

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.

Summary

Salmonellosis is the most important food borne toxi-infection transmitted by food and food sub-products of animal origin in developed countries. There are an ever increasing number of multi-resistant *Salmonella* strains, due mostly to the abuse of antimicrobials in livestock farming. These circumstances justify the worldwide study and epidemiological surveillance of *Salmonella*, which require adequate identification and characterization methods to establish relatedness between strains and determine the origin of an outbreak, thus allowing for comparative worldwide surveillance.

When the *Salmonella enterica* monophasic strain with antigenic formula (4,5,12:i:-) was first isolated in Spain in 1997 various epidemiological studies were conducted to determine its origin. This “new serotype” frequently displayed a multi-resistance profile R-ACSSuT-GSxT, and a U302 phage type in more than 55% of the studied cases. Using different characterization methods (determination of restriction profile through pulse field gel electrophoresis (PFGE), plasmidic profile, antimicrobial resistance profile, and phage type) we determined the possible genetic relatedness of 48 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains of pig samples originating in Catalonia and isolated in our laboratory between 1998 and 2000. Twenty-three of these strains belonged to *S. enterica* (4,5,12:i:-), 24 to *S. enterica* serotype Typhimurium (4,5,12:i:1,2), and one strain to *S. enterica* (4,5,12:-:-). After combining the resulting PFGE profiles, which were obtained separately with 2 different restriction enzymes (*Xba*I y *Bln*I), we observed that the 48 strains were grouped into 7 separate patterns (profile *XB*). Twenty three isolates of serotype 4,5,12:i:- and 10 isolates of serotype Typhimurium shared the same pattern. Of these 10 Typhimurium strains three with phage type U302 were isolated during the first years of the study and had a plasmid and a multi-resistance profile which were characteristic for monophasic strains. Further analysis of relatedness between the studied strains led us to the conclusion that the new monophasic serotype was not a new serotype, but instead a monophasic variant of serotype Typhimurium U302.

During an outbreak the time needed to determine relatedness between clinical samples, and thus establish the potential origin of a strain, is of utmost importance. 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. Classical biochemical profiling uses a set of biochemical tests to identify *Salmonella* subspecies, taking only positive or negative results into account for identification and classification. In our second study we determined the relatedness between 135 isolates of various *Salmonella* serotypes using biochemical kinetic data obtained from the same biochemical tests. This biotype allowed us to obtain 6 major clusters which included 94% of the studied strains (n=127). The similarity rate within a group was $\geq 95\%$. Some clusters grouped not only strains belonging to a single serotype, but its phenotype varieties. The remaining strains (n=8), constituted groups with a single isolate. These results suggest that metabolic biochemical kinetic data used to identify *Salmonella* subspecies could be used to determine the relatedness between isolates in an easy and timely manner.