de patrones moleculares para *Salmonella*, que forma parte de Enter-Net, que es a su vez una base de datos mucho más amplia para la vigilancia de estos patógenos y sus antibiorresistencias. Enter-Net engloba a los países de la antigua “Europa de los 15” junto a Suiza y Noruega. Esta es, a su vez, la base de datos continuación de Salm-Net (1994-97), creada para “armonizar los procedimientos de fagotipado de *Salmonella* y establecer una base de datos internacional de actualización periódica” (Fisher *et al.*, 1999).

2. HIPÓTESIS

Los aproximadamente 1500 serotipos descritos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* presentan, en general, un perfil bioquímico muy similar, establecido a partir de los resultados positivos o negativos de reacciones bioquímicas específicas. Sabemos que las cinéticas de estas reacciones son variables que dependen de factores nutricionales y genéticos. También sabemos que el estudio epidemiológico entre cepas de *Salmonella* se realiza mediante la combinación de métodos de caracterización fenotípica y genotípica. Así pues, cabría esperar, que la combinación de fagotipo, perfil de antibiorresistencia, perfil plasmídico y electroforesis en campo pulsado fuera capaz de establecer el posible origen de cepas de *Salmonella* y que el perfil bioquímico, ampliado con datos de cinéticas metabólicas obtenidos en condiciones nutricionales constantes, podría ser utilizado como marcador epidemiológico preliminar.

3. OBJETIVOS

1. Establecer la posible relación genética de la cepa monofásica *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (4,5,12:i:-), detectada por primera vez en España en 1997, con distintas cepas del serotipo Typhimurium (4,5,12:i:1,2) mediante la utilización combinada de técnicas de caracterización molecular y fenotípica, con el fin de determinar si se trata de una variedad monofásica del serotipo Typhimurium, o bien puede tratarse de un nuevo serotipo monofásico.
2. Valorar si los resultados obtenidos al estudiar las cinéticas metabólicas de las reacciones bioquímicas utilizadas rutinariamente para la identificación de cepas de *Salmonella*, permiten biotipar aislamientos de manera que se puedan determinar de forma rápida y preliminar relaciones entre cepa.

4. PUBLICACIONES

4.1 Estudio 1:

“Several *Salmonella enterica* subsp *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302”

Journal of Clinical Microbiology 41(6):2395-2400

Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype 4,5,12:i:– Phage Types Isolated from Swine Samples Originate from Serotype Typhimurium DT U302

E. de la Torre,^{1*} D. Zapata,¹ M. Tello,^{1,2} W. Mejía,¹ N. Frías,³ F. J. García Peña,³
E. M. Mateu,^{1,2} and E. Torre¹

Departament de Sanitat i Anatomia Animals¹ and Centre de Recerca en Sanitat Animal,² Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, and Laboratorio de Sanidad Animal, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Algete 28110,³ Spain

Received 8 October 2002/Returned for modification 16 December 2002/Accepted 5 March 2003

Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiling, and phage typing were used to characterize and determine possible genetic relationships between 48 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates of pig origin collected in Catalonia, Spain, from 1998 to 2000. The strains were grouped into 23 multidrug-resistant *fljB*-lacking *S. enterica* serovar 4,5,12:i:– isolates, 24 *S. enterica* serovar Typhimurium isolates, and 1 *S. enterica* serovar 4,5,12:i:– isolate. After combining the *Xba*I and *Bln*I macrorestriction profiles (*XB* profile), we observed 29 distinct subtypes which were grouped into seven main patterns. All 23 of the 4,5,12:i:– serovar strains and 10 serovar Typhimurium isolates were found to have pattern AR, and similarities of >78% were detected among the subtypes. Three of the serovar Typhimurium DT U302 strains (strains T3, T4, and T8) were included in the same 4,5,12:i:– serovar cluster and shared a plasmid profile (profile I) and a pattern of multidrug resistance (resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide, tetracycline, gentamicin, and trimethoprim-sulfamethoxazole) commonly found in monophasic isolates. This led us to the conclusion that strains of the *S. enterica* 4,5,12:i:– serovar might have originated from an *S. enterica* serovar Typhimurium DT U302 strain.

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium is one of the main causes of salmonellosis worldwide. In the mid-1980s a new serovar Typhimurium phage type named DT104, characterized by a pattern of resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide, and tetracycline (R-ACSSuT), emerged and was soon reported in many countries, causing considerable concern (4).

At present, serovar Typhimurium is the second most frequent type of *Salmonella* isolated from human, food, and animal samples in Spain (13, 22). The majority of these isolates correspond to phage types DT104, DT104b and DT U302 (20, 21, 22, 23). In 1997, the Spanish National Reference Laboratory for *Salmonella* first reported on the emergence of a new *Salmonella* serovar with the antigenic formula 4,5,12:i:–, which ranks fourth among the *Salmonella* serovars that are the most frequently isolated in Spain. Interestingly, serovar 4,5,12:i:– has become the most frequently encountered serovar in swine and the second most frequently encountered serovar in pork products (22), a fact that led to the assumption that pigs are the reservoir of such a serovar (5).

The 4,5,12:i:– strains lack the second-phase flagellar antigen encoded by the *fljB* gene, and it has been suggested that they could be a monophasic variant of either serovar Typhimurium (4,5,12:i:1,2) or serovar Lagos (4,5,12:i:1,5) (6). Echeita et al.

(6) also showed that certain 4,5,12:i:– strains that are lysed by phage type 10 (DT U302) and that have the multiresistance profile R-ACSSuT, as well as resistance to gentamicin and trimethoprim-sulfamethoxazole (R-ACSSuT-GSxT) (7, 9) were monophasic variants of serovar Typhimurium.

The rapid increase in the frequency of occurrence of serovar 4,5,12:i:– has made necessary further studies in order to determine its origin and its genetic relationship with other serovars. A wide range of genotypic methods can be used for this purpose; among these is pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), a method used because of its high discriminatory power and easy reproducibility (10, 11, 15, 24).

In this paper we present the results of a genetic comparison of serovar Typhimurium and 4,5,12:i:– isolates of pig origin by bacteriophage typing, PFGE, and plasmid profiling.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Twenty-four *Salmonella* serovar Typhimurium isolates, 23 *Salmonella* serovar 4,5,12:i:– isolates, and 1 *Salmonella* 4,5,12:i:– isolate obtained from pig samples from 1998 to 2000 were used in this study.

The serovar Typhimurium isolates were randomly chosen from cultures stored in our laboratory. The 4,5,12:i:– and 4,5,12:i:– isolates corresponded to the first strains of this type to be isolated during the period of time mentioned above. All isolates originated from *Salmonella* outbreaks or healthy carriers on different Spanish pig farms. *Salmonella* serovar Typhimurium LT2 was used as the reference strain.

Serotyping and phage typing. The serotypes and phage types were determined in the Laboratorio de Sanidad Animal (Algete, Madrid) by the Kauffman-White scheme (14) and as described by Callow (3) and Anderson et al. (1), respectively.

Genomic DNA isolation by PFGE and enzyme restriction. Bacterial genomic DNA was isolated by the method described by Smith et al. (18), with some minor modifications. A single isolated colony was inoculated into 25 ml of brain heart infusion broth overnight at 37°C. The resulting cell concentration was counted in

* Corresponding author. Mailing address: Unitat de Patologia Infecciosa, Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Phone: 34935811046. Fax: 34935813297. E-mail: eugenia.delatorre@uab.es.

a Neubauer hemocytometer chamber and was standardized to approximately 6.05×10^7 cells/ml. Twenty milliliters of the broth culture was centrifuged at $14,000 \times g$ for 15 min at 4°C. The resulting pellet was washed two more times under the same conditions in 10 ml of PETS IV buffer (10 mM Tris, 1 M NaCl [7.5 pH]) and was finally suspended in 1.5 ml of the same buffer.

Agarose plugs were obtained by mixing 100 µl of the bacterial suspension, 200 µl of PETS IV buffer, and 300 µl of 1.6% low-melting-point agarose (Bio-Rad Laboratories) at 56°C. The plugs were incubated overnight in EC-lysis buffer (6 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% *N*-laurylsarcosine, 5 mg of lysozyme [Boehringer Mannheim] per ml, and 10 mg of RNase [Gibco BRL] per ml adjusted to pH 7.5) at 37°C. The plugs were then incubated with ESP buffer (0.5 M EDTA, 1% *N*-laurylsarcosine, 0.5 mg of proteinase K per ml [pH 9.5]) for 48 h at 50°C. In the last step, the inserts were washed with TE buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA [pH 8]) for 24 h at 4°C while being subjected to subtle agitation and approximately six buffer changes. The plugs were then stored in TE buffer at 4°C until use.

Enzymatic restriction was carried out with one-third of the resulting plugs in an Eppendorf tube with 25 U of *Xba*I (12) or 10 U of *Bln*I (25) in 200 µl of H enzymatic buffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 4 h at 37°C.

PFGE. PFGE was performed with a CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories) contour-clamped homogeneous electric field apparatus. Electrophoresis were done in 1% agarose gels (Boehringer Mannheim) in 0.5% TBE buffer (45 mM Tris, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA [pH 8]) at 14°C. A constant voltage of 200 V (6 V cm⁻¹) was applied for 26 h, with pulse times ramping initially from 5 to 15 s over 7 h and then from 15 to 60 s over 19 h, as described before for *Salmonella* (8). A bacteriophage lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs, Beverly, Mass.) was used as the molecular size marker. After ethidium bromide staining, the gels were scanned and analyzed with Diversity Database software (Bio-Rad).

The relationship between different PFGE profiles was analyzed according to the criteria established by Tenover et al. (19), with minor modifications. The method assigns profiles into categories of genetic and epidemiological relatedness. Accordingly, the most common restriction pattern among related isolates was assigned a capital letter code with subindex (subscript) 0. All closely related patterns (three different fragments or less) or possibly related patterns (more than three and less than or equal to six different fragments) were assigned the same letter code with a different subindex. Isolates whose profiles differed from the first profile by seven or more fragments were assigned a new letter. The restriction analysis profiles obtained with each enzyme alone were combined (*Xba*I-*Bln*I) and resulted in the *XB* profile (2, 17). Clustering analysis between PFGE patterns was performed by using Dice's similarity coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) in order to quantify profile similarity relationships by using the software mentioned above.

Plasmid profiles. Plasmids were obtained with a commercial rapid plasmid purification system (Gibco BRL) consisting of a modified alkaline-sodium dodecyl sulfate procedure. After initial plasmid purification with 3 ml of an overnight culture in Luria-Bertani broth, the plasmid DNA was resolved by electrophoresis in 0.8% agarose.

During computer analysis with the Diversity Database software, the linear molecular weight standard (bacteriophage λ DNA digested with *Hind*III) for closed circular plasmid molecules was used only as a positional standard for the plasmid profiles, not for molecular weight determination.

RESULTS

Phage typing and antimicrobial resistance. Phage typing of the 23 serovar 4,5,12:i:- isolates classified 16 of them as U302 (approximately 70%), 5 as nontypeable, 1 as PT193, and 1 as PT208. The 4,5,12:- isolate was untypeable. The distribution of the phage types among the *Salmonella* serovar Typhimurium isolates was six phage type DT104b isolates, five phage type DT U302 isolates, two phage type DT104 isolates, one phage type PT193 isolate, and one phage type PT208 isolate. Nine isolates were untypeable with the available phage library (Table 1). Statistical analysis of these distributions showed that the frequency of the U302 phage type was significantly higher among 4,5,12:i:- isolates ($P < 0.001$). All monophasic isolates and all but three serovar Typhimurium isolates had the characteristic R-ACSSuT profile. In addition, 16 monophasic iso-

TABLE 1. Phage types, antimicrobial susceptibility patterns, PFGE profiles, and plasmid profiles of *S. enterica* subsp. *enterica* serovar 4,5,12:i:- and Typhimurium isolates included in this study

Year and isolate identification ^a	Phage type	Antimicrobial susceptibility ^b	PFGE profile			Plasmid profile
			<i>Xba</i> I	<i>Bln</i> I	Combined <i>XB</i> profile	
1999						
M1	U302	1	A ₄	R ₁	AR ₆	I
M2	U302	2	A ₃	R ₅	AR ₇	I
M3	U302	2	A ₁	R ₁	AR ₂	I
M4	NT ^c	2	A ₁₀	R ₀	AR ₀	VI
2000						
M5	U302	1	A ₁₀	R ₀	AR ₀	I
M6	U302	2	A ₁	R ₁	AR ₂	II
M7	U302	2	A ₈	R ₅	AR ₁₃	I
M8	U302	1	A ₁	R ₁	AR ₂	I
M9	U302	1	A ₁₀	R ₀	AR ₀	I
M10	NT	1	A ₇	R ₂	AR ₉	VII
M11	NT	2	A ₁	R ₁	AR ₂	IV
M12	208	1	A ₇	R ₅	AR ₁₀	I
M13	U302	2	A ₁₁	R ₀	AR ₁₂	I
M14	U302	2	A ₅	R ₁	AR ₀	III
M15	U302	2	A ₃	R ₀	AR ₄	V
M16	U302	2	A ₅	R ₀	AR ₀	VIII
M17	NT	2	A ₁₃	R ₆	AR ₈	I
M18	193	2	A ₅	R ₃	AR ₀	I
M19	U302	2	A ₃	R ₀	AR ₄	V
M20	U302	2	A ₁₀	R ₀	AR ₀	V
M21	NT	2	A ₆	R ₁	AR ₁	I
M22	U302	2	A ₉	R ₅	AR ₁₁	I
M23	U302	1	A ₉	R ₅	AR ₁₁	I
M24	NT	1	C ₄	T ₀	CT ₀	XII
1998						
T1	NT	1	B ₁	T ₀	BT ₀	X
T2	104b	1	C ₃	T ₄	CT ₁	— ^d
T3	U302	2	A ₂	R ₁	AR ₅	I
T4	U302	2	A ₃	R ₅	AR ₇	I
T5	104	1	A ₀	R ₇	AR ₁₄	—
T6	104	1	A ₀	R ₈	AR ₁₄	XI
T7	NT	1	A ₁₇	T ₁	AT ₁	XVII
1999						
T8	U302	2	A ₁₄	R ₀	AR ₃	I
T9	U302	1	A ₀	R ₇	AR ₁₄	IX
T10	208	1	A ₁₆	V ₁	AV ₀	XVII
T11	NT	1	A ₀	R ₇	AR ₁₄	—
2000						
T12	NT	1	A ₁₀	T ₀	AT ₀	X
T13	193	3	B ₀	V ₁	BV ₁	XIV
T14	NT	3	B ₀	V ₀	BV ₀	XIV
T15	NT	3	B ₀	V ₀	BV ₀	XIV
T16	104b	1	B ₁	T ₂	BT ₁	—
T17	104b	1	A ₁₅	T ₃	AT ₂	—
T18	NT	1	C ₀	S ₁	CS ₀	—
T19	104b	1	C ₀	S ₂	CS ₁	—
T20	U302	1	A ₀	R ₇	AR ₁₄	XIII
T21	104b	1	C ₂	S ₃	CS ₃	—
T22	NT	1	A ₀	R ₄	AR ₁₄	XV
T23	NT	1	A ₀	R ₇	AR ₁₄	XVI
T24	104b	1	C ₁	S ₃	CS ₁₃	—
NA ^e , R25	LT2		A ₁₈	W ₀	AW ₀	

^a M, *S. enterica* serovar 4,5,12:i:-; m, *S. enterica* serovar 4,5,12:-;-; T, *S. enterica* serovar Typhimurium; R, *S. enterica* serovar Typhimurium LT2, used as a reference strain.

^b 1, R-ACSSuT; 2, R-ACSSuT-SxTG; 3, R-ASSuT (chloramphenicol susceptibility).

^c NT, Not typed with the available phage library.

^d —, plasmids not detectable.

^e NA, not applicable.

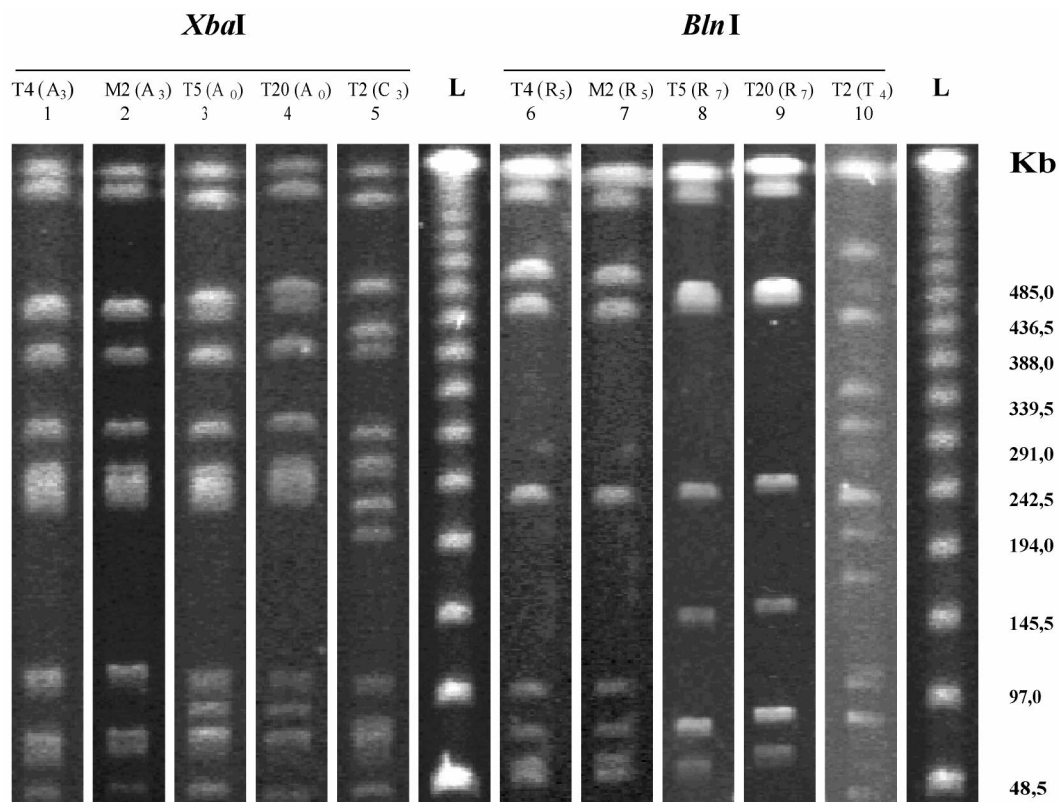


FIG. 1. PFGE patterns of chromosomal DNA restriction fragments generated with the enzymes *XbaI* and *BlnI* for *S. enterica* serovar Typhimurium isolates (isolates T4, T5, T20, and T2) and a serovar 4,5,12:i- isolate (isolate M2). Lanes: 1 and 6, serovar Typhimurium DT U302, plasmid profile I, isolated in 1998; 2 and 7, serovar 4,5,12:i- DT U302, plasmid profile I, isolated in 1999; 3 and 8, serovar Typhimurium DT104, no plasmid, isolated in 1998; 4 and 9, serovar Typhimurium DT U302, plasmid profile XIII, isolated in 2000; 5 and 10, serovar Typhimurium DT 104b, no plasmid, isolated in 1998; L, bacteriophage lambda ladder PFG marker (New England Biolabs).

lates (11 phage type DT U302 isolates, 4 nontypeable isolates, and 1 phage type PT193 isolate) had an extended resistance spectrum that included resistance sulfamethoxazole-trimethoprim and gentamicin. This extended resistance was also observed in three serovar Typhimurium isolates belonging to the U302 phage type (isolates T3, T4, and T8).

PFGE and plasmid profiling. *XbaI* digestion yielded about nine restriction fragments for most isolates under the conditions used in this study. Three main restriction patterns, patterns A, B, and C, were recognized. Pattern A grouped 17 subtypes of isolates as closely related (subtypes A₁ to A₉, >80% similarity) or possibly related (subtypes A₁₀ to A₁₇, >65% and <80% similarity) to subtype A₀. Profile A₀ isolates ($n = 7$) were only found among serovar Typhimurium isolates from 1998 to 2000, while isolates with profiles that were closely related to subtype A₀ (subtypes A₁ to A₉, $n = 19$) were observed among the monophasic isolates, not including isolates T3 and T4 (Fig. 1). Patterns B and C grouped two and three subtypes, respectively, and were detected only among serovar Typhimurium or serovar 4,5,12:i- isolates. With *BlnI* digestion, we obtained about six restriction fragments for all but four isolates. In these four cases the number of fragments was 10 or more. There were four restriction patterns: types R, S, T, and V, with eight, three, four, and one subtypes, respectively. A different profile, profile W, was assigned to the reference strain. R sub-

types R₀ to R₆ were found among monophasic isolates, and only three serovar Typhimurium phage type DT U302 isolates (isolates T3, T4, and T8) were subtypes R₀ to R₆, while profiles R₇ and R₈ were exclusively observed among serovar Typhimurium isolates. The S, T, and V profiles were observed only among serovar Typhimurium or 4,5,12:i- isolates. Subtypes R₁ to R₅ were closely related to subtype R₀ (similarity, >72%), and subtypes R₆ to R₉ were possibly related to subtype R₀ (similarity, >44% and <60%).

When the results of both enzyme restriction analyses were combined, 29 different profiles were determined, with most profiles (22 profiles) containing only a single strain (Fig. 2). In contrast, seven profiles grouped the remaining 26 strains (e.g., an identical *XB* profile [profile AR₀] was obtained when profiles A₁₀ and R₀, A₅ and R₁, or A₅ and R₀ were combined). Seven main patterns were observed, with pattern AR ($n = 33$) being found the most frequently. Profile AR₀ ($n = 7$) was present only among monophasic isolates. Subtypes AR₁ to AR₁₂ were closely related to subtype AR₀ (similarity, >85%), and subtypes AR₁₃ and AR₁₄ were possibly related to subtype AR₀ (similarity, >76% and $\leq 85\%$). Patterns AT, AV, BT, BV, CS, and CT grouped a total of 15 strains into 14 different profiles and were observed only among serovar Typhimurium or serovar 4,5,12:i- isolates. Among the 33 isolates with pattern AR were all 23 isolates with a monophasic serovar and 10 serovar Typhimurium isolates. Of these 10 serovar Typhi-

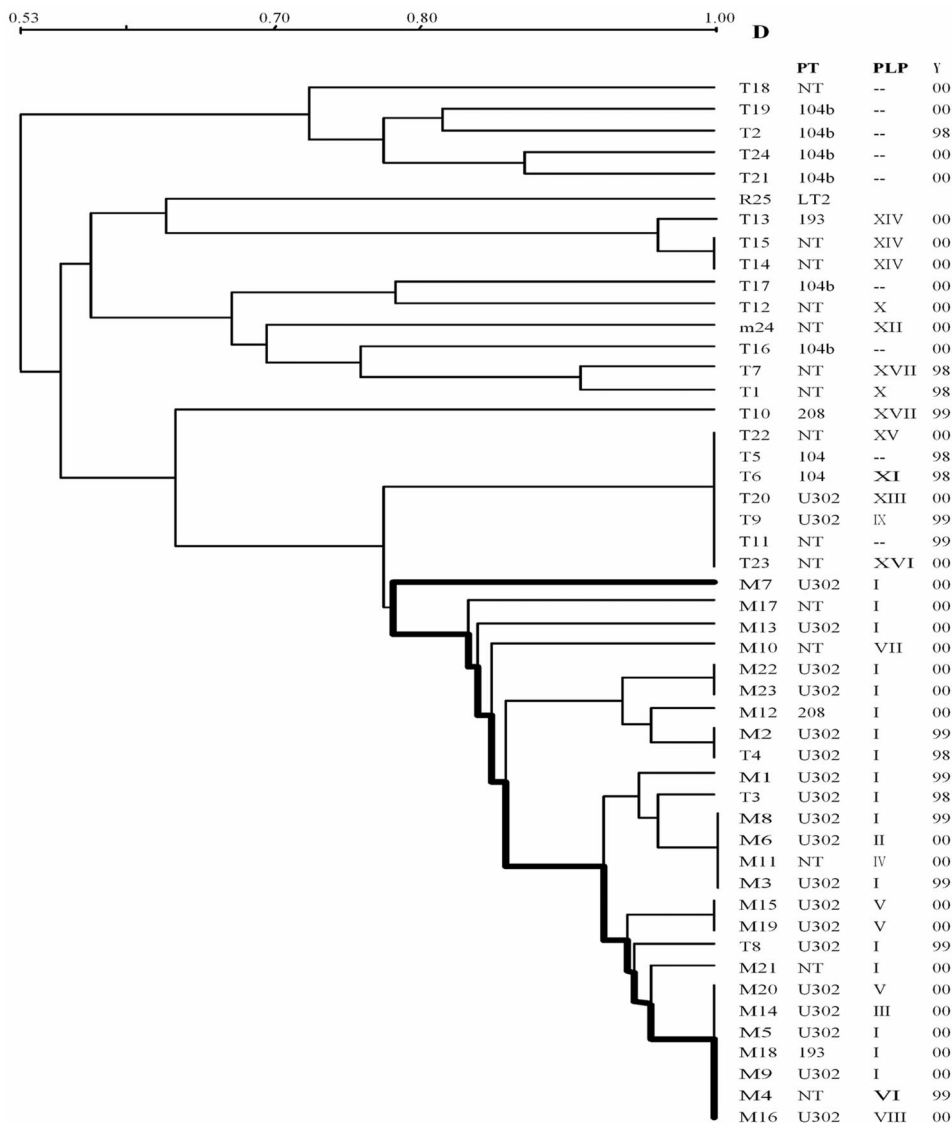


FIG. 2. Average linkage (UPGMA) dendrogram showing results of combined PFGE pattern cluster analysis (combined *XB* profiles) generated by *S. enterica* serovar Typhimurium (T_n), *S. enterica* serovar 4,5,12:i:- (M_n), *S. enterica* serovar 4,5,12:i:- (m_{24}), and *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 (R_{25}). D, similarity coefficient; PT, phage type; PLP, plasmid profile; Y, year of isolation.

murium isolates, 3 (isolates T3, T4, and T8) belonged to the same monophasic cluster, and 7 shared a common *XB* profile, profile AR₁₄, that was found only among serovar Typhimurium isolates.

Isolates with the combined type BV profiles corresponded to the three multiresistant but chloramphenicol-susceptible serovar Typhimurium isolates included in the study.

Plasmid profiling yielded 19 patterns, with pattern I being the most common ($n = 17$). Thirteen type I isolates belonged to phage type U302: 10 serovar 4,5,12:i:- isolates and 3 serovar Typhimurium isolates (isolates T3, T4, T8). All isolates with plasmid profile I also corresponded to PFGE A_nR_n combinations (Fig. 3). Nine serovar Typhimurium isolates had no detectable plasmids, but no relationship could be established between this fact and any other data collected in the study.

DISCUSSION

During the last 15 years, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium has been ranking second place among the human and nonhuman *Salmonella* isolates most frequently isolated in Spain (6, 20). Most of these serovar Typhimurium isolates have a common R-ACSSuT pattern and predominantly belong to phage types DT104, DT104b, and DT U302. In 1997, a new serovar with the antigenic formula 4,5,12:i:- emerged and since then has been increasing in frequency. Isolates with this serovar have been associated with swine and pork products (5, 21, 22) and in many cases are classified in the DT U302 phage type (5, 6, 7, 8, 20). In our study, 70% of the 4,5,12:i:- isolates were phage type DT U302, a value higher than that reported previously (21, 22, 23). However, direct comparison with data from other reports may be biased because of the different sampling criteria used.

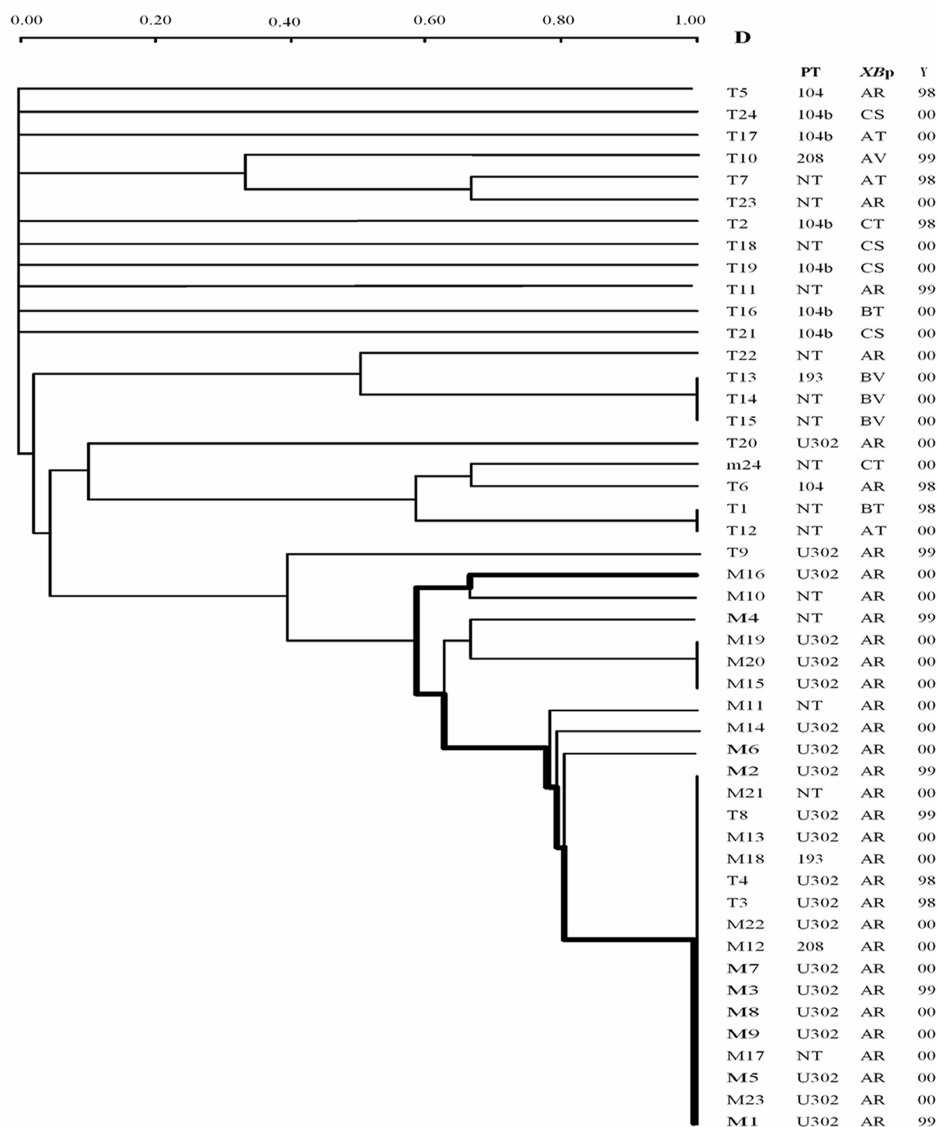


FIG. 3. Average linkage (UPGMA) dendrogram showing results of plasmid profile cluster analysis generated by *S. enterica* serovar Typhimurium (T_n), *S. enterica* serovar 4,5,12:i- (M_n), and *S. enterica* serovar 4,5,12:- (m₂₄). D, similarity coefficient; PT, phage type; XBp, combined PFGE profiles (*Xba*I plus *Bln*I); Y, year of isolation.

It has been suggested that there is a close relationship between serovars Typhimurium and 4,5,12:i-. Thus, serovar 4,5,12:i- isolates belonging to the DT U302 phage type and having resistance pattern R-ACSSuT-GSxT are thought to be a variant of serovar Typhimurium and lack the second-phase flagellar antigen encoded by *fljB* (6). However, no information that links other phage types or strains with a different resistance pattern to serovar Typhimurium is available.

When PFGE results were evaluated by using the combined XB profiles, a total of 33 isolates of 48 tested had the AR pattern. Of the 33 isolates with an AR_n profile, 23 were monophasic strains sharing more than 85% similarity; isolate M7, however, had 76% similarity. Our results demonstrate that there is a high percentage of similarity among the AR subtypes, while a very degree of high variability is observed among the six patterns that group the remaining 15 isolates. Taking into account the fact that the possible number of profiles in-

creases when two enzymes are combined, our results strongly indicate that the monophasic isolates are part of a clonal lineage or at least have a close common ancestor.

Regarding the method used in this study, the profiles obtained with enzymes *Xba*I and *Bln*I alone resolved three and four groups, respectively, with numerous variants. It seems that analysis with the XB combination had a higher discriminatory power than analysis with a single enzyme. As our results demonstrate, if appropriate enzymes are combined, thus yielding an adequate number of restriction fragments, the analysis method of Tenover et al. (19) can also be used to type strains recovered over relatively extended periods of time.

The monophasic cluster included three serovar Typhimurium DT U302 strains: strains T3 and T4, isolated in 1998, and strain T8, isolated in 1999. These strains had an R-ACSSuT-GSxT pattern, which was predominant among the 4,5,12:i- isolates that we studied. In addition, they shared the same

plasmid profile observed for the monophasic strains but not any of the other serovar Typhimurium isolates. This fact supports the theory that DT U302 isolates are closely related, regardless of whether they are serovar Typhimurium or monophasic.

Furthermore, in a cluster of seven serovar Typhimurium isolates with approximately 78% similarity to the monophasic strains, two isolates (isolates T5 and T6) were phage type DT104 and were isolated in 1998. When only those isolates sharing more than 78% similarity to 4,5,12:i:- strains are considered putative ancestral candidates and when the year of isolation is taken into account, it can be seen that in 1998 (the first year in which isolates were studied) the criterion of more than 78% similarity is fulfilled by only two serovar Typhimurium DT104 isolates and two serovar Typhimurium DT U302 isolates.

According to the *XB* profile results and, more specifically, according to the AR profile assigned to serovar Typhimurium, we observed the same AR₁₄ subtype in all but three isolates (isolates T3, T4, and T8). This subtype was not identified among our monophasic isolates. The AR₁₄ subtype was periodically encountered during the 3 years of this study and both serovar Typhimurium DT104 isolates recovered in 1998 had the AR₁₄ subtype.

As a consequence and by taking into account the close relationship that exists between phage types DT104 and DT U302 (16), one logical hypothesis that can be inferred is that monophasic strains, regardless of their phage type or antibiotic resistance pattern, originate from serovar Typhimurium DT U302 strains, such as the T3 and T4 isolates that we studied. If this could be demonstrated with 4,5,12:i:- strains of other geographical origins, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar 4,5,12:i:- should no longer be classified as such but should be classified as a monophasic *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium DT U302 variant.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been funded by the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain (project AGF99-1234).

REFERENCES

- Anderson, E. S., L. R. Ward, M. J. Saxe, and J. D. de Sa. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. J. Hyg. 78:297-300.
- Baggesen, D. L., D. Sandvang, and F. M. Aarestrup. 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. J. Clin. Microbiol. 38:1581-1586.
- Callow, B. R. 1959. A new phage-typing scheme for *Salmonella typhimurium*. J. Hyg. Camb. 57:346-359.
- Carattoli, A., F. Tosini, and P. Visca. 1998. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium infections. N. Engl. J. Med. 339:921-922.
- 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, *flj*-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. 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. González-Hevia, and M. C. Mendoza. 2000. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. FEMS Microbiol. Lett. 190:341-347.
- Guerra, B., S. M. Soto, J. M. Argüelles, and M. C. Mendoza. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1305-1308.
- Kariuki, S., J. Cheesbrough, A. K. Mavridis, and C. A. Hart. 1999. Typing of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi C isolates from various countries by plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 37:2058-2060.
- Kariuki, S., J. O. Oundo, J. Muyodi, B. Lowe, E. J. Threlfall, and C. A. Hart. 2000. Genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from two regions of Kenya. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29:9-13.
- Liu, S. L., and K. E. Sanderson. 1991. A physical map of the *Salmonella typhimurium* LT2 genome made by using *Xba*I analysis. J. Bacteriol. 174:1662-1672.
- Mateu, E. M., M. Martín, L. Darwich, W. Mejía, N. Frías, and F. J. García Peña. 2002. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from swine in Catalonia, Spain. Vet. Rec. 150:147-150.
- Popoff, M. Y., and L. Le Minor. 1997. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. WHO Collaborating Centre for Reference Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France.
- Powell, N. G., E. J. Threlfall, H. Chart, and B. Rowe. 1994. Subdivision of *Salmonella enteritidis* PT 4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. FEMS Microbiol. Lett. 119:193-198.
- Pritchett, L. C., M. E. Konkel, J. M. Gay, and T. E. Besser. 2000. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. J. Clin. Microbiol. 38:3484-3488.
- Ridley, A. M., E. J. Threlfall, and B. Rowe. 1998. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 36:2314-2321.
- Smith, C. L., S. R. Klco, and C. R. Cantor. 1988. Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules, p. 41-72. In K. Davis (ed.), *Genome analysis: a practical approach*, IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233-2239.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diez, M. de la Fuente, F. Gutierrez, R. Cerdán, and A. Echeita. 2000. Análisis de las cepas de *Salmonella spp* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 1999 (I). Bol. Epidemiol. Semanal. 8:45-48.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diez, M. de la Fuente, F. Gutierrez, R. Cerdán, and A. Echeita. 2000. 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.
- Usera, M. A., A. Aladueña, R. Diez, M. de la Fuente, F. Gutierrez, R. Cerdán, M. Arroyo, R. González, and A. Echeita. 2001. Análisis de las cepas de *Salmonella spp* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 2000 (I). Bol. Epidemiol. Semanal. 9:221-224.
- van Belkum, A., M. Struelens, A. de Visser, H. Verbrugh, and M. Tibayrenc. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. Clin. Microbiol. Rev. 14:547-560.
- Wong, K. K., and M. McClelland. 1992. A *Bln*I restriction map of the *Salmonella typhimurium* LT2 genome. J. Bacteriol. 174:1656-1661.

4.2 Estudio 2:

“Use of biochemical kinetic data to determine strain relatedness among *Salmonella enterica* subsp *enterica* isolates”

Journal of Clinical Microbiology 43(11): 5419-5424

Use of Biochemical Kinetic Data To Determine Strain Relatedness among *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Isolates

E. de la Torre,^{1*} M. Tello,^{1,2} E. M. Mateu,^{1,2} and E. Torre¹

Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain,¹ and Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain²

Received 31 March 2005/Returned for modification 14 May 2005/Accepted 13 August 2005

Classical biotyping characterizes strains by creating biotype profiles that consider only positive and negative results for a predefined set of biochemical tests. This method allows *Salmonella* subspecies to be distinguished but does not allow serotypes and phage types to be distinguished. The objective of this study was to determine the relatedness of isolates belonging to distinct *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes by using a refined biotyping process that considers the kinetics at which biochemical reactions take place. Using a Vitek GNI+ card for the identification of gram-negative organisms, we determined the biochemical kinetic reactions (28 biochemical tests) of 135 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains of pig origin collected in Spain from 1997 to 2002 (59 *Salmonella* serotype Typhimurium strains, 25 *Salmonella* serotype Typhimurium monophasic variant strains, 25 *Salmonella* serotype Anatum strains, 12 *Salmonella* serotype Tilburg strains, 7 *Salmonella* serotype Virchow strains, 6 *Salmonella* serotype Choleraesuis strains, and 1 *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:–:– strain). The results were expressed as the colorimetric and turbidimetric changes (in percent) and were used to enhance the classical biotype profile by adding kinetic categories. A hierarchical cluster analysis was performed by using the enhanced profiles and resulted in 14 clusters. Six major clusters grouped 94% of all isolates with a similarity of $\geq 95\%$ within any given cluster, and eight clusters contained a single isolate. The six major clusters grouped not only serotypes of the same type but also phenotypic serotype variations into individual clusters. This suggests that metabolic kinetic reaction data from the biochemical tests commonly used for classic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* biotyping can possibly be used to determine the relatedness between isolates in an easy and timely manner.

Salmonella enterica subsp. *enterica* is responsible for the vast majority of cases of salmonellosis in mammals. Classification of isolates belonging to this subspecies is usually achieved by serotyping and phage typing (3, 18). Further determination of relatedness between strains most often requires the application of molecular biology techniques, particularly when the epidemiological relatedness among isolates is to be ascertained (1, 2, 10, 14, 16). However, this is not required for most clinical or surveillance purposes; and determination of serotypes, phage types, and antimicrobial resistance patterns is still of major importance (4, 8, 15). Even though these classification methods are used worldwide, they are tedious and not routinely performed by all laboratories.

Biochemical profiling is a fast and accurate method for the identification of bacteria when it is performed with an automated system, but it is commonly disregarded as a means of grouping *Salmonella* isolates because most serotypes within a given subgroup display a very uniform biochemical reaction profile. For instance, for *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, only serotypes Typhi, Paratyphi A, Choleraesuis, Gallinarum, and Pullorum have a distinct biochemical behavior (9). It has, however, been demonstrated that serotype Typhimurium variants that have been categorized by means of phage typing can

be further differentiated by means of certain biotyping methods (6, 18).

Until now, biochemical profiling has relied on a set of biochemical tests for which a given serotype or isolate can yield either a positive or a negative result after a given incubation time. This approach, although proven and very valuable, does not take into account the rate or the kinetics with which the biochemical reaction takes place and thus neglects a circumstance that can be of biological relevance. For example, from an ecological perspective, the amount of time that an isolate requires to transform or to use a metabolic substrate may influence whether or not it can establish itself in a new niche, namely, in the gut of an animal. The time that bacteria require to complete a growth cycle is a variable that depends on many factors, both nutritional and genetic (11). If nutritional factors do not vary and environmental conditions are constant, only genetic factors should be of relevance when the behavior of microbial growth is studied. We assume that bacteria should then demonstrate a specific metabolic kinetic profile, taking into consideration characteristics such as their ability to adapt to the environment by making only those gene products that are essential for their survival, as well as their ability to develop sophisticated mechanisms to regulate metabolic pathways.

We examined the kinetics of 28 biochemical tests commonly used to identify members of the family *Enterobacteriaceae* for 135 *Salmonella* isolates using an automated biotyping system (Vitek). This system, in conjunction with the GNI+ card, provides stable environmental conditions and culture media and yields periodic readings of metabolic changes. The objective of

* Corresponding author. Mailing address: Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Phone: 34935811046. Fax: 34935813297. E-mail: eugenia.delatorre@uab.es.

TABLE 1. Results of metabolic tests obtained by using Vitek GNI+ system after examination of 135 *Salmonella enterica* isolates of pig origin

Test ^a	% of strains examined in the following metabolic category ^b :				
	Very fast (1)	Fast (2)	Slow (3)	Very slow (4)	Negative (0)
2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxy-diphenylether resistance	0	0	0	0	100
Polymyxin B resistance	0	0	0	0	100
Oxidative metabolism of:					
Glucose	69	23	6	1	1
Lactose	0	0	0	0	100
Maltose	91	3	4.5	0	1.5
Mannitol	30.5	54	11	4.5	0
Xylose	29	50	4.5	0	16.5
Fermentative metabolism of:					
Raffinose	0	0	0	0	100
Sorbitol	23	6	64.5	5.5	1
Sucrose	0	0	0	0	100
Inositol	0	0	0	50 ^c	50
Adonitol	0	0	0	0	100
Glucose in presence of <i>p</i> -coumaric acid	22	65	12	1	0
Rhamnose	7.5	75.5	11	1.5	4.5
L-Arabinose	28	47	17	2	6
Glucose	27.5	71	1.5	0	0
Use of:					
Acetamide	0	0	0	0	100
Citrate	44.5	50	1.5	0	4
Malonate	0	0	0	0	100
Esculin hydrolysis	0	0	0	0	100
Indoxyl- β -D-glucoside metabolism	0	0	0	0	100
Urease	0	0	0	0	100
Tryptophan deaminase	0	0	0	0	100
β -Galactosidase	0	0	0	0	100
Arginine dihydrolase	11	51	30	8	0
Lysine decarboxylase	12.5	10.5	1.5	73.5	2
Ornithine decarboxylase	30.5	60	9.5	0	0
Hydrogen sulfide (H ₂ S) production	43	30.5	21.5	0	5

^a The GNI+ card contains 30 biochemical tests, whereas 2 tests are used for control purposes (growth and decarboxylase enzyme).

^b Categories established according to isolates kinetic reaction to 28 biochemical tests. The numbers in parentheses represent the category numbers described in Materials and Methods.

^c As inositol results are not reproducible and the positive or negative reaction for all tests cannot be determined until 10 h, all positive tests are categorized as very slow.

this study was to determine if metabolic kinetic data can be used to biotype isolates with a higher discriminatory power than the classical biotyping method, allowing rapid determination of strain relatedness.

MATERIALS AND METHODS

Salmonella strains. One hundred thirty-five *Salmonella* strains isolated from pig samples (from 1997 to 2002) were randomly chosen from a bacterial collection kept at the Veterinary Faculty of the Universitat Autònoma de Barcelona. All except one of the isolates originated from Spain; a single *Salmonella* serovar Choleraesuis isolate came from Germany. The resulting serotype distribution was as follows: serotype Typhimurium ($n = 59$), monophasic serotype Typhimurium strains (4,5,12:i:- ($n = 25$), serotype Anatum ($n = 25$), serotype Tilburg ($n = 12$), serotype Virchow ($n = 7$), serotype Choleraesuis ($n = 6$), and serotype

4,5,12:i:- ($n = 1$). The 59 serotype Typhimurium isolates included phage types DT 104b ($n = 11$), DT 104 ($n = 6$), DT U302 ($n = 6$), DT 208 ($n = 4$), DT 193 ($n = 2$), DT 41 ($n = 2$), DT 110 ($n = 1$), and nontypeable ($n = 27$). The 25 monophasic variant serotype 4,5,12:i:- isolates included phage types DT U302 ($n = 17$), DT 208 ($n = 1$), DT 193 ($n = 1$), DT 120 ($n = 1$), as well as nontypeable isolates ($n = 5$). This distribution is roughly representative of the serotypes isolated in our laboratory from 1997 to 2002. All isolates were epidemiologically unrelated and originated from different farms, and some had been used in previous studies (5, 12).

Culture and biochemical data. Selected isolates were seeded onto blood agar and incubated for 24 h at 37°C. A 1.0 McFarland suspension was prepared by turbidimetric adjustment in 0.45% sterile saline solution for each isolate. Gram-negative organism identification cards (GNI+; bioMérieux Vitek, Marcy l'Étoile, France) were then inoculated and incubated in a Vitek Jr. system (VJS; bioMérieux). These cards contain 28 biochemical tests (Table 1) plus two additional

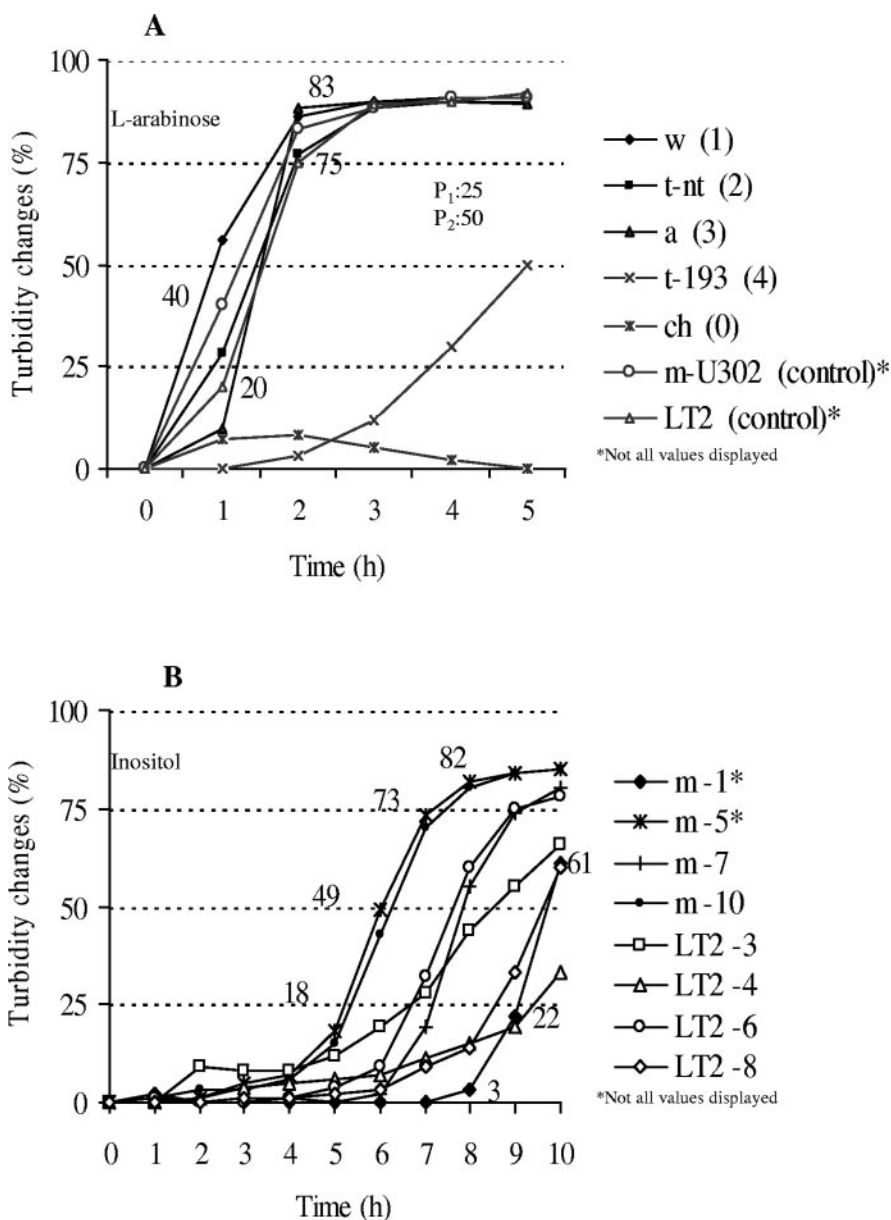


FIG. 1. Results of two biochemical tests displaying the turbidimetric and colorimetric percent changes for *Salmonella enterica* isolates. (A) L-Arabinose fermentation test results for five isolates exemplifying the five categories (shown as abbreviated serotype and phage type) and two control strains; (B) inositol fermentation test results for four replicas of each control strain.

tests for control purposes (growth and decarboxylase enzyme). VJS performed readings of each test by means of a photometric sensor that evaluated the turbidimetric or colorimetric changes and analyzed the data by using bioLiaison software (BioMérieux). The results were expressed as a percentage of transmittance reduction and were compared to the reading at time zero. This process was repeated every 60 min. The final readings were made at 18 h.

Validation of biochemical kinetics reproducibility. Two *Salmonella* strains were used for control purposes: *Salmonella* serotype Typhimurium LT2 (serotype reference strain) and a randomly chosen monophasic serotype Typhimurium variant 4,5,12:i:- isolate. The control strains were analyzed by VJS on two consecutive days (five replicas per day, with each replica originating from a distinct colony). Regression curves (time versus light transmittance change) were calculated for each test and strain. In order to evaluate the reproducibility of the method, the regression curves were statistically compared by curvilinear estimation by using a logarithmic model.

Profiling of biochemical test rates. Since the results obtained with VJS were found to be reproducible based on the criteria established for this study, all isolates were tested only once. According to the recommendations of the manufacturer, a strain was considered positive for a given test if the percentage of turbidimetric or colorimetric change (at 12 h of incubation) was $\geq 25\%$ of that measured from time zero. Tests that were negative for all isolates ($n = 13$) were discarded from further analysis. Raw kinetic data were used to create a correlation matrix by using the similarity distance method via Pearson's coefficient (SPSS Inc., Chicago, IL). By considering a correlation coefficient of 0.80 as a cutoff, SH_2 production, rhamnose fermentation, and citrate utilization were found to be correlated ($r > 0.80$; $P < 0.05$), as were mannitol fermentation and ornithine decarboxylation ($P < 0.05$). Subsequently, only citrate utilization and mannitol fermentation were considered for further analysis. All other tests were considered independent of each other.

Strains were classified according to the time required to reach certain color-

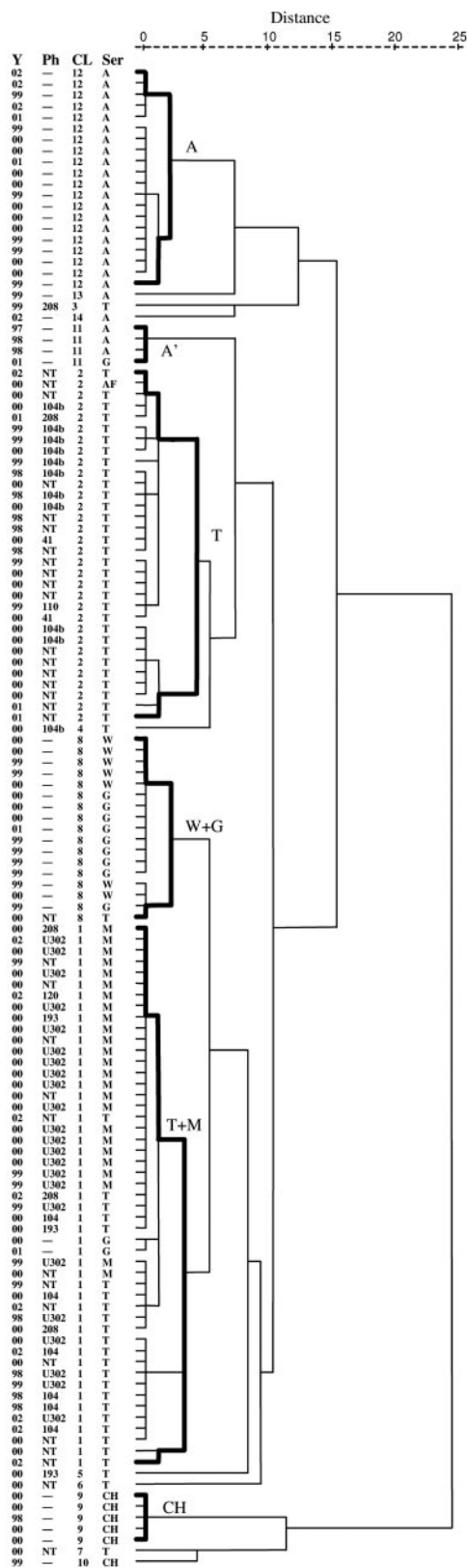


FIG. 2. Dendrogram depicting a hierarchical cluster analysis of 135 isolates originating from *Salmonella enterica* serotypes after being categorized by means of metabolic kinetics. Y, year of isolation; Ph, phage type (displayed only for serovar Typhimurium and the serovar Typhimurium monophasic variant); CL, cluster; Ser, serotype (AF serotype

metric and turbidimetric change rate values. These values, which corresponded to two specific curve points, were chosen according to the results obtained from the two reference strains. The first point corresponded to a colorimetric or turbidimetric change rate range $\geq 25\%$ (the positive cutoff for a given test) and $< 50\%$; the second point corresponded to a change rate $\geq 50\%$ but within the exponential curve phase.

Isolates were categorized in a comparative ranking by using these curve points. Category 1 (Table 1) was assigned to those isolates that reached the $\geq 50\%$ change first. Category 2 was assigned to the isolates that reached the $\geq 50\%$ change in second place, after having reached $\geq 25\%$ change at an earlier time. Category 3 grouped those isolates that reached $\geq 50\%$ change in third place or those that reached $\geq 50\%$ change in second place but that did not reach $\geq 25\%$ change at an earlier time. Category 4 was assigned to isolates that reached $\geq 25\%$ change but that never reached $\geq 50\%$ change or that reached 50% at a very late time in time. Category 0 was assigned to isolates that did not reach a 25% change rate (negative). All possible cases were taken into consideration by using this categorization model (Fig. 1A). For practical purposes, category 1 was named "very fast," category 2 was named "fast," category 3 was named "slow," and category 4 was named "very slow."

Statistical analysis and biotyping. The relationship between isolates was established by using a hierarchical cluster analysis. Clusters were determined by using the average linkage between groups and were calculated by using the squared Euclidian distance method (SPSS v. 12.0). The SPSS application grouped the isolates into 14 clusters based on isolate similarities of $\geq 95\%$. Parallel cluster analyses were performed for control purposes by using points randomly chosen from within the 25% to 40% and 50% to 75% change rate range.

RESULTS

Reproducibility. When the raw percentage data were used, all test results (10 replicas \times 15 positive tests \times 2 sample strains = 300 curves) were reproducible except for inositol fermentation (Fig. 1B). Consequently, inositol fermentation results were categorized as only positive or negative. The intraday reproducibility was very high ($R^2 = 0.97$), while the reproducibility for assays run on different days was somewhat lower ($R^2 = 0.71$). However, when the categories were used, the reproducibility was 1 in both cases.

Biochemical kinetics and categorization time line. The fastest positive reactions were observed for glucose oxidation and fermentation and for mannitol oxidation. For these tests strains could be assigned to a category within 3 h of incubation. Seven other tests (lysine decarboxylation; citrate utilization; L-arabinose, sorbitol, glucose [*p*-coumaric acid] fermentations; and xylose and maltose oxidation) allowed strains to be categorized after 5 to 6 h. Seven hours of incubation was required to categorize the strains for arginine dihydrolase, and 10 h of incubation was required to determine inositol fermentation results.

Clustering and biotyping. Fourteen clusters were created. Six major clusters contained 94% of all isolates ($n = 127$). The serotype distribution within these clusters was as follows: cluster A included 20 serotype Anatum isolates from 1999 or later; cluster A' included 3 serotype Anatum isolates from 1997 and 1998; cluster T included 31 serotype Typhimurium isolates; cluster W+G comprised 1 serotype Typhimurium isolate, 7 serotype Virchow isolates, and 8 serotype Tilburg isolates; cluster T+M included all monophasic serotype Typhimurium

4,5,12:--); A, serovar Anatum; A', old serovar Anatum; T, serovar Typhimurium; W+G, serovars Virchow and Tilburg; T+M, serovar Typhimurium and serovar Typhimurium monophasic variant; CH, serovar Choleraesuis.

variants plus 22 serotype Typhimurium isolates; and cluster CH included 5 of the 6 serotype Choleraesuis isolates, all of which originated in Spain. The other eight clusters each contained a single isolate (Fig. 2).

As far as the most encountered *Salmonella* serotype Typhimurium phage types (104, 104b, and U302) are concerned, their distribution within the six major clusters was as follows: 10 of 11 *Salmonella* serotype Typhimurium 104b isolates were in cluster T, and the other 104b isolate formed a single cluster. Phage types 104 and U302 were found only in cluster T+M ($n = 29$). Nontypeable serotype Typhimurium isolates were found in both clusters T and T+M (18 and 12 isolates, respectively).

The biotype profile for cluster T+M was characterized by very fast or fast kinetics and by being inositol positive. Cluster W+G isolates were also inositol positive. The other four major clusters were inositol negative. Cluster CH displayed a slow or very slow kinetic biotype for most tests. Interestingly, lysine decarboxylase activity was found to be very slow for clusters with a fast profile and very fast for cluster CH isolates.

The similarity of isolates within the same cluster was at least 95%, with the similarity reaching 99% in clusters CH and A'. The similarity within cluster T+M was $\geq 96\%$. This value was higher (98%) when monophasic serotype Typhimurium isolates were considered separately. The similarity between clusters was variable, whereas isolates of the CH cluster were the least similar to isolates of the other major clusters (75%).

The use of alternative curve points, as described in Materials and Methods, produced very similar clustering results, with less than 10% variance in isolate categorization.

DISCUSSION

The identification and reporting of *Salmonella* occurrences is important for surveillance purposes and for the study of outbreaks. Identification is usually accomplished by serotyping and phage typing, which is not routinely done by all laboratories. Finding a method that can tentatively place an isolate in an epidemiological context expeditiously and with an acceptable degree of accuracy would be very useful. The goal of this study was to evaluate a biotyping method that uses biochemical kinetic data obtained from an automated system which yields results in 12 h to 18 h. This method is not to be seen as a replacement of existing typing methods but, instead, as an additional means of determining isolate relatedness in a timely manner.

Classical biotyping considers two categories for each test, positive or negative, and can only differentiate *Salmonella* subspecies or very distinct serotypes (serotypes Typhi, Paratyphi A, Choleraesuis, Gallinarum, and Pullorum). Classification of isolates according to their rate of biochemical activity instead of the consideration of only positive or negative results may enhance the discriminatory power of biotyping and might reveal characteristics of ecological or epidemiological importance.

The conduct of a comparative kinetic study of 135 isolates—consisting of 28 biochemical tests per isolate—required the reproducibility of the results as well as a method that could be used to compare the resulting curves for a specific test type (22). In our study the first requirement was fulfilled by using

JVS, an automated system that has proven to be accurate (13, 19, 23), guarantees stable test conditions (Vitek system and GNI+ cards), and provides reproducible test results ($R^2 = 0.97$), according to the criteria defined for this study, as described in Materials and Methods.

In order to find the best possible typing method, we first had to determine an algorithm that matched the resulting curves ($>2,000$ curves). After examination of the curves, it became clear that a different algorithm would be required for each test, and sometimes even within the same test, resulting in an enormous amount of data that would be impossible to manage. As a consequence, it was decided that only the exponential phases of the curves were of relevance and that these could be approximated by using two control points within this phase: the cutoff point and a second point that represents a higher degree of change. Even though the two points for a certain test type were arbitrarily chosen, a parallel cluster analysis displayed that the resulting correlation between isolates was practically identical, as long as the points were within this predefined range.

All strains were previously categorized by using serotyping and phage typing methods. Comparison of those results to the results obtained by use of the enhanced biochemical profiles confirmed that this method has a high discriminatory power. For example, *Salmonella* serotype Typhimurium phage types 104 and U302 and phage type 104b were allocated into two distinct groups, respectively. These three phage types are the most frequently encountered in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates, whereas phage type U302 is the most commonly found in the serotype Typhimurium monophasic variant 4,5,12:i:- (7, 20, 21). Previous studies have already reported that phage types 104 and U302 are closely related (17), while phage types 104 and 104b are less related (5). This method, however, was not able to discriminate between isolates belonging to *Salmonella* serotypes Virchow and Tilburg. Closer examination showed that their biochemical kinetic profiles differed only in a single test category (arginine dihydrolyase) and that this difference was not significant enough to separate the isolates.

Enhancement of the kinetic profile by the addition of additional biochemical tests might increase the discriminatory power of our method, allowing it to distinguish between isolates of distinct serotypes. It cannot be discounted that this might also disperse the results, making their interpretation less clear, even though the correlation between our results and the results obtained by serotyping and phage typing suggest otherwise; this will have to be evaluated by further studies.

In conclusion, we believe that our results and the potential of this method merit further studies and believe that this line of study should include an increased number of strains and biochemical tests. Should these studies validate our method, it can possibly be used to rapidly establish relationships between *Salmonella* isolates in an outbreak scenario.

ACKNOWLEDGMENT

This study was funded in part by project AGF99-1234 of the Spanish Ministry of Education and Science.

REFERENCES

1. Agasan, A., J. Kornblum, G. Williams, C. Pratt, P. Fleckenstein, M. Wong, and A. Ramon. 2002. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspe-

- cies I) serotype 4,5,12:i- strains causing food-borne infections in New York City. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1924-1929.
2. 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.
 3. Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2465-2467.
 4. Centers for Disease Control and Prevention. 2004. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2003. Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga.
 5. de la Torre, E., D. Zapata, M. Tello, W. Mejía, N. Frias, F. J. Garcia Peña, E. M. Mateu, and E. Torre. 2003. Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i- phage types isolates from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2395-2400.
 6. Duguid, J. P., E. S. Anderson, G. A. Alfredsson, R. Barker, and D. C. Old. 1975. A new biotyping scheme for *Salmonella typhimurium* and its phylogenetic significance. *J. Med. Microbiol.* **8**:149-166.
 7. 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.
 8. Echeita, M. A., A. Aladueña, R. Díez, M. Arroyo, F. Cerdán, R. Gutiérrez, M. de la Fuente, R. González-Sanz, S. Herrera-León, and M. A. Usera. 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.
 9. Farmer, J. J., III, B. R. Davis, F. W. Hickman-Brenner, A. McWhorter, G. P. Huntley-Carter, M. A. Asbury, C. Riddle, H. G. Wathen-Grady, C. Elias, G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, C. M. O'Hara, G. K. Morris, P. B. Smith, and D. J. Brenner. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**:46-76.
 10. Lawson, A. J., J. Stanley, E. J. Threlfall, and M. Desai. 2004. Fluorescent amplified fragment length polymorphism subtyping of multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4843-4845.
 11. Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 1996. Brock biology of microorganisms, 8th ed. Prentice-Hall College Division, Upper Saddle River, N.J.
 12. Mateu, E. M., M. Martin, L. Darwich, W. Mejía, N. Frias, and F. J. Garcia Peña. 2002. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from swine in Catalonia, Spain. *Vet. Rec.* **150**:147-150.
 13. O'Hara, C. M., F. C. Tenover, and J. M. Miller. 1993. Parallel comparison of accuracy of API 20E, Vitek GNI, MicroScan Walk/Away Rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/NF for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and common gram-negative, non-glucose-fermenting bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **31**:3165-3169.
 14. Old, D. C., S. C. Rankin, and P. B. Crichton. 1999. Assessment of strains relatedness among *Salmonella* serotypes Salinatis, Duisburg, and Sandiego by biotyping, ribotyping, IS200 fingerprinting, and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1687-1692.
 15. Petersen, A., F. M. Aarestrup, F. J. Angulo, S. Wong, K. Stohr, and H. C. Wegener. 2002. WHO global salm-surv external quality assurance system (EQAS): an important step toward improving the quality of *Salmonella* serotyping and antimicrobial susceptibility testing worldwide. *Microb. Drug Resist.* **8**:345-353.
 16. Porwollik, S., E. F. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor, and M. McClelland. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J. Bacteriol.* **186**:5883-5898.
 17. Pritchett, L. C., M. E. Konkel, J. M. Gay, and T. E. Besser. 2000. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3484-3488.
 18. Rabsch, W., H. L. Andrews, R. A. Kingsley, R. Prager, H. Tschäpe, L. G. Adams, and A. J. Bäumer. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect. Immun.* **70**:2249-2255.
 19. Rhoads, S., L. Marinelli, C. A. Imperatrice, and I. Nachamkin. 1995. Comparison of MicroScan WalkAway system and Vitek system for identification of gram-negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3044-3046.
 20. Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díez, M. De la Fuente, F. Gutiérrez, R. Cerdán, and A. Echeita. 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.
 21. Usera, M. A., A. Aladueña, R. Díez, M. de la Fuente, F. Gutiérrez, R. Cerdán, M. Arroyo, R. González, and A. Echeita. 2001. Análisis de las cepas de *Salmonella spp* aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 2000 (I). *Bol. Epidemiol. Semanal.* **9**:221-224.
 22. van Belkum, A., M. Struelens, A. de Visser, H. Verbrugh, and M. Tibayrenc. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:547-560.
 23. Woo, P. C. Y., A. M. Y. Fung, S. S. Y. Wong, H. W. Tsoi, and K. Y. Yuen. 2001. Isolation and characterization of a *Salmonella enterica* serotype Typhi variant and its clinical and public health implications. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1190-1194.

5. DISCUSION

El comercio mundial de animales de abasto, subproductos animales y alimentos en general, así como el constante movimiento de personas entre distintos países, obliga a organismos como la OMS, la FAO, y en general a los gobiernos de todo el mundo a desarrollar mecanismos de vigilancia de enfermedades, tanto por las implicaciones sanitarias de las mismas, como por las posibles pérdidas económicas que pueden suponer en la industria animal y alimentaria.

La salmonelosis es la toxiinfección alimentaria transmitida a través de productos y subproductos de origen animal más importante en los países desarrollados. Esta es la razón principal por la cual *Salmonella* es motivo de estudio y vigilancia en todo el mundo, además de por la aparición de un número cada vez mayor de serotipos y cepas multirresistentes. Concretamente, *Salmonella* Typhi y Paratyphi, principales causantes de la fiebre entérica, han quedado circunscritas principalmente a países en vías de desarrollo, donde los sistemas de tratamiento de aguas de consumo son precarios y en los que no se dispone de una buena higiene alimentaria. *Salmonella* Paratyphi, por ejemplo, se confirma como serotipo endémico en muchos de estos países (Goh *et al.*, 2002). En general, la prevención y control de *Salmonella* se lleva a cabo mediante la minimización de los factores de riesgo que facilitan su aparición, tanto en explotaciones animales, como posteriormente en la industria alimentaria, ya sea a nivel de la fabricación o del producto final.

La vigilancia epidemiológica de *Salmonella* requiere de métodos de identificación y caracterización adecuados, que puedan ser útiles para establecer relaciones de similitud entre las cepas aisladas y detectar así, el origen de brotes epidémicos, permitiendo realizar un seguimiento comparable a nivel mundial.

En los laboratorios de diagnóstico en España, así como en los de la mayoría de países, se lleva a cabo de forma rutinaria el aislamiento y posterior identificación de *Salmonella* mediante la determinación del perfil bioquímico. Los métodos automatizados han mejorado tanto la eficacia como la fiabilidad de los resultados. Así mismo, el perfil de antibiorresistencia se confirma como una práctica rutinaria en la mayoría de estos laboratorios. El serotipado, sin embargo, se lleva a cabo sólo en laboratorios especializados y de referencia. Esto se traduce en una demora importante

dentro del proceso de caracterización de cepas de *Salmonella*. El poder de discriminación del serotipado, además, es muy limitado en estudios epidemiológicos. Mediante ésta técnica, siguiendo el esquema de Kauffmann y White, ha sido posible describir un total de 2.541 serotipos distintos hasta el año 2002 (CDC, 2004). De éstos, aproximadamente 1500 pertenecen a *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (ó subgrupo I), que representan a la mayoría de los serotipos aislados en mamíferos. Sin embargo, sólo 2 serotipos, Enteritidis y Typhimurium constituyen el 75% de la media de aislamientos en clínica humana en España (Echeita *et al.*, 2005), y casi el 80% de la media estimada a nivel mundial (Galanis *et al.*, 2004). En clínica veterinaria, la frecuencia de aislamientos de estos 2 serotipos es menor, aunque oscila entre valores del 35 al 50% tanto a nivel mundial como estatal (Frutos *et al.*, 2005). Además, en el caso concreto de España, más del 90% de los aislamientos en clínica humana pertenecen a 4 serotipos distintos, habiendo adquirido mucha importancia la variedad monofásica 4,5,12:i:- en los últimos años desde su aparición en 1997 (Usera *et al.*, 2000, 2001), aunque se aprecia un ligero descenso a partir de 2001 (Echeita *et al.*, 2005).

El fagotipado tampoco se lleva a cabo de forma rutinaria en todos los laboratorios. Posee también un poder de discriminación insuficiente, tal y como queda reflejado en el hecho de que, en el serotipo Enteritidis, más del 80% del total de aislamientos en España, pertenecen a 4 fagotipos distintos (1, 4, 6A y 6) y menos del 4% del total de cepas son no tipables (NT) o tienen un patrón no reconocido (PNR). Así mismo, y para el serotipo Typhimurium, 4 fagotipos distintos (104, 104b, U302, 193) representan a casi el 50% del total de aislamientos, con más del 35% de cepas NT y PNR. Es interesante destacar que la mayoría de los aislamientos de la variante monofásica del serotipo Typhimurium pertenecen al fagotipo U302. Parece ser, además, que existe una tendencia geográfica en la frecuencia de aparición de ciertos fagotipos (Liébana *et al.*, 2002).

La determinación del perfil de antibiorresistencia se lleva a cabo prácticamente de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico y la del perfil plasmídico se confirma como metodología casi obligada para la caracterización de cepas en estudios epidemiológicos, sobre todo para ciertos serotipos. Ambas proporcionan una

información de gran valor y son útiles para apoyar la tesis de una posible relación entre cepas, establecida mediante distintos métodos de caracterización genética, que impliquen un estudio a nivel cromosómico.

Varios autores han puesto de manifiesto la eficacia de los distintos métodos de caracterización epidemiológica descritos hasta el momento, basándose en los resultados de estudios comparativos previos (Olsen *et al.*, 1994, Olive *et al.*, 1999, van Belkum *et al.*, 2001, Liébana, 2002). Van Belkum *et al.*, por ejemplo, elaboraron en 2001 una relación puntuada de los métodos de tipificación microbiológica más utilizados hasta ese momento, destacando de cada uno de ellos su capacidad de discriminación, su tipabilidad, además de su reproducibilidad. También se consideraban características tales como el coste económico de la técnica, la accesibilidad de los sistemas necesarios para llevarla a cabo, del instrumental y los materiales en general. Por otro lado se tuvieron en cuenta tanto el factor tiempo, como la necesidad de personal cualificado y la facilidad de interpretación de los resultados.

En general, la aproximación más eficaz para el estudio epidemiológico continúa siendo la combinación de métodos fenotípicos y genotípicos: los primeros nos darán una caracterización inicial de las cepas en estudio y los segundos nos permitirán una aproximación al origen de estas cepas. La combinación únicamente de métodos moleculares no supone una gran ventaja en cuanto a resultados y sí incrementa tanto el tiempo como el coste económico del estudio de forma considerable. En el caso concreto de *Salmonella*, diversos autores recomiendan utilizar la técnica de la electroforesis en campo pulsado como marcador molecular cromosómico de elección (Swaminathan *et al.*, 2001, Liébana, 2002, Peters *et al.*, 2003), en combinación con métodos de caracterización fenotípica y el perfil plasmídico.

Cuando en el año 1997 se aisló en España el nuevo serotipo monofásico de *Salmonella* de fórmula antigénica 4,5,12:i:-, se llevaron a cabo desde un principio diversos estudios epidemiológicos (Echeita *et al.*, 1999, Guerra *et al.*, 2000, Echeita *et al.*, 2001, Garaizar *et al.*, 2002,) con el fin de establecer su posible origen. Los resultados obtenidos en estudios a partir de muestras clínicas humanas, apuntaban a una variedad monofásica del serotipo Typhimurium. También en nuestro laboratorio de diagnóstico comenzamos a aislar *Salmonella* 4,5,12:i:- en el año 1998, a partir de

muestras de cerdo, incrementándose considerablemente la frecuencia de aislamientos hasta el año 2001, a partir del cual se observó también un ligero descenso. Esto motivó el estudio de estas cepas para determinar su posible origen y relación con cepas del serotipo Typhimurium, aisladas durante el mismo periodo.

El 70% de los aislamientos estudiados pertenecían al fagotipo U302, siendo éste un valor por encima del observado en estudios anteriores, que situaban la frecuencia de este fagotipo alrededor del 55% (Usera *et al.*, 2001). Sin embargo, estas diferencias podrían ser el resultado de los sesgos introducidos por los distintos criterios de muestreo. A su vez, un 67% de las cepas monofásicas seguían mayoritariamente un perfil R-ACSSuT (ampicilina, cloramfenicol, estreptomicina, sulfamida y tetraciclina) con una resistencia adicional a la gentamicina y al trimetoprim-sulfametoxazol (R-ACSSuT-GSxT). Este perfil de multirresistencia ya había sido descrito anteriormente en cepas monofásicas (Echeita *et al.*, 1999).

El patrón de restricción obtenido mediante la PFGE en estudios previos estableció similitudes de más del 90% entre cepas monofásicas, cuando se utilizaba únicamente una enzima de restricción (Guerra *et al.*, 2000). Cuando se utilizan 2 enzimas distintas (*XbaI* y *BlnI*) y se combinan los patrones de restricción obtenidos con cada enzima por separado, el perfil resultante de esta combinación (con mayor número de bandas) introduce una mayor variabilidad en el estudio. A pesar de ello, nuestros resultados mostraron que esta técnica agrupaba las cepas monofásicas mediante análisis cluster, con una similitud entre ellas mayor del 85%, exceptuando una sola cepa monofásica con una similitud del 76% respecto a las demás. Estos resultados indican una misma línea clonal o bien, un cercano antecesor común de las cepas. Cabe destacar la existencia de 3 cepas del serotipo Typhimurium incluidas en el estudio que presentaron también, una similitud de más del 85% con las cepas monofásicas. Estas cepas, que fueron aisladas con anterioridad a las monofásicas, pertenecían además al fagotipo U302, disponían de igual perfil plasmídico al de la mayoría de cepas monofásicas y presentaban el perfil de antibiorresistencia típico R-ACSSuT-GSxT de las mismas. Hubo además, siete cepas de *Salmonella* Typhimurium que presentaron una similitud del 75% con las cepas monofásicas. Concretamente, 2 de estas cepas pertenecientes al serotipo Typhimurium DT104 fueron aisladas en el

primer año de estudio. Teniendo en cuenta la estrecha relación existente entre los fagotipos 104 y U302 (Pritchett *et al.*, 2000), así como la relación establecida entre cepas U302 del serotipo Typhimurium y las cepas monofásicas, los resultados sugieren como posibles ancestros de la variedad monofásica a las cepas U302 del serotipo Typhimurium incluidas en nuestro estudio.

Un factor a tener en cuenta en los estudios epidemiológicos y de brotes epidémicos, es el tiempo necesario para establecer relaciones entre las cepas aisladas de muestras clínicas y determinar así el posible origen de las mismas. Una herramienta que establezca de forma preliminar y con cierto grado de fiabilidad estas relaciones sería de gran ayuda. En el estudio anterior, se puso de manifiesto el considerable tiempo invertido tanto para poner a punto algunas técnicas moleculares, como en el caso de la PFGE, como para recopilar resultados de determinadas técnicas fenotípicas (serotipado o fagotipado).

Los métodos de identificación tanto manuales como automáticos de *Salmonella* se basan en la determinación de un perfil bioquímico compatible con el de subespecie. En el caso de los métodos automáticos, disponibles en la mayoría de centros hospitalarios, los resultados de la identificación positiva se dan generalmente antes de las 8 horas. Sin embargo, el uso del perfil bioquímico como marcador epidemiológico de cepas queda descartado, precisamente por la gran estabilidad del mismo dentro de las subespecies de *Salmonella*.

El perfil bioquímico considera sólo dos categorías como resultado para cada una de las pruebas en estudio: positiva y negativa. La determinación de la cinética bioquímica, o ratio de actividad bioquímica, puede considerarse un valor añadido a la información anterior, y puede utilizarse para establecer biotipos, lo que suministraría una información adicional valiosa desde el punto de vista ecológico y epidemiológico. El tiempo que una bacteria necesita para completar un ciclo de crecimiento es una variable que depende tanto de factores nutricionales como genéticos (Madigan *et al.*, 1996). Así, si los factores nutricionales permanecen estables y constantes, los factores genéticos serán relevantes cuando estudiemos el crecimiento y las cinéticas de las reacciones bioquímicas de los microorganismos.

Sistemas automáticos como el Vitek en los que la concentración de sustrato y reactivos es constante y estable, proporcionan lecturas hora a hora del porcentaje de cambio que ha tenido lugar en cada una de las reacciones bioquímicas en estudio (tarjeta GNI+). Esto nos permitirá obtener curvas de actividad bioquímica para cada uno de los sustratos estudiados, así como asignar un valor o categoría a cada resultado, distinto al de positivo/negativo.

Los resultados observados respecto al biotipo, han permitido detectar cierto grado de discriminación entre cepas, que a la vez se separan con bastante coherencia cuando se tiene en cuenta la subdivisión proporcionada mediante los métodos de serotipado y fagotipado. Es interesante destacar la agrupación de todas las cepas de la variedad monofásica únicamente con aquellas cepas pertenecientes al serotipo Typhimurium, con las que también se habían relacionado genéticamente en el primer estudio. Además, se mantiene también la agrupación de cepas pertenecientes a los fagotipos 104 y U302, separadas de las cepas del fagotipo 104b.

Aunque las cepas pertenecientes a los serotipos Virchow y Tilburg han permanecido agrupadas en un mismo “cluster”, este sistema de biotipado ha sido capaz de diferenciar otras cepas pertenecientes a serotipos distintos e incluso separar variedades de un mismo serotipo. De esta manera, nos ha permitido separar cepas de distinto origen geográfico del serotipo Choleraesuis y cepas del serotipo Anatum aisladas en años diferentes. Es interesante destacar, no sólo la capacidad del sistema para determinar posibles relaciones entre cepas en estudio, sino también la capacidad de separar aquellas cepas que se sospechan a priori relacionadas entre sí.

6. CONCLUSIONES

1. La selección y combinación adecuada de métodos de caracterización fenotípica y genotípica utilizados en nuestro estudio, nos han permitido concluir el origen común de las cepas monofásicas, pudiendo constatar que nuestros aislamientos monofásicos son en realidad una variedad del fagotipo U302 de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium.
2. Los resultados obtenidos con el sistema de biotipado descrito y su correlación con los observados previamente mediante el serotipado y el fagotipado, confirman el potencial de esta técnica como posible marcador epidemiológico y justifican la necesidad de llevar a cabo nuevos estudios con el fin de validar el método y aumentar su poder de discriminación. En cualquier caso, este método de caracterización debe utilizarse únicamente con el propósito de establecer relaciones entre cepas de forma preliminar.

7. RESUMEN

La salmonelosis es la toxiinfección alimentaria transmitida a través de productos y subproductos de origen animal más importante en los países desarrollados. A esto hay que añadir la aparición de cepas de *Salmonella* multirresistentes debido principalmente al abuso de antimicrobianos en las explotaciones animales. Estos hechos motivan la necesidad del estudio y vigilancia epidemiológica de *Salmonella* en todo el mundo. Para ello se requiere de métodos de identificación y caracterización adecuados, que puedan ser útiles para establecer relaciones de similitud entre las cepas aisladas y detectar así, el origen de brotes epidémicos, permitiendo realizar un seguimiento comparable a nivel mundial.

Cuando en el año 1997 se aisló en España por vez primera la cepa monofásica de *Salmonella* con fórmula antigénica (4,5,12:i:-), se llevaron a cabo diversos estudios epidemiológicos con el fin de establecer su posible origen. Este “nuevo serotipo” presentaba con frecuencia un perfil de multirresistencia R-ACSSuT-GSxT, con fagotipo U302 en más del 55% de los casos. Mediante el uso de distintos métodos de caracterización (la determinación del perfil de restricción mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE), el perfil plasmídico, el de antibiorresistencia y el fagotipo) determinamos la posible relación genética de 48 cepas de *Salmonella enterica* subsp *enterica* procedentes de muestras de cerdo en Cataluña, aisladas en nuestro laboratorio durante el periodo comprendido entre 1998 y 2000. Veintitrés de estas cepas pertenecían a *S. enterica* (4,5,12:i:-), 24 a *S. enterica* serotipo Typhimurium (4,5,12:i:1,2) y una cepa a *S. enterica* (4,5,12:-:-). Después de combinar los perfiles de PFGE, obtenidos con el uso de dos enzimas de restricción distintas (*Xba*I y *Bln*I), se observó que las 48 cepas se agrupaban en 7 patrones de restricción combinados (perfil XB). Los 23 aislamientos del serotipo (4,5,12:i:-) y 10 cepas del serotipo Typhimurium presentaban un mismo patrón. Tres de estas 10 cepas con fagotipo U302 aisladas durante los primeros años del estudio, compartían a su vez el perfil plasmídico y patrón de multirresistencia característico de la cepa monofásica. A partir del análisis de las relaciones entre las cepas del estudio, concluimos que el nuevo serotipo monofásico era en realidad una variedad monofásica del serotipo Typhimurium U302.

Un factor a tener en cuenta en los estudios epidemiológicos y de brotes epidémicos, es el tiempo necesario para establecer relaciones entre las cepas aisladas de muestras clínicas y determinar así, el posible origen de las mismas. Una herramienta que establezca de forma preliminar y con cierto grado de fiabilidad estas relaciones sería de gran ayuda. El perfil bioquímico clásico para la caracterización e identificación de cepas de *Salmonella*, tiene sólo en cuenta los resultados positivos o negativos frente a substratos concretos, utilizados para la identificación de las distintas subespecies del género. Con nuestro segundo estudio determinamos relaciones entre 135 aislamientos de *Salmonella* pertenecientes a varios serotipos, incluyendo cepas de la variedad monofásica, mediante el uso de datos de cinéticas bioquímicas de las pruebas utilizadas para la identificación de subespecies de *Salmonella*. El biotipado permitió obtener seis grandes grupos que incluían al 94% del total de cepas (n=127). El porcentaje de similitud dentro de un mismo grupo era $\geq 95\%$. En algunos de los grupos se observaron no sólo cepas pertenecientes a un mismo serotipo sino también variedades fenotípicas de éstos. Las cepas restantes (n=8), constituían grupos con un único aislamiento. Esto sugiere que los datos de las cinéticas de las reacciones metabólicas utilizadas para identificar y biotipar a las subespecies de *Salmonella enterica*, pueden utilizarse para determinar de forma preliminar relaciones entre aislamientos en un periodo corto de tiempo.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abe K, Saito N, Kasuga F, Yamamoto S (2004) Prolonged incubation period of salmonellosis associated with low bacterial doses. *J Food Prot* 67(12):2735-2740.

Aho M (1992) Problems of *Salmonella* sampling. *Int J Food Microbiol* 15:225-235

Allen KJ, Poppe C (2002) Phenotypic and genotypic characterization of food animal isolates of *Salmonella* with reduced sensitivity to ciprofloxacin. *Microb Drug Resist* 8(4):375-383

Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ, de Sa JD (1977) Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg* 78:297-300

Angulo F (1997) Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium definitive type 104. *Emerg Infect Dis* 3:414

Bager F (1996) Investigation of *Salmonella* prevalence in shell-eggs. *Zoonose-Nyt* 3:7-8

Baggesen DL, Sandvang D, Aarestrup FM (2000) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* 38(4):1581-1586

Batchelor M, Hopkins KL, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, Liebana E (2005) Characterization of AmpC-mediated resistance in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans during the period 1992 to 2003 in England and Wales. *J Clin Microbiol* 43(5):2261-2265

Berends BR, Van Knapen F, Mossel DA, Burt SA, Snijders JM (1998) Impact on human health of *Salmonella* spp on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int J Food Microbiol* 44(3):219-229

Berends BR, Van Knapen F, Snijders JM, Mossel DA (1997) Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp on pork carcasses. *Int J Food Microbiol* 36(2-3):199-206

Betancor L, Schelotto F, Martínez A, Pereira M, Algorta G, Rodríguez MA, Vignoli R, Chabalgoity JA (2004) Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *J Clin Microbiol* 42(3):1155-1162

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523

Birren BW, Lai E, Clark SM, Hood L, Simon MI (1988) Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. *Nucleic Acids Res* 16(15):7563-7582

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B (2000) *Salmonella* Nomenclature. *J Clin Microbiol* 38(7): 2465–2467

Briggs CE, Fratamico PM (1999) Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 43:846-849

Burr MD, Josephson KL, Pepper IL (1998) An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Lett Appl Microbiol* 27(1):24-30

Callow BR (1959) A new phage-typing scheme for *Salmonella typhimurium*. *J Hyg Camb* 57:346–359

Carle GF, Frank M, Olson MV (1986) Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232(4746):65-68

Centers for Disease Control and Prevention (2004) *Salmonella* surveillance:annual summary, 2003. CDC, US Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga

Chambers RM, McAdam P, de Sa JDH, Ward LR, Rowe B (1987) A phage-typing scheme for *Salmonella* Virchow. *FEMS Microbiol Lett* 40:155-157

Chu G (1991) Bag model for DNA migration during pulsed-field electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(24):11071-11075

Chu G, Vollrath D, Davis RW (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234(4783):1582-1585

Craigie J, Yen CH (1938) The demonstration of types of B typhosus by means of preparations of type II Vi phage. II The stability and epidemiological significance of V form types of B typhosus. *Can Public Health J* 29:484-496

Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S (1973) Molecular relationships among the *Salmonelleae*. *J Bacteriol* 115(1):307-315

Davies J (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264(5157):375-382

Davies PR (1999) Foodborne pathogens and pork production: What is our Achilles' Heel? *Am Assoc of Swine Practitioners* 275-285

Davies PR, Funk JA, Morrow WE (2000) Fecal shedding of *Salmonella* by gilts before and after introduction to a swine breeding farm. *Swine Health Prod* 1:25-29

Davies PR, Turkson PK, Funk JA, Nichols MA, Ladelyand SR, Fedorka-Cray PJ (2000) Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *J Appl Microbiol* 89:169-177

Davies RH, Bedford S, Shankster S (2001) Enhanced culture techniques for the detection of *Salmonella*. *Vet Rec* 148(17):539-540

De Cesare A, Manfreda G, Dambaugh TR, Guerzoni ME, Franchini A (2001) Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strains isolated in Italy. *J Appl Microbiol* 91(5):780-785

de Frutos C, Ortiz E, Herrero A, Ayala JL, Fernández B (2005) Análisis de los serotipos de *Salmonella* spp aislados durante los años 2002, 2003 y 2004 por los laboratorios de Sanidad Animal en España. *Bol Epidemiol Semanal* 13(12):133-144

Dusch H, Altwegg M (1995) Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *J Clin Microbiol* 33(4):802-804

Eberth CJ (1880) *Bacillus typhosus*. *Virchow Arch* 81(I): 58

Echeita A, Aladueña A, González-Sanz R, Díez R, de la Fuente M, Cerdán F, Arroyo M, Gutiérrez R (2005) Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (II). *Bol Epidemiol Semanal* 13 (8):85-96

Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA (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 MA, Aladueña AM, Díez R, Arroyo M, Cerdán F, Gutiérrez R, de la Fuente M, González-Sanz R, Herrera-León S, Usera MA (2005) Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 23(3):127-134

Echeita MA, Herrera S, Usera MA (2001) Atypical, *flj*-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

Eriksson J, Lofstrom C, Aspan A, Gunnarsson A, Karlsson I, Borch E, de Jong B, Radstrom P (2005) Comparison of genotyping methods by application to *Salmonella livingstone* strains associated with an outbreak of human salmonellosis. *Int J Food Microbiol* 104(1):93-103

Espigares E, Álvarez A (2002) Algunos aspectos del mecanismo de transmisión hídrica en *Salmonella*. *Hig. Sanid Ambient*, Univ Granada 2: 19-25

Esteban E, Snipes K, Hird D, Kasten R, Kinde H (1993) Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol* 31(2):233-237

Euzéby JP (1999) Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp nom, 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* 49:927-930

Farmer JJ 3rd, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR (1985) Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 21(1):46-76

Fisher IST on behalf of the Enter-net participants (1999) *S enteritidis* in Western Europe 1995-98, a surveillance report from Enter-net. *Euro Surveill* 4: 56

Fontana J, Stout A, Bolstorff B, Timperi R (2003) Automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for rapid identification of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Newport. *Emerg Infect Dis* 9(4):496-499

Gaillot O, Di Camillo P, Berche P, Courcol R, Savage C (1999) Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and Hektoen enteric agar for isolation of *Salmonellae* from stool samples. *J Clin Microbiol* 37(3): 762-765

Galanis E, Lo Fo Wong DMA, Patrick ME, Wegener HC; and the WHO GSS Members (2004) Characterizing the worldwide distribution of *Salmonella* serotypes the role of WHO Global Salm-Surv. *Danish Institute for Food and Veterinary Research Morkhoj*, WHO

Garaizar J, López-Molina N, Laconcha I, Baggesen DL, Rementería A, Vivanco A, Audicana A, Perales I (2000) Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 66(12):5273-5281

Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, Frye J, Usera MA, McClelland M (2002). DNA microarraybased typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol* 40:2074-2078

Gebreyes WA, Altier C (2002) Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* 40(8):2813-2822

Gibert I, Barbe J, Casadesus J (1990) Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*. *J Gen Microbiol* 136:2555-2560

Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ (1998) Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* 338(19):1333-1338

Grisaru-Soen G, Wysoki MG, Keller N (2004) Risk factors for development of nontyphoid *Salmonella* bacteremia. *Clin Pediatr (Phila)* 43(9):825-829

Guerra B, Laconcha I, Soto SM, González-Hevia MA, Mendoza MC (2000) Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol Lett* 190:341-347

Guerra ML, Aladueña A, Echeita A, Rotger R (2004) Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. *Int J Antimicrob Agents* 24(4):327-333

Hilton AC, Banks JG, Penn CW (1997) Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*. *Lett Appl Microbiol* 24(4):243-248

Holmberg SD, Wachsmuth IK, Hickman-Brenner FW, Cohen ML (1984) Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks. *J Clin Microbiol* 19(2):100-104

Hoofar J, Baggesen DL (1998) Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp from swine and poultry. *FEMS Microbiol Lett* 169:125-130

Hoofar J, Mortensen AV (2000) Improved culture methods for isolation of *Salmonella* organisms from swine feces. *Am J Vet Res* 61:1426-1429

Hu H, Lan R, Reeves PR (2002) Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals phage-type-specific markers and potential for microarray typing. *J Clin Microbiol* 40(9):3406-3415

Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH (2001) Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 114(9-10):382-384

Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, Dijkshoorn L (1997) Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 47(4):1179-1187

Jeoffreys NJ, James GS, Chiew R, Gilbert GL (2001) Practical evaluation of molecular subtyping and phage typing in outbreaks of infection due to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Pathology* 33(1):66-72

Kado CI, Liu ST (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 145(3):1365-1373

Kan YW, Dozy AM (1978) Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by DNA analysis of amniotic-fluid cells. *Lancet* 2(8096):910-912

Kariuki S, Gilks C, Kimari J, Muyodi J, Waiyaki P, Hart CA (1999) Analysis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by phage typing, antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 48(11):1037-1042

Kariuki S, Cheesbrough J, Mavridis AK, Hart CA (1999) Typing of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi C isolates from various countries by plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 37(6):2058-2060

Kauffmann F (1966) The bacteriology of *Enterobacteriaceae*. *Munksgaard*, Copenhagen, Denmark

Kisiela D, Kuczkowski M, Kiczak L, Wieliczko A, Ugorski M (2005) Differentiation of *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum from *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum by PCR-RFLP of the fimH gene. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(5):214-218

Lagatolla C, Dolzani L, Tonin E, Lavenia A, Di Michele M, Tommasini T, Monti-Bragadin C (1996) PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. *J Clin Microbiol* 34(10):2440-2443

Lailier R, Grimont F, Jones Y, Sanders P, Brisabois A (2002) Subtyping of *Salmonella typhimurium* by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. *Pathol Biol (Paris)* 50(6):361-368

Lan R, Davison AM, Reeves PR, Ward LR (2003) AFLP analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates of phage types DT 9 and DT 135: diversity within phage types and its epidemiological significance. *Microbes Infect* 5(10):841-850

Lawson AJ, Desai M, O'Brien SJ, Davies RH, Ward LR, Threlfall EJ (2004) Molecular characterisation of an outbreak strain of multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the UK. *Clin Microbiol Infect* 10(2):143-147

Le Minor L, Bockemuhl J (1984) Supplement No XXVII (1983) to the Kauffmann-White scheme. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 135B(1):45-51

Le Minor L, Popoff MY, Laurent B, Hermant D (1986) Individualisation d'une septième sous-espèce de *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. nov. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137B: 211- 217

Le Minor L, Veron M, Popoff M (1982). Taxonomie des *Salmonella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 133B: 223-243

Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Cassar CA, Clifton-Hadley FA, Lindsay EA, Threlfall EJ, Chappell SA, Davies RH (2002) Investigation of the genetic diversity among isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin from animals and humans from England, Wales and Ireland. *J Appl Microbiol* 93(5):732-744

Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Clifton-Hadley FA, Lindsay E, Threlfall EJ, McDowell SWJ, Davies RH (2002) Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. *J Clin Microbiol* 40(12): 4450-4456

Liebana E, Garcia-Migura L, Guard-Petter J, McDowell SW, Rankin S, Opitz HM, Clifton-Hadley FA, Davies RH (2002) *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29 and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. *J Appl Microbiol* 92(2):196-209

Liebana E, Guns D, Garcia-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley FA, Davies RH (2001) Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol* 39(10):3609-3616

Liebana E (2002) Molecular tools for epidemiological investigations of *S enterica* subspecies *enterica* infections. *Res Vet Sci* 72(3):169-175

Lindqvist N, Heinikainen S, Siitonen A, Pelkonen S (2004) Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium DT1 isolates. *Epidemiol Infect* 132(2):263-272

Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Kapperud G (2000) Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J Clin Microbiol* 38(4):1623-1627

Liu GR, Edwards K, Eisenstark A, Fu YM, Liu WQ, Sanderson KE, Johnston RN, Liu SL (2003) Genomic diversification among archival strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT7. *J Bacteriol* 185(7):2131-2142

Liu Y, Lee MA, Ooi EE, Mavis Y, Tan AL, Quek HH (2003) Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from various countries in Asia by a Multiplex PCR Assay on variable-number tandem repeats. *J Clin Microbiol* 41(9): 4388–4394

Lo Fo Wong DM, Dahl J, Wingstrand A, van der Wolf PJ, von Altrock A, Thorberg BM (2004) A European longitudinal study in *Salmonella* seronegative- and seropositive-classified finishing pig herds. *Epidemiol Infect* 132(5):903-914

Low JC, Angus M, Hopkins G, Munro D, Rankin SC (1997) Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 isolates and investigation of strains with transferable apramycin resistance. *Epidemiol Infect* 118(2):97-103

Maddocks S, Olma T, and Chen S (2002) Comparison of CHROMagar *Salmonella* medium and xylose-lysine-desoxycholate and *Salmonella*-*Shigella* agars for isolation of *Salmonella* strains from stool samples. *J Clin Microbiol* 40(8): 2999-3003

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1996) Brock biology of microorganisms, 8th ed. *Prentice-Hall College Division*, Upper Saddle River, NJ

Martinetti G, Altwegg M (1990) rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella enteritidis*. *Res Microbiol* 141(9):1151-1162

Martin K, Sharland M, Davies EG (1994) Encephalopathy associated with *Salmonella* Enteritidis infection. *Scand J Infect Dis* 26(4):486-488

Maskalyk J (2003) Typhoid fever. *CMAJ* 169(2):132

Michael GB, Cardoso M, Costa M (1999) Comparison of selenite cystine broth, tetrathionate broth and rappaport-vassiliadis broth for the recovery of *Salmonella* from swine feces. Proceedings of the 3rd International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella*, Washington, DC, 78-80

Miller GY, Liu X, McNamara PE, Barber DA (2005) Influence of *Salmonella* in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. *J Food Prot* 68(9):1788-1798

Mmolawa PT, Willmore R, Thomas CJ, Heuzenroeder MW (2002) Temperate phages in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: implications for epidemiology. *Int J Med Microbiol* 291(8):633-644

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350

Nair S, Schreiber E, Thong KL, Pang T, Altwegg M (2000) Genotypic characterization of *Salmonella typhi* by amplified fragment length polymorphism fingerprinting provides increased discrimination as compared to pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Microbiol Methods* 41(1):35-43

Nastasi A, Mammina C, Villafrate MR (1991) rDNA fingerprinting as a tool in epidemiological analysis of *Salmonella typhi* infections. *Epidemiol Infect* 107(3):565-576

Nollet N, Maes D, De Zutter L, de Kruif A, Van Hoof J (2001) Evaluation of different enrichment media for the isolation of *Salmonella* spp from faeces and lymph nodes in slaughter pigs. Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other food borne pathogens in pok, Leipzig, Germany 540-544

O'Hara CM, Tenover FC, Miller JM (1993) Parallel comparison of accuracy of API 20E, Vitek GNI, MicroScan Walk/Away Rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/NF for identification of members of the family *Enterobacteriaceae* and common gram-negative, non-glucose-fermenting bacilli. *J Clin Microbiol* 31(12):3165-3169

Oliveira CJ, Carvalho LF, Fernandes SA, Tavechio AT, Domingues FJ Jr (2005) Prevalence of pigs infected by *Salmonella* Typhimurium at slaughter after an enterocolitis outbreak. *Int J Food Microbiol* 105(2):267-271

Olive M, Bean P (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37(6):1661-1669

Olsen JE, Brown DJ, Baggesen DL, Bisgaard M (1992) Biochemical and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Berta, and comparison of methods for typing. *Epidemiol Infect* 108(2):243-260

Olsen JE, Skov M (1994) Genomic lineage of *Salmonella enterica* serovar Dublin. *Vet Microbiol* 40(3-4):271-282

Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ (1994) Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 40(1):15-22

Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ (2002) Typhoid fever. *N Engl J Med* 347(22):1770-1782

Pasquali F, De Cesare A, Ricci A, Kehrenberg C, Schwarz S, Manfreda G (2004) Phage types, ribotypes and tetracycline resistance genes of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium strains isolated from different origins in Italy. *Vet Microbiol* 103(1-2):71-76

Penner JL (secretary) (1988) International Committee on Systematic Bacteriology. Taxonomic subcommittee on *Enterobacteriaceae*. Minutes of the Meeting, Manchester, England. *Int J Syst Bacteriol* 38: 223-224

Peters TM, Maguire C, Threlfall EJ, Fisher IST, Gill N, Gatto AJ on behalf of the Salm-gene project participants (2003) Proyecto Salm-gene: una colaboración europea para la impresión digital del ADN en la salmonelosis alimentaria. *Euro Surveill* 8(2):46-50

Petrow S, Kasatiya SS, Pelletier J, Ackermann HW, Peloquin J (1974) A phage typing scheme for *Salmonella* Newport. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 125(4):433-445

Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH (1998) *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393:79-82

Pohl P, Thomas J (1980) Rapid detection and identification of plasmids belonging to the H incompatibility group and infecting epidemic strains of *Salmonella typhimurium*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 131(3):315-319

Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW, Gheesling LL (2001) Supplement 2000 (no 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 152(10):907-909

Popoff MY, Bockemuhl J, Hickman-Brenner FW (1997) Supplement 1996 (no 40) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 148(9):811-814

Pritchett LC, Konkel ME, Gay JM, Besser TE (2000) Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 38:3484–3488

Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschape H, Adams LG, Baumler AJ (2002) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun* 70(5):2249-2255

Reddy KR, Rajesh PK, Krishnan M, Sekar U (2005) Antibiotic susceptibility pattern and plasmid profile of multidrug resistant *Salmonella typhi*. *Indian J Med Microbiol* 23(3):208

Reed WM, Olander HJ, Thacker HL (1986) Studies on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var kuzendorf infection in weanling pigs. *Am J Vet Res* 47(1):75-83

Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ III (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* 27:313-320

Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B (1998) Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 36(8):2314-2321

Ruiz J, Núñez ML, Díaz J, Lorente I, Pérez J, Gómez J (1996) Comparison of five plating media for isolation of *Salmonella* species from human stools. *J Clin Microbiol* 34(3):686-688

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-1354

Salmon DE, Smith T (1886) The bacterium of swine-plague. *Am Month Microscop J* 7: 204-205

Salmonella Subcommittee of Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology. The Genus *Salmonella*. Lignières (1900) *J Hyg* 34: 333-350

Sanderson KE, Sciore P, Liu SL, Hessel A (1993) Location of IS200 on the genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol* 175(23):7624-7628

Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L, Lenstra JA (1999) Amplified-Fragment Length Polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol* 37(10):3083-3091

Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, Wagner DD, McDermott PF, Walker RD, Meng J (2002) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol* 68(2):576-581

Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37(1):67-75

Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, Cantor CR (1982) New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, XLVII: 189-195

Sechter I, Gerichter CB (1968) Phage typing scheme for *Salmonella braenderup*. *Appl Microbiol* 16(11):1708-12

Serwer P, Dunn FJ (1990) Rotating gels: why, how, and what. In *Methods: A Companion to Methods of Enzymology*. PulsedField Electrophoresis (B. Birren and E. Lai, eds.). *Academic Press*, San Diego 1 (2):143-150

Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR (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. *Appl Environ Microbiol* 70(5):2959-2965

Southern EM, Anand R, Brown WRA, Fletcher DS (1987) A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 15: 5925-5943

Soto SM, Guerra B, González-Hevia MA, Mendoza MC (1999) Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl Environ Microbiol* 65(11):4830-4836

Stager CE, Davis JR (1992) Automated systems for identification of microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 5(3): 302-327

Steinbach G, Hartung M (1999) Attempt to estimate the share of human *Salmonella* infections, which are attributable to *Salmonella* originating from swine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 112(8):296-300

Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, and the CDC PulseNet Task Force (2001) PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 7(3):382-389

Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P, Pang T (1995) Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol* 33(5):1070-1074

Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR, Rowe B (1994) Epidemic in cattle and humans of *Salmonella typhimurium* DT 104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet Rec* 134(22):577

Threlfall EJ, Hampton MD, Ward LR, Rowe B (1996) Application of pulsed-field gel electrophoresis to an international outbreak of *Salmonella agona*. *Emerg Infect Dis* 2(2):130-132

Threlfall EJ, Torre E, Ward LR, Davalos-Pérez A, Rowe B, Gibert I (1994) Insertion sequence IS200 fingerprinting of *Salmonella typhi*: an assessment of epidemiological applicability. *Epidemiol Infect* 112(2):253-261

Torre E, Threlfall EJ, Hampton MD, Ward LR, Gibert I, Rowe B (1993) Characterization of *Salmonella virchow* phage types by plasmid profile and IS200 distribution. *J Appl Bacteriol* 75(5):435-440

Tyc Z (1990) Bacteriophage types represented by lactose-fermenting *Salmonella Agona* strains. *Med Dosw Mikrobiol* 42(1-2):15-20

Usera MA, Aladueña A, Diez R, de la Fuente M, Gutiérrez F, Cerdán R, Arroyo M, González R, Echeita A (2001) Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 2000 (I). *Bol Epidemiol Semanal* 9:221-224

Usera MA, Aladueña A, Diez R, de la Fuente M, Gutiérrez F, Cerdán R, Echeita A (2000). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 1999 (I). *Bol Epidemiol Semanal* 8:45-48

Usera MA, Rodríguez A, Echeita A, Cano R (1998) Multiple analysis of a foodborne outbreak caused by infant formula contaminated by an atypical *Salmonella virchow* strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(8):551-555

Validation List N° 102: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM (2005) *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 547-549

van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M (2001) Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 14(3):547-60

van den Bogaard AE, Stobberingh EE (2000) Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* 14(4):327-335

van der Wolf PJ, Elbers AR, van der Heijden HM, van Schie FW, Hunneman WA, Tielen MJ (2001) *Salmonella* seroprevalence at the population and herd level in pigs in The Netherlands. *Vet Microbiol* 80(2):171-184

Visser MR, Bogaards L, Rozenberg-Arska M, Verhoef J (1992) Comparison of the autoSCAN-W/A and Vitek Automicrobic systems for identification and susceptibility testing of bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11(11):979-984

Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, Cieslak PR, Deneen VC, Tauxe RV; and the Emerging Infections Program FoodNet Working Group (2004) FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis* 38 Suppl 3:S127-134

Voogt N, Raes M, Wannet WJB, Henken AM, van de Giessen AW (2001) Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Lett Appl Microbiol* 32(2):89-92

Wegener HC, Hald T, Lo Fo Wong D, Madsen M, Korsgaard H, Bager F, Gerner-Smidt P, Mølbak K (2003) *Salmonella* Control Programs in Denmark. *Emerg Infect Dis* 9(7):774-780

Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18(24):7213-7218

White PB (1929) The salmonella group. A system of bacteriology in relation to medicine. *Medical Research Council*, London, HMSO 14:86–158

White TJ, Arnheim N, Erlich HA (1989) The polymerase chain reaction. *Trends Genet* 5:185-189

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22):6531-6535

Witte W (1998) Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279(5353):996-997

Wray C, McLaren IM, Jones YE (1998) The epidemiology of *Salmonella typhimurium* in cattle: plasmid profile analysis of definitive phage type (DT) 204c. *J Med Microbiol* 47(6):483-487

Wray C, Todd N, McLaren I, Beedell Y, Rowe B (1990) The epidemiology of *Salmonella* infection of calves: the role of dealers. *Epidemiol Infect* 105(2):295-305