

**Tesina para optar por el grado de Licenciatura en Ciencias
Biológicas, Opción Microbiología.**

Caracterización fenotípica y genotípica de *Salmonella* y *Shigella*, Uruguay



Tiana Leivas Viera

Tutora: PhD. Teresa Camou

Departamento de Laboratorios de Salud Pública
Unidad de Bacteriología.

Noviembre, 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Teresa Camou por darme un lugar en el laboratorio para realizar mi tesina de grado, por su tiempo, sus devoluciones y apoyo.

A los compañeros de laboratorio por su buena onda, en especial a Alfredo por las enseñanzas y tiempo compartido.

A Emi por su paciencia, por entender que mamá tenía que estudiar y por su interés de colarse a estudiar conmigo siempre que pudo.

A mis padres por tanto amor y apoyo incondicional, siempre.

A mi familia: tíos, primos, abuelas, Daniela, Lucía y Belén por estar en cada paso.

.A mis amigas de facultad porque esta carrera sin ustedes no hubiera sido la misma, por las charlas y las horas de estudio entre mate y mate.

A mis amigas mercedarias ¡las de siempre!

A Julián por todos estos años.

ÍNDICE

RESUMEN	6
1.- Introducción	7
1.1.- Importancia del tema	7
1.2.- <i>Salmonella</i>	8
1.2.1.- Características microbiológicas	8
1.2.2.- Clasificación y nomenclatura	9
1.2.3.- Presentación clínica	9
1.2.4.- Epidemiología	10
1.2.5.- Susceptibilidad antimicrobiana	11
1.2.5.1.- Mecanismos de resistencia antibiótica	11
A.- Antibióticos β -lactámicos y β -lactamasas	12
B.- β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y AmpC	12
C.- <i>Salmonella</i> BLEE positivas en Uruguay	13
1.3.- <i>Shigella</i>	14
1.3.1.- Características microbiológicas	14
1.3.2.- Clasificación	15
1.3.3.- Patogenia	15
1.3.4.- Epidemiología	16
1.4.- Subtipificación molecular	17
1.4.1.- Electroforesis de campo pulsado (PFGE)	18
1.4.1.1.- Red PulseNet	19
2.- Objetivos	21
2.1.- Objetivo general	21
2.2.- Objetivos específicos	21
3.- Materiales y Métodos	22
3.1.- Material biológico	22
3.2.- Identificación	22
3.2.1.- Aislamiento en placas	22

3.2.2.- Pruebas bioquímicas	23
3.2.3.- Serotipificación	25
3.2.3.1.- Antígenos somáticos	25
3.2.3.2.- Antígenos Flagelares	26
3.3.- Susceptibilidad a antimicrobianos	28
3.3.1.- Pruebas de disco-difusión	28
3.3.2.- Test de sinergia de doble disco	30
3.3.3.- Prueba confirmatoria para BLEE	30
3.4.- Electroforesis de Campo pulsado (PFGE)	30
3.4.1.- Análisis de los geles	32
3.5.- Datos del Brote	33
4.- Resultados y Discusión	34
4.1.- <i>Salmonella</i>	34
4.1.1.- Identificación	34
4.1.2.- Pruebas de susceptibilidad	35
4.1.3.- PFGE	36
4.1.3.1.- PFGE-XbaI	36
4.1.3.2.- PFGE-AvrII	39
4.2.- <i>Shigella</i>	40
4.2.1.- Identificación y susceptibilidad antimicrobiana	40
4.2.2.- PFGE	41
4.2.3.- Brote de <i>S. sonnei</i>	43
4.2.3.1.- PFGE-XbaI y análisis filogenético	43
4.2.4.- Análisis filogenético de cepas de <i>S. sonnei</i> circulantes en Uruguay (2000-2014)	44
5.- Conclusiones	48
5.1.- <i>Salmonella</i> Typhimurium productoras de BLEE	48
5.2.- <i>Shigella sonnei</i>	48

5.3.- Conclusión general	49
REFERENCIAS	50
ANEXOS	54

RESUMEN

Salmonella y *Shigella* son patógenos que causan Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Su estudio resulta crucial para la vigilancia epidemiológica: conocimiento sobre las especies y/ o serotipos circulantes, identificación de nuevas resistencias a antimicrobianos que puedan surgir, detección de brotes no declarados.

La caracterización se logra mediante métodos fenotípicos y genotípicos. En los últimos años el uso de Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) como técnica molecular para la comparación de distintas cepas de una misma especie, se ha vuelto el método genotípico más utilizado. Uruguay, como miembro de la Red PulseNet de America Latina y el Caribe comparte, mediante esta técnica, información con los otros países miembros y con una base de datos internacional siguiendo protocolos estandarizados.

En este trabajo se realizó el análisis por PFGE de: a) una colección de cepas de *Salmonella* Typhimurium BLEE positivas y b) de cepas de *Shigella sonnei* (*S. sonnei*) ingresadas en el Departamento de Laboratorios de Salud Pública (DLSP). En el caso de *Salmonella* el objetivo fue determinar si dicha resistencia se debía a la expansión clonal de una misma cepa o era una resistencia adquirida por cepas diferentes. El resultado mostró que cinco de las ocho cepas analizadas pertenecían al mismo pulsotipo, las otras tres no tuvieron relación cercana.

En el caso de *S. sonnei* se hizo un análisis comparativo mediante un dendrograma de las cepas circulantes en Uruguay en el período 2000 a 2014, encontrándose un grupo conformado por el mayor número de cepas con genotipos indistinguibles. Además fue analizado y confirmado un brote por medio de PFGE.

1.- INTRODUCCIÓN

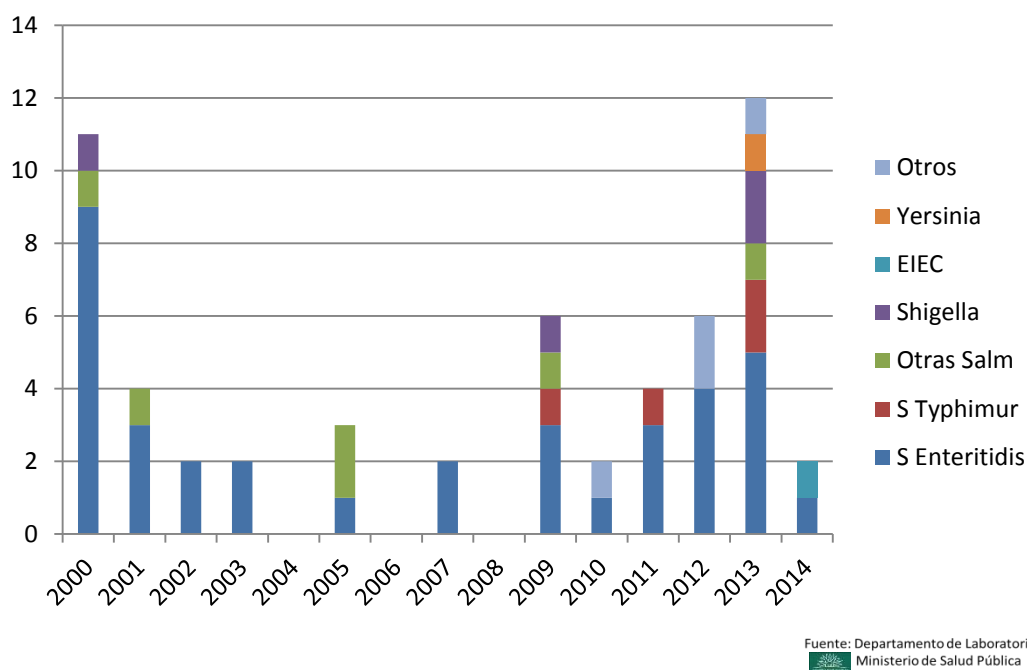
1.1.- Importancia del tema

Salmonella y *Shigella* son especies bacterianas de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Ambos son agentes de enfermedades transmitidas por alimentos que a menudo se presentan como brotes, por este motivo resulta crucial su identificación y serotipificación en el marco de la vigilancia epidemiológica.

Se define ETA como: “síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población” (Guáveta, 1993).

El cuadro clínico puede clasificarse como: a) Infección alimentaria: ingesta de alimento y/ o agua contaminados con el microorganismo; b) Intoxicación alimentaria: ingesta de alimento y/ o agua que contenga toxinas, productos metabólicos o sustancias químicas que provengan de microorganismos. En general, la intoxicación o infección por cualquiera de estos microorganismos produce diarrea, fiebre y/o vómitos entre otros, dependiendo del grado de gravedad. Un brote de ETA es un episodio en el cual dos o más personas presentan una enfermedad similar luego de ingerir alimentos o agua del mismo origen. Esto se evidencia mediante un seguimiento epidemiológico en el cual se investiga la relación de tiempo y lugar de las personas implicadas y por análisis de laboratorio se identifica el agente causal, se determina la fuente y el modo mediante el cual ocurrió la contaminación. En Uruguay la mayor cantidad de brotes son producidos por *Salmonella* (Gráfico 1).

**Gráfico 1: Brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos
Uruguay 2000- 2014**



1.2.- *Salmonella*

1.2.1.- Características microbiológicas

Es un microorganismo que no fermenta lactosa ni sacarosa pero si glucosa, puede ser o no productor de gas y de H_2S , puede utilizar el citrato como única fuente de carbono, produce descarboxilación de lisina y es ornitina positivo, indol positivo y fenilalanina negativo. La mayoría son móviles, a excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pollurum* (Linder, 1995) algunos pueden presentar más de una fase flagelar (bifásicos). El género *Salmonella* presenta tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura (Vi), éste último se presenta únicamente en *S.*

Typhi, S. Paratyphi y S. Dublin.

1.2.2.- Clasificación y nomenclatura

Actualmente se distinguen dos especies del género *Salmonella*: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, y a su vez la primera se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houenae* e *indica*. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* es la que se asocia con animales de sangre caliente y con el hombre. Las demás subespecies y *S. bongori* son habitantes del ambiente y se asocian a animales de sangre fría (Popoff, 2001). La aglutinación en placa con antisueros específicos O aporta información de los distintos serotipos, también se utilizan los antígenos H y Vi, y en base a esto son clasificados en más de 2523 serotipos (o serovares) descritos en el esquema de Kauffmann y White (Popoff, 2001).

La nomenclatura utilizada para *Salmonella* es muy compleja ya que dentro del género se encuentran especies, subespecies y serotipos. Usualmente los nombres de los serotipos refieren al lugar geográfico en el cual se aislaron por primera vez, por ejemplo *S. Montevideo*, aunque también puede ser en relación al huésped que coloniza como es el caso de *S. Gallinarum*. Dado que la mayor cantidad de serotipos pertenecen a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* y para facilitar la comunicación, se utiliza poner el nombre del género en itálica seguido del nombre del serotipo con la primer letra mayúscula y no en itálica (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis) (Brenner et al., 2000).

1.2.3.- Presentación clínica

Algunos serovares de *Salmonella* tienen especificidad por el huésped como *S. Typhi* en el caso del hombre y *S. Gallinarum* en las aves. Otros no se limitan a un único huésped sino que son capaces de producir

enfermedades en distintas especies, este es el caso de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*.

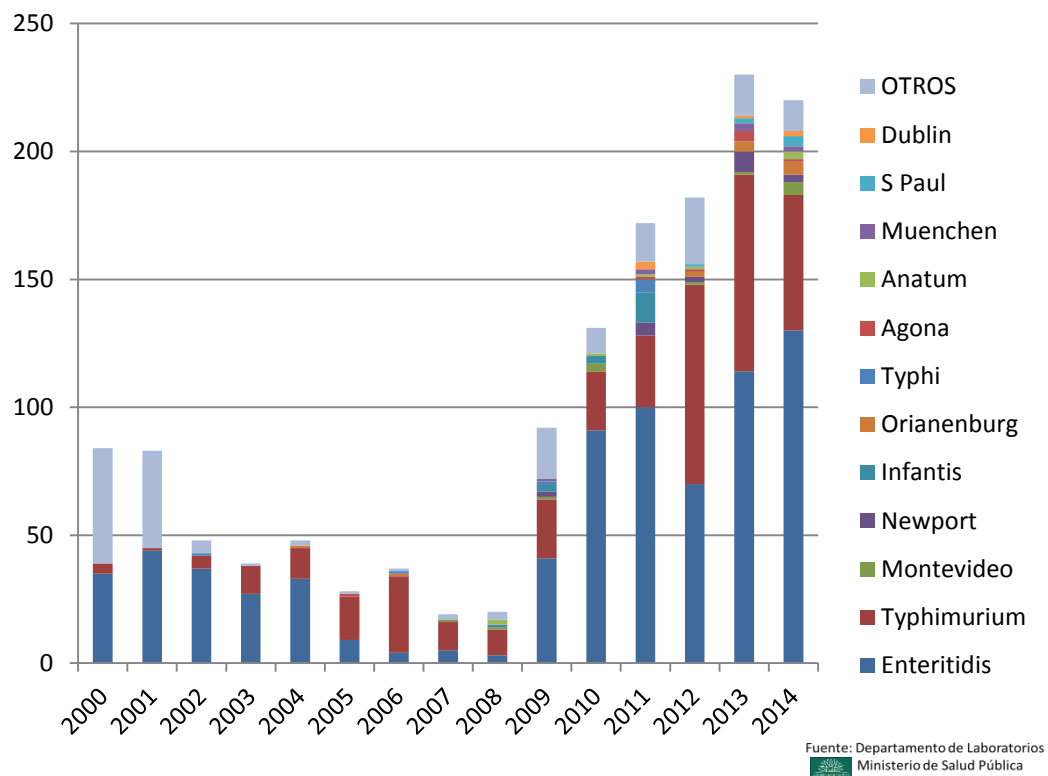
La salmonelosis humana se clasifica en: a) tifoidea si es producida por los serovares Typhi o Paratyphi; b) no tifoidea producida por otras variedades. En cuanto a los síntomas, la salmonelosis tifoidea se presenta con fiebre muy alta, dolor abdominal, vómitos, diarrea profusa, y presencia de microorganismos en sangre, pudiendo provocar la muerte; la salmonelosis no tifoidea puede presentar fiebre, diarrea y/o vómitos.

1.2.4.- Epidemiología

La salmonelosis es la mayor causa de enfermedades entéricas bacterianas (Guáveta, 1993) por la cantidad de animales colonizados o infectados sumado a las malas prácticas de manejo. El mayor reservorio de este microorganismo es el tracto intestinal humano y de animales de granja, además se ha visto que la mosca doméstica puede actuar como vector (Olsen & Hammark, 2000).

En Uruguay la enfermedad está asociada principalmente al consumo de pollo y huevos, crudos o mal cocidos pero puede encontrarse también en otros alimentos como leche y sus derivados, vegetales, frutas o cualquier alimento contaminado por vía fecal-oral. En Uruguay, las cepas circulantes mayoritarias son *Salmonella* Enteritidis seguida de *Salmonella* Typhimurium (Gráfico 2).

**Gráfico 2: Aislamientos de *Salmonella enterica* por serovar
Uruguay 2000- 2014**



1.2.5.- Susceptibilidad antimicrobiana

1.2.5.2.- Mecanismos de resistencia antibiótica

La capacidad de resistir la acción de sustancias antimicrobianas puede ser intrínseca o adquirida por cambios genéticos, ya sean mutaciones espontáneas o plásmidos con genes de resistencia (Madigan et al., 1999). En *Salmonella* la resistencia antimicrobiana puede estar asociada a la adquisición, por transferencia horizontal, de genes de resistencia que se encuentran en elementos móviles entre cepas de *Salmonella* y otras Enterobacterias, o por propagación clonal de serotipos resistentes (Mather et al., 2013; Alcaine et al., 2007).

Los mecanismos de resistencia pueden ser: modificación del sitio blanco, bombas de eflujo, disminución de la permeabilidad y la producción de enzimas degradadoras del antibiótico (Sefton, 2002; Foley & Lynne, 2008).

En el período 2009 a 2011 se aíslan en Uruguay algunas cepas de *S. Typhimurium* y una *S. Enteritidis* β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) positivas y su estudio es importante por su impacto en salud pública, es un problema en pacientes hospitalizados por implicancias clínicas y económicas.

A.- Antibióticos β -lactámicos y β -lactamasas

Los antibióticos β -lactámicos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. La reacción de transpeptidación por la enzima transpeptidasa da como resultado el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicano. Estas enzimas, también llamadas PBPs (del inglés, “Penicillin Binding Proteins”) pueden unirse a antibióticos que tengan un anillo β -lactámico (penicilinas) impidiendo que se catalice la reacción de transpeptidación; como resultado la pared se degrada y se produce lisis. Un mecanismo de resistencia para estos antibióticos es la producción de β -lactamasas que actúan hidrolizando el anillo β -lactámico.

B.- β -Lactamasas de espectro extendido (BLEE) y AmpC

A partir de la introducción de antibióticos β -lactámicos de espectro extendido, surgen las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que confieren resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, pero no a los carbapenems ni a las cefamicinas y son inhibidas por el ácido clavulánico (Jacoby & Muñoz, 2005; Bush et al., 1995).

Existen otras β -lactamasas llamadas AmpC que no son consideradas BLEE. Estas enzimas mediadas por plásmidos confieren resistencia similar a la de los organismos que producen BLEE (resistencia a ampicilina, amoxicilina, aztreonam y mayoría de cefalosporinas) sin embargo se diferencian de las BLEE porque no son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasas como el clavulánico y son susceptibles a las cefalosporinas de cuarta generación (Pfaller & Sagreti, 2006). La diferenciación entre un microorganismo productor de BLEE y uno de AmpC cobra importancia en la clínica por sus perfiles de susceptibilidad.

La primera enzima BLEE mediada por plásmido descrita fue SHV-2 aislada de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en 1983 en Alemania (Knothe et al., 1983). En América Latina la primera BLEE reportada fue en Chile en 1987, SHV-5 también en una cepa de *K. pneumoniae* (Gutmann et al., 1989). En Argentina se produjo un gran brote causado por *S. Typhimurium* productor de una nueva BLEE CTX-M-2 en 1989 (Bauernfeind et al., 1992). En el correr de los años se han descrito nuevas BLEE en América del Sur de distintos microorganismos Gram negativos, en Uruguay en 2005 se identificó TEM-144 en un aislamiento de *S. entérica* serovar Derby (Vignoli et al., 2006).

C.- *Salmonella* BLEE positivas en Uruguay

No es común identificar aislamientos de *Salmonella* portadoras de BLEE. Al presentarse este tipo de cepas y al no ser una resistencia común en este microorganismo se presenta la interrogante de si se trata de clones de una misma cepa o si la resistencia está siendo adquirida y se trata de cepas diferentes. Desde el año 2002 al 2008 no se recibió en el DLSP ningún aislamiento de *Salmonella* que presentara BLEE, mientras que de 2009 a 2012 se recibieron 11 cepas de *Salmonella* BLEE positivas, una de ellas causante de un brote, como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1: *Salmonella* BLEE positivas hasta 2014.

CEPA	FECHA	SEROTIPO	MUESTRA	BROTE
214	3/2/09	Typhimurium	Coprocultivo	NO
299	24/12/09	Typhimurium	Coprocultivo	NO
391	14/6/10	Typhimurium	Coprocultivo	NO
443	5/1/11	Enteritidis	Coprocultivo	NO
446	7/1/11	Typhimurium	Coprocultivo	NO
458	20/1/11	Typhimurium	Coprocultivo	NO
B7	17/5/11	Typhimurium	Coprocultivo	SI (13)
663	20/3/12	Typhimurium	Coprocultivo	NO
698	16/5/12	Typhimurium	Coprocultivo	NO
701	18/5/12	Typhimurium	Coprocultivo	NO
702	22/5/12	Typhimurium	Coprocultivo	NO

1.3.- *Shigella*

1.3.1.- Características microbiológicas

Es un microorganismo no fermentador de lactosa ni sacarosa pero si de glucosa, no produce gas ni H₂S, es negativo para lisina descarboxilasa, fenilalanina y ornitina, excepto *S. sonnei* que es ornitina positivo. La reacción de indol es variable, excepto *S. sonnei* que es siempre negativo. No crece en un medio con Citrato como única fuente de carbono y no es móvil. *Shigella* presenta únicamente antígeno somático (O) característico de todos los Gram negativos.

1.3.2.- Clasificación

Para el género *Shigella* se describen cuatro especies: *dysenteriae*, *flexneri*, *boydii*, *sonnei*: serogrupos A, B, C y D respectivamente (Murray et al., 2003). Para su identificación se utilizan tanto las pruebas bioquímicas como antigénicas, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de las distintas especies de Shigella

ESPECIE	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Serogrupo	A	B	C	D
Indol	+/-	+/-	+/-	-
Manitol	-	+	+	+
Ornitina	-	-	-	+

1.3.3.- Patogenia

La shigelosis es la principal causa bacteriana de disentería, diarrea caracterizada por tener pus, sangre y/o mucus. Todas las especies pueden producir disentería pero con distintos grados de gravedad. Su virulencia está dada por la adherencia e invasión de las células epiteliales de la mucosa del colon, provocando su inflamación y ulceración.

Algunas especies pueden producir toxinas. La toxina Shiga producida por *S. dysenteriae*, es una toxina proteica que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas de las células que invade, además interviene en una cascada de señalización celular generando apoptosis. Ésta, puede producir síndrome urémico hemolítico.

Su único huésped conocido hasta ahora es el ser humano, siendo los niños entre 1 y 5 años los más comúnmente afectados. Los síntomas son diarrea sanguinolenta, con mucus o pus, fiebre alta, dolor abdominal,

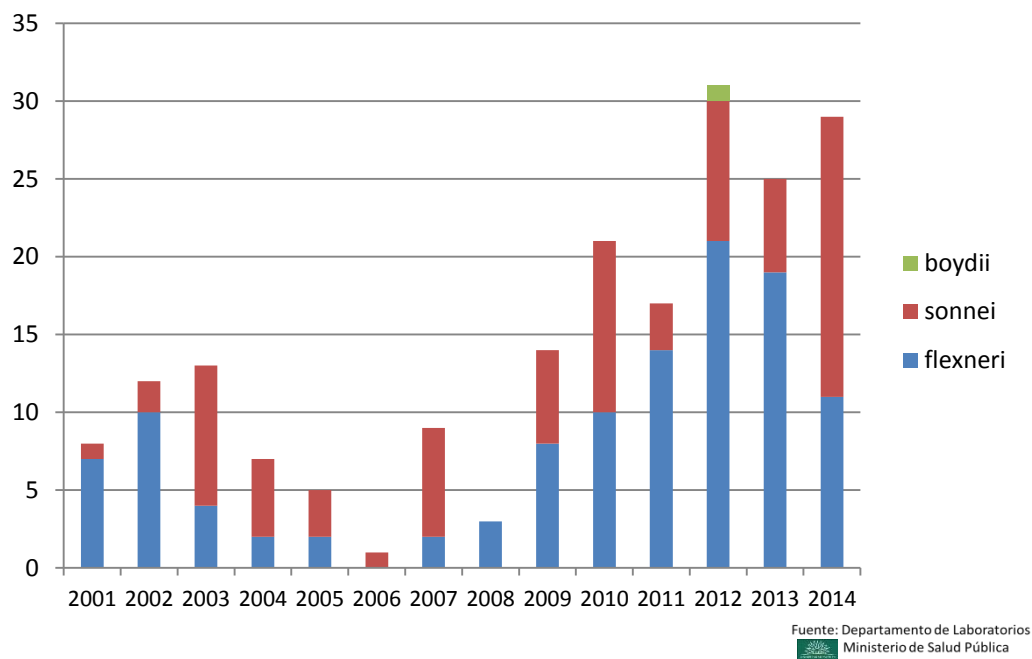
pujos, prolapso rectal. Por lo general el tratamiento con antimicrobianos es efectivo, disminuyendo la severidad y duración de la enfermedad y reduciendo el período de excreción de los microorganismos (Salam et al., 1991).

1.3.4.- Epidemiología

El único huésped de *Shigella* conocido hasta el momento es el humano, por lo cual se transmite principalmente por contacto fecal-oral, por alimentos o agua contaminados. Además la transmisión se ve facilitada por el bajo inóculo infectante (100 a 200 bacterias) debido a esto la higiene es una de las principales formas de prevención. Al 2001 en Uruguay la causa de diarrea sanguinolenta en niños era *S. flexneri* y *S. sonnei* en ese orden de frecuencia, seguidos de *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* productor de toxina tipo Shiga (STEC), *Salmonella* y *E. coli* enteroinvasor (EIEC) (Torres et al., 2001).

Actualmente las especies que se aíslan con mayor frecuencia en Uruguay dentro del género *Shigella* continúan siendo *S. flexneri* y *S. sonnei* (Gráfico 3).

**Gráfico 3: Aislamientos de *Shigella* por especie
Uruguay 2001- 2014**



1.4.- Subtipificación molecular

La subtipificación es la caracterización de bacterias por debajo del nivel de especies y subespecies, puede ser realizada por métodos fenotípicos y genotípicos. Para la salud pública resulta beneficioso tener información de los subtipos de los distintos patógenos, sobre todo en la vigilancia epidemiológica para la identificación de enfermedades y la investigación de brotes (Barrett et al., 2006). Existen diversas técnicas de subtipificación basadas en el ADN, pero la más utilizada para el estudio de brotes es la Electroforesis de Campo Pulsado, PFGE (por sus siglas en inglés: “Pulsed-Field Gel Electrophoresis”). Fue en 1982 cuando Schwartz propuso que moléculas mayores a 50 Kb podían ser separadas

utilizando dos campos eléctricos alternos (Schwartz et al., 1982).

1.4.1.- Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

La técnica de PFGE permite separar ADN desde 30 Kb a 10 Mb alternando diferentes campos eléctricos dispuestos en distintos ángulos en la cuba de reacción. El cambio de pulso genera que los fragmentos de ADN grandes cambien su conformación y se reorienten en el gel, al retardar los fragmentos más grandes y permitir que los más pequeños migren más rápidamente.

En este caso, la subtipificación molecular de patógenos bacterianos consiste en extraer todo el ADN bacteriano y colocarlo en una matriz de agarosa para formar pequeños bloques que luego se someterán a una digestión sitio-específica llevada a cabo por enzimas de restricción de corte poco frecuente. Estos bloques se colocan cuidadosamente en un soporte en el cual se formará el gel. Luego de la corrida en PFGE el gel se tiñe, obteniéndose un patrón de bandas (“molecular fingerprints”) para cada bacteria ensayada. La técnica tiene un poder de resolución alto y es eficaz para comparar cepas, determinar relaciones genéticas entre ellas, así como para verificar brotes por lo cual es muy utilizada en epidemiología molecular.

En cuanto a la interpretación de los patrones de bandas obtenidos en el gel, el más utilizado es el criterio de Tenover quien ha establecido una relación entre la cantidad de bandas y distintos eventos genéticos que podrían haber sucedido. Se puede así establecer el grado de relación entre distintas cepas clasificándolas en indistinguibles, cercanamente relacionadas, posiblemente relacionadas y no relacionadas (Tenover et al., 1995).

1.4.1.1. Red PulseNet

PulseNet es una red internacional de subtipificación molecular para la vigilancia de ETA.

A principios de la década del 90 se registró un aumento de brotes de ETA en EE.UU. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) se enfrentó a un problema al comparar por medio de PFGE, los subtipos de los patógenos aislados relacionados con los brotes. Fue necesario normalizar y estandarizar el procedimiento y recoger los resultados enviados electrónicamente al CDC para su análisis. Fue así que se constituyó entonces la Red PulseNet USA (Swaminathan et al., 2001). El resultado fue exitoso y desde entonces se han creado Redes PulseNet en seis regiones: USA, Canadá, Europa, América Latina y el Caribe, África, Asia y el Pacífico, Oriente Medio; con un total de 83 países miembros, constituyen la Red PulseNet Internacional (“The International Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance”) (Figura1).

Uruguay es miembro de la Red PulseNet de América Latina y Caribe, integrada también por Argentina, Bolivia, Brasil, CAREC, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Guatemala, México, Nicaragua, Paraguay, Perú y Venezuela.

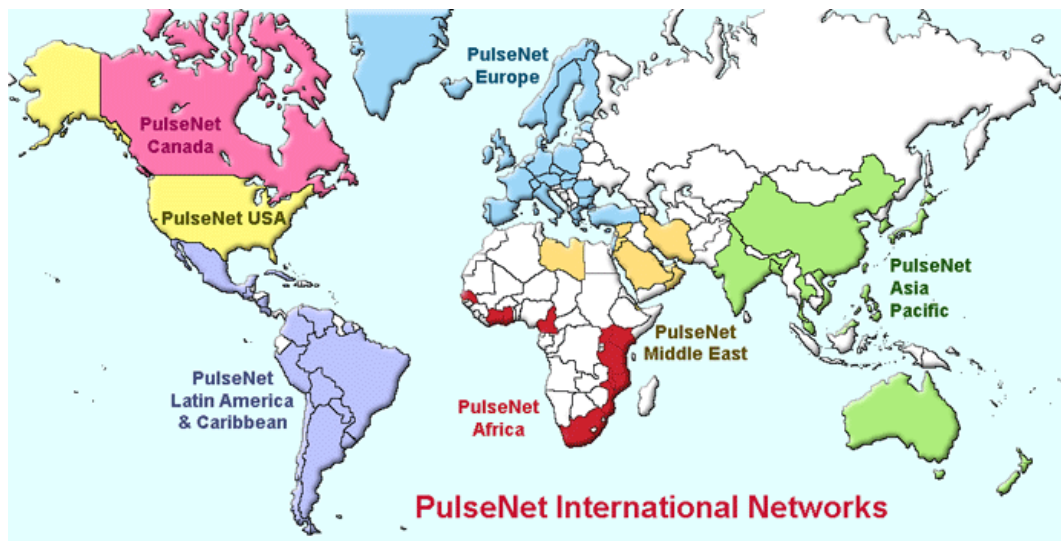


Figura 1: Regiones integrantes de PulseNet Internacional y países miembros.

Fuente: www.pulsenetinternational.org

Su propósito es mantener alianzas con los laboratorios de los distintos países para estar al tanto de los subtipos de las distintas cepas patógenas que circulan en la región a fin de mejorar y aumentar la vigilancia de ETA. Además colaborar en el desarrollo, validación y aplicación de los métodos de subtipificación normalizados a nivel mundial que serán utilizados en las redes.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

Caracterizar por métodos fenotípicos y genotípicos una colección de aislamientos de *Salmonella enterica* y *Shigella sonnei*, obtenidos en el marco de la vigilancia nacional de las enfermedades transmitidas por alimentos.

2.2.- Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípica y genotípicamente (PFGE) cepas de *Salmonella* BLEE positivas aisladas en Uruguay entre 2009 y 2011.
- Realizar un estudio filogenético de las cepas de *Salmonella* BLEE positivas para constatar si se trata de la misma cepa.
- Caracterizar fenotípica y genotípicamente (PFGE) cepas de *Shigella sonnei* aisladas en Uruguay en 2014.
- Realizar un estudio filogenético de cepas de *S. sonnei* aisladas en Uruguay en los años 2000 a 2014.
- Caracterizar fenotípica y genotípicamente (PFGE) cepas de *Shigella sonnei* causantes de un brote en el año 2013.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Material Biológico

De la colección de cepas del laboratorio conservadas en Skim Milk se utilizaron para la caracterización fenotípica y genotípica las siguientes:

- Seis *S. Typhimurium* (B7/11, S446, S458, S391, S299, S214) y una *S. Enteritidis* (S443) BLEE positivas
- Siete *S. sonnei* pertenecientes al brote número 5 del año 2013 (B5/13)
- Doce *S. sonnei* del año 2014 (SH152, SH153, SH154, SH155, SH156, SH157 SH 158, SH160, SH164, SH165, SH171, SH172), una de 2011(SH70) y una de 2004 (SH20).

3.2.- Identificación

3.2.1.- Aislamiento en placas

Las cepas de *Salmonella* y *Shigella* son remitidas por los laboratorios de diagnóstico clínico al DLPS como parte de la vigilancia nacional de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. En todos los casos se realizó un reaislamiento en placa de TSA (Trypticase Soya Agar) para obtener un cultivo puro a partir de una única colonia seleccionada. Se incubó por 24 horas a 35°C. A partir de una colonia de la placa de TSA se sembró, por el método de estrías, en medios selectivos y diferenciales: a) - Agar Mc Conkey, medio selectivo para enterobacterias y diferencial para microorganismos que fermentan o no la lactosa (Lac+ o Lac-, respectivamente). Los

microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras. b) - Agar SS (*Salmonella*- *Shigella*) selectivo para *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. ya que inhibe el crecimiento de Gram-positivos, coliformes y *Proteus* spp. y diferencial por fermentación de lactosa y producción de tiosulfato de sodio (H₂S). Los microorganismos que no fermentan lactosa producen colonias transparentes, y la producción de ácido sulfhídrico se evidencia por colonias con centro negro por la formación de sulfuro de hierro.

Los resultados típicos de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. sonnei* se observan en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados esperados para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. sonnei*

Medio	<i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i>
Mac Conkey	Lac-	Lac-
SS	Lac-, H ₂ S+	Lac-, H ₂ S-

3.2.2.- Pruebas bioquímicas

Todas las pruebas bioquímicas se realizaron en tubos de ensayo y se sembraron por piquete, por estría en la superficie o ambas, a partir de una colonia tomada de la placa de TSA. Se incubaron por 24 horas a 35°C.

TSI (del inglés: “Triple Sugar Iron”): permite estudiar la producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa, y también detectar la producción de H₂S que en caso de ser positivo se observa un coloreado negro. El medio sólido en el tubo se distribuye en forma de pico de flauta y se siembra por un piquete hasta el fondo y estriado en la superficie. Cuando el microorganismo es fermentador de glucosa y no de sacarosa el

medio se torna amarillo al fondo (ácido) y rojo hacia el pico (alcalino) y se dice que el resultado es K/A. Si es fermentador de lactosa y sacarosa será todo ácido (A/A) y si no es fermentador será alcalino (K/K).

LIA (del inglés: “Lysine Iron Agar”): es un medio diferencial para microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. También permite detectar producción de H₂S. El medio se distribuye en pico de flauta por lo que se siembra por piquete y estría. Los microorganismos lisina decarboxilasa positivos (LDC+) llevarán el medio a un color violeta, si son LDC- se verá el fondo amarillo y el pico violeta, y si hay desaminación de lisina el fondo será amarillo y el pico rojo.

Citrato de Simmons: utilización de citrato como única fuente de carbono. El medio, de color verde, se alcaliniza cuando hay crecimiento y se visualiza por un indicador que vira al azul. Se siembra por piquete y estría en superficie.

MIO (Movilidad- Indol- Ornitina): es un medio semisólido que se siembra por piquete hasta las 2/3 partes del tubo y permite evaluar tres características. La movilidad de la bacteria analizada, que se demuestra por enturbiamiento del medio o por el crecimiento debajo de la línea de inoculación, la presencia de ornitina (ODC+) que produce un viraje del medio al púrpura, y la presencia de indol, producido a partir de triptófano por microorganismos que tienen la enzima triptofanasa, se revela agregando unas gotas de Reactivo de Kovac's que vira al rojo cuando es positivo.

Agar Fenilalanina: detecta la capacidad de convertir la fenilalanina a ácido fenilpirúvico por acción de la enzima fenilalanina deaminasa. La presencia de ácido fenilpirúvico se evidencia con el agregado de cloruro férrico que forma un complejo de color verde. Se siembra por estría en la superficie.

Los resultados típicos de pruebas bioquímicas para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. sonnei* se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Resultados esperados para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. sonnei*.

Medio	<i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i>	<i>S. sonnei</i>
TSI	K/A, gas+/-, H ₂ S+	K/A, gas-, H ₂ S-
LIA	LDC+, H ₂ S+	LDC-, H ₂ S-
MIO	Mov+, Indol+, ODC+	Mov-, Indol-, ODC+
Citrato	+	-
Fenilalanina	-	-

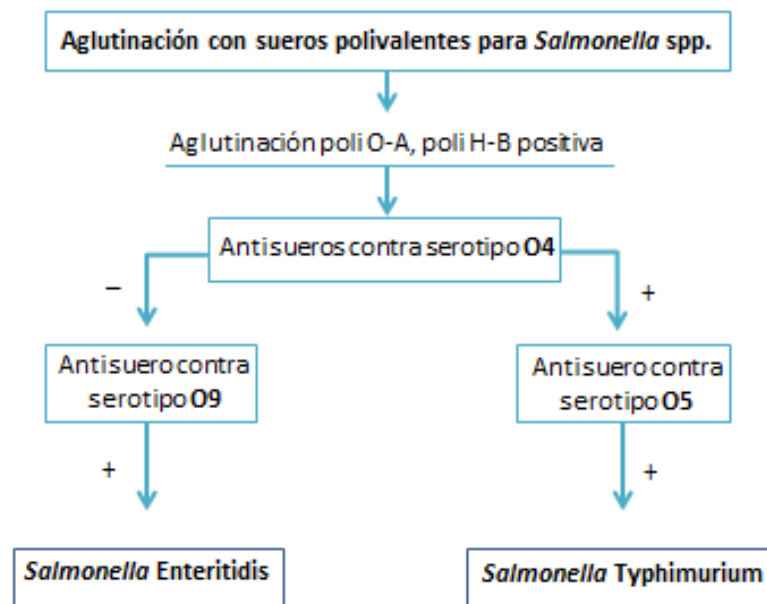
3.2.3.- Serotipificación

3.2.3.1.- Antígenos somáticos

La presencia de antígenos somáticos se realizó por la técnica de aglutinación en lámina con sueros polivalentes y monoespecíficos (Difco). Se utilizó una lámina de vidrio cuadrículada y una lámina de contraste color negro para observar aglutinación. En todos los casos se hizo un control negativo colocando 200 µL de suero fisiológico estéril y resuspendiendo la cepa con un ansa descartable, si no autoaglutinaba se proseguía a ensayar los sueros. Se colocaron 35 µL del suero a ensayar utilizando una cuadrícula para cada cepa tomada con un ansa descartable para resuspender en el suero. En una aglutinación positiva se observa la formación de grumos luego de mover suavemente la placa, si es negativa el preparado se observa liso.

Para *Salmonella* se ensayaron primero los antisueros polivalentes OA y HB por corresponder a las serovariedades más frecuentes: Enteritidis y Typhimurium. Luego se prosiguió a ensayar los antisueros monovalentes anti-antígeno somático O4, O9 y O5 en ese orden (Diagrama 1).

Diagrama 1: Ensayo de los antisueros polivalentes de Salmonella.



Para *Shigella* se ensayaron los sueros A, B, C y D para identificar *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, respectivamente.

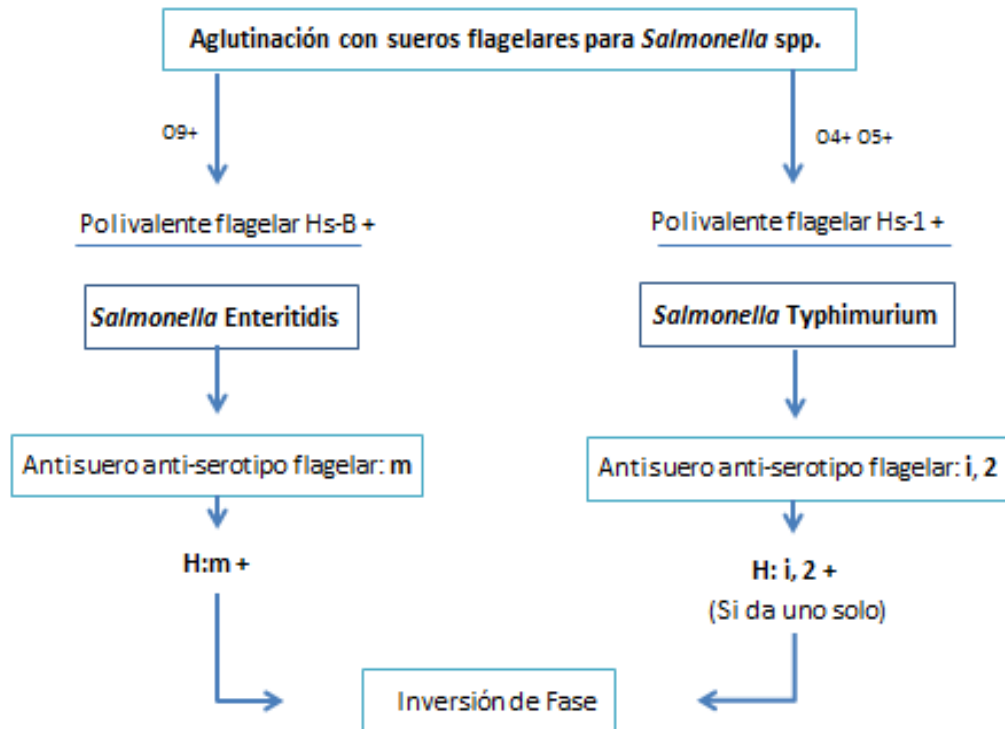
3.2.3.2.- Antígenos flagelares

Se evaluaron los antígenos flagelares: H:m para *S. Enteritidis* y H:i, 2 para *S. Typhimurium*.

Se realizó un pasaje de cada cepa en tubos de agar movilidad para

inducir la expresión flagelar, la siembra se realizó por piquete sólo en la parte superior del tubo. Se incubó a 35°C por 18 a 24 horas. Si hay movilidad se observa turbidez en todo el tubo. Se tomó 0.5 mL del agar movilidad y se colocó en tubo estéril de 13 x 100 mm de tapa a rosca, al caldo flagelar restante se le agregó 5 mL de solución fisiológica formolada (SFF) al 1% y se dejó reposar 1 hora a temperatura ambiente. Luego se procedió a ensayar los antisueros polivalentes flagelares HS-A, HS-B, HS-C, colocando una gota de cada uno en un tubo de ensayo y agregando 0.5 mL del caldo formolado. Se realizó un control positivo con 0.5 mL del antígeno a un tubo y un control negativo con 0.5 mL de SFF. Se incubó por 1 hora a 50°C en baño de agua y se observó si hubo aglutinación (presencia de flóculos) o no. La presencia de flóculos en uno o dos de los antisueros flagelares polivalentes conlleva a probar los antisueros de fase H correspondientes (m, i, 2) para esto se colocó una gota del antisuero más 0.5 mL del caldo formolado. En el caso de *S. Typhimurium* si sólo uno de los antisueros (i ó 2) es positivo se realiza inversión de fase. El método de inversión de fase consiste en promover la expresión de la otra proteína flagelar, en caso de que la cepa sea bifásica. Se fundió agar movilidad al 0.7% y se dejó enfriar a 50°C para mezclarlo en una caja de Petri con dos gotas del antisuero de la fase predeterminada y se dejó solidificar. Se sembró una ansada del cultivo sin formolar en el centro de la superficie del agar y se incubó a 35°C por 18 a 24 horas. Luego de la incubación se tomó el desarrollo bacteriano de la periferia de la placa y se enfrentó con el antisuero de la fase sospechada. Si los microorganismos aglutinan y el sobrenadante es claro se considera positivo, es decir que se expresó la proteína flagelar esperada (Diagrama 2).

Diagrama 2: Ensayo de los antisueros flagelares para *Salmonella*.



3.3.- Susceptibilidad a antimicrobianos

3.3.1.- Pruebas de disco-difusión

Se realizaron de acuerdo a las normas vigentes del “Clinical Laboratory Standard Institute” (CLSI, 2014) y a los antibióticos definidos para la vigilancia de ETA, se muestran en las Tablas 5 y 6. Se preparó, a partir de aislamientos en placas de TSA, un inóculo Mc Farland 0.5 en suero fisiológico estéril y se homogeneizó. En placa de Agar Mueller Hinton se sembró dicho inóculo con hisopo estéril estriando en tres direcciones para cubrir toda la superficie del agar. Posteriormente se colocaron los discos con los antibióticos a ensayar, manteniendo una distancia considerable entre éstos dentro de cada placa. Se incubó a 35°C por 18 a 24 horas.

Se midieron los diámetros de inhibición (en milímetros) alrededor de cada disco para establecer la sensibilidad de la cepa bacteriana que se reportará como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R).

Tabla 5: Antibióticos ensayados para *Salmonella* e interpretación de la susceptibilidad.

Antibiótico	Carga (µg)	S	I	R
Ampicilina	10	≥ 17	14-16	≤ 13
Trimetoprim-sulfametoxazol	25	≥ 16	11-15	≤ 10
Cloranfenicol	30	≥ 18	13-17	≤ 12
Ác. Nalidíxico	30	≥ 19	14-18	≤ 13
Ciprofloxacina	5	≥ 31	21-30	≤ 20
Tetraciclina	30	≥ 15	12-14	≤ 11
Ceftriaxona	30	≥ 23	20-22	≤ 19

Tabla 6: Antibióticos ensayados para *Shigella* e interpretación de la susceptibilidad.

Antibiótico	Carga (µg)	S	I	R
Ampicilina	10	≥ 17	14-16	≤ 13
Trimetoprim-sulfametoxazol	25	≥ 16	11-15	≤ 10
Cloranfenicol	30	≥ 18	13-17	≤ 12
Ác. Nalidíxico	30	≥ 19	14-18	≤ 13
Ciprofloxacina	5	≥ 31	16-20	≤ 20
Tetraciclina	30	≥ 15	12-14	≤ 11
Ceftriaxona	30	≥ 23	20-22	≤ 19
Gentamicina	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Azitromicina	15	≥ 13	-	≤ 12

3.3.2.- Test de sinergia de doble disco

Las cepas resistentes a ampicilina (Amp) y/o ceftriaxona (Cro) fueron analizadas por ser posibles productoras de BLEE. Se realizó un test de sinergia de doble disco utilizando cefotaxima (Ctx), ceftazidima (Caz) y un disco combinado de amoxicilina y clavulánico (AmC/Cla) al centro de la placa de Agar Mueller Hinton y entre los discos Ctx y Caz. El procedimiento utilizado fue el estándar de Kirby Bauer. Luego de la incubación se observó la deformación del halo de inhibición de las cefalosporinas hacia el disco de AmC/Cla indicando una prueba positiva (presencia de BLEE).

3.3.3.- Prueba confirmatoria para BLEE

Para las cepas en las cuales el resultado del test de sinergia de doble disco no fue claro, se realizó una prueba confirmatoria. En placa de Agar Mueller Hinton, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se colocó un disco de Ctx solo y otro de Ctx/Cla, y Caz solo y Caz/Cla. Un incremento mayor o igual a 5 mm en el halo de los antibióticos combinados respecto al antibiótico solo indica la presencia de BLEE.

3.4.- Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

El perfil genómico de todas las cepas estudiadas se estableció por la técnica de PFGE utilizando el protocolo de la Red PulseNet (CDC, 2000). Se utilizó la cepa de referencia *Salmonella* Branderup H9812 como marcador de peso molecular digerida con la enzima de restricción XbaI.

Todos los aislamientos se encontraban almacenados a -70°C en leche descremada estéril (Difco) por lo que, para su recuperación, se resembró dos veces en placa de TSA y se incubó a 35°C por 18 a 24 horas. Para la preparación del ADN se inocularon las cepas en 2 mL de tampón de

suspensión celular (BSC) hasta alcanzar una absorbancia de 0.9- 1.01 a 610 nm de longitud de onda. Se mezclaron 200 µL de cada suspensión celular con 10 µL de proteinasa K (20 mg/ mL) y 200 µL de agarosa SeaKem Gold 1% previamente termostatizada a 55°C, distribuyendo la mezcla en los pocillos para los bloques. Una vez gelificados los bloques de agarosa se procedió a realizar la lisis celular. En tubos tipo Falcon de 50 mL se colocaron 5 mL de tampón de lisis, 25 µL de proteinasa K y los bloques (hasta tres por tubo). Se llevó a baño de agua a 54°C con agitación de 150- 175 rpm durante 2 horas. Posteriormente se realizaron seis lavados consecutivos de 15 minutos cada uno, en baño de agua a 50°C y agitación 150- 175 rpm, dos con agua Milli Q y cuatro con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM). Luego de este procedimiento los bloques pueden almacenarse en 5 mL de tampón TE a 4°C o proseguir con la digestión. Para la digestión se corta una porción de aproximadamente 1/3 del bloque. Se obvió la etapa de pre-restricción (tampón de restricción sin la enzima) porque se observó que daba iguales resultados si no se realizaba.

Para la enzima de restricción XbaI (10 U/ µL) se realizó una dilución de 20 µL de buffer H, 175 µL de agua Milli Q y 5 µL de XbaI para cada bloque de agarosa, en tubos eppendorf. Se incubó en baño a 37°C por 1,5- 2 horas, luego se retiró y se quitó la solución con la enzima para agregar 200 µL de una solución 1:20 de TBE (Tris- borato- EDTA, pH 8) y agua bidestilada, para detener la digestión.

Para el armado del gel se colocaron los bloques digeridos en agarosa Seakem Gold al 1% en TBE 0.5X y la electroforesis fue realizada utilizando 100 mL de tampón TBE 0.5X con 1.9 L de agua bidestilada, bajo las siguientes condiciones: tiempo inicial 2.2 segundos, tiempo final 63.8 segundos para *Salmonella* y 54.2 para *Shigella*, ángulo de 120°, temperatura de 14°C, voltaje 6V/cm, con un tiempo total de corrida de 16

horas (Anexo I) y una intensidad de aproximadamente 120 mA, equipo CHEF-DR III System, Bio Rad. Existen distintos tipos de PFGE, el más utilizado es CHEF (del inglés, “Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields”). Este equipo tiene veinticuatro electrodos que se disponen en un contorno hexagonal, todos están conectados a la fuente de alimentación y tienen la misma resistencia, esto hace que el aparato genere campos uniformes de modo que los carriles del gel quedarán en forma recta (Basim & Basim, 2001).

El gel fue teñido con bromuro de etidio (1 µg/ mL) durante 30 minutos y lavado tres veces con agua destilada en agitación suave durante 20 minutos cada vez. Posteriormente el ADN se visualizó en un transiluminador con luz UV y se tomó la fotografía que fue guardada en formato tif con el programa ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, para su análisis.

3.4.1.- Análisis de los geles

El análisis de los patrones de PFGE fue realizado utilizando el programa computarizado de análisis GelCompare II versión 5.1. La cepa *S. Braenderup* H9812 fue utilizada como estándar de referencia para normalizar el gel, las bandas fueron designadas manualmente. Se utilizó el criterio de Tenover para clasificar los aislamientos: (i) aislamientos indistinguibles, aquellos que no tienen diferencias de bandas, (ii) cercanamente relacionados, los que difieren en 1 a 3 bandas, (iii) posiblemente relacionados, los que difieren en 4 a 6 bandas y (iv) no relacionados, los que difieren en 7 o más bandas (Tenover et al., 1995). Para visualizar las relaciones entre las distintas cepas se utilizó el índice DICE generando matrices de similitud y se construyeron dendrogramas utilizando el algoritmo UPGMA (del inglés, “unweighed pair-group method of averages algorithm”).

3.5.- Datos del Brote

Se realizó el estudio de un brote (b5/13) en una escuela de tiempo completo en San José el 4 de abril de 2013. Los afectados fueron 149 niños de entre 7 y 11 años de edad, cuyos síntomas fueron diarrea, vómitos, dolor abdominal y fiebre. Las muestras se recuperaron de 8 coprocultivos.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- *Salmonella*

4.1.1- Identificación

La identificación de las cepas según su crecimiento en placas (Agar Mac Conkey Lactosa y Agar SS) y pruebas bioquímicas (TSI, LIA, Citrato de Simmons, MIO y Agar Fenilalanina) mostraron resultados típicos para *Salmonella*.

La aglutinación en placa develó el serotipo de cada cepa analizada, resultando seis *S. Typhimurium* y una *S. Enteritidis* como se muestra en la Tabla 7. También se probaron los antisueros antiserotipo flagelar y se realizó inversión de fase cuando fue necesario, se observa en la Tabla 8.

Tabla 7: Serotipificación de *Salmonella enterica*

Sueros	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>
Poly A _i + V _i	+	+
Poly H	+	+
Poly OA	+	+
Poly OB	-	-
O4	+	-
O5	+	-
O9	-	+

Tabla 8: Antígenos flagelares de las cepas de *Salmonella*.

S. Typhimurium	H₂	H_i	Inv. De fase
B7/11	+	-	
S214	S/D		
S299	+	+	
S391	+	+	
S446	-	+	H ₂ +
S458	-	+	H ₂ +
S. Enteritidis	Hm		
S443	+		

S/D: sin dato

4.1.2.- Pruebas de susceptibilidad

En las pruebas de susceptibilidad por disco-difusión se observó resistencia a ampicilina (Amp) y ceftriaxona (Cro) y sensible para el resto, lo cual podría indicar probables cepas productoras de BLEE. En consecuencia se realizó el test de sinergia de doble disco. Los resultados obtenidos fueron positivos para S443, S446, S458 y S214 cuyas placas mostraron una clara ampliación del halo de inhibición de Ctx y/o Caz en la zona de intersección con AmC/Cla. A las cepas con resultado dudoso se les realizó una prueba confirmatoria para BLEE, su resultado se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Prueba confirmatoria para BLEE.

Cepa	CAZ/CLA	CTX/CLA	Sinergia
B7/11	Incr $\geq$ 5	Incr $\leq$ 5	Dudoso
S391	Incr $\geq$ 5	Incr $\geq$ 5	Positivo
S299	Incr $\geq$ 5	Incr $\leq$ 5	Dudoso

4.1.3.- PFGE

Para el análisis de los perfiles genéticos de *Salmonella* por PFGE se prepararon dos geles: uno con la enzima de restricción XbaI y otro con AvrII. Ambos geles fueron normalizados con el programa GelCompare II.

4.1.3.1.- PFGE- XbaI

En el gel de las cepas digeridas con XbaI (Figura 2) se observan cuatro *S. Typhimurium* con perfiles indistinguibles entre sí (S214, S299, S391, S446) por lo cual, siguiendo el criterio de Tenover, éstas se consideran del mismo pulsotipo. S458 difiere en la posición de una única banda, por lo que se clasificó como cercanamente relacionada con las cepas anteriores pudiendo ser un subtipo de éstas. En contraste, *S. Enteritidis* tiene un perfil de bandas claramente distinto del resto.

En el carril dos se observa la degradación de la cepa B7/11. Se ha visto que algunas bacterias sufren degradación en el proceso de PFGE, por lo que se consideran “no tipificables”. La causa de esta degradación es la presencia de radicales de actividad nucleolítica formados a partir de Tris en el ánodo del equipo de electroforesis (Ray et al., 1995). La cepa B7 fue probada varias veces y el resultado fue el mismo en todos los casos. Existen dos formas de revertir esta situación, una es cambiar el Tris por HEPES y la otra es el agregado de tiourea al tampón de corrida (Ray et al., 1995; Römling & Tümmler, 2000; Corkill et al., 2000).

Para este tipo de cepas la Red PulseNet ofrece un procedimiento operativo estándar que consiste en el agregado de 760 µL de solución de tiourea (50 µM) al tampón TBE 0.5X (2 L). La tiourea es tóxica por lo cual se recomienda que el equipo de electroforesis sea destinado específicamente para este uso ya que

requiere medidas de protección para quien lo manipule. Como el laboratorio no posee un equipo para este fin, no se realizó el procedimiento.

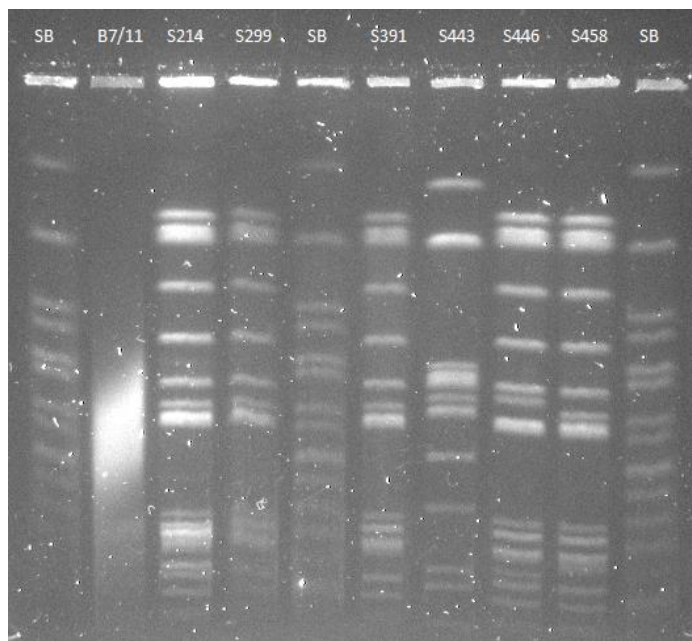


Figura 2: PFGE de *Salmonella* digerida con XbaI. Carriles 1, 5 y 10: marcador *S. Branderup*; carril 7 corresponde a la única *S. Enteritidis* y el resto de los carriles corresponden a *S. Typhimurium*.

El análisis filogenético se realizó con las cepas estudiadas digeridas con XbaI, a excepción de la B7/11 que se degradó en todas las ocasiones en las que se probó. También se agregaron tres *S. Typhimurium* BLEE positivas que se ingresaron luego en la base de datos de la Red PulseNet (STM663/12, STM701/12, STM702/12) (Figura 3).



Figura 3: Dendrograma de *Salmonella* productoras de BLEE.

Las cepas se nombran según: S (*Salmonella*), T (*Typhimurium*) o E (*Enteritidis*), M (Montevideo), el número de ingreso al laboratorio/ año. Por ejemplo la cepa S299 pasa a llamarse STM299/09.

El dendrograma mostró una similitud de 100% entre cuatro cepas (STM214/09, STM299/09, STM391/10 y STM446/11) y de 99% con una quinta (STM458/11). Estas 5 cepas portadoras de BLEE aisladas en distintos momentos de distintos pacientes, constituyen el grupo I, fueron consideradas el mismo clon. Los grupos II y III conformados cada uno por una única cepa, con un porcentaje de similitud de 92% (diferencia de dos bandas y en la posición de una tercera) fueron considerados como posibles relacionados pero distintos, de acuerdo a Tenover. Por último la cepa STM663/12 del grupo IV tiene un perfil de bandas que dista significativamente del resto (81% de similitud) y se consideró no relacionado genéticamente. Por último, la única cepa de *S. Enteritidis* SE443/11 se situó como grupo externo, con el 68% de relación con *S. Typhimurium*.

4.1.3.2.- PFGE- AvrII

El gel de las cepas digeridas con AvrII (Figura 4) mostró restricciones parciales en todos los casos (a excepción de la cepa de referencia que fue digerida con XbaI) por lo que no fue posible analizarlo. Se descartó la posibilidad de que fuera debido a cualquiera de los tampones y a los bloques de agarosa, ya que los mismos materiales fueron utilizados para el gel con XbaI. Por lo tanto se le atribuyó la restricción parcial al lote de la enzima utilizada, ya sea porque la concentración de enzima no fuera la suficiente, porque el lote haya estado en malas condiciones o porque la enzima no sea adecuada para la técnica de PFGE. Para confirmar cual pudo haber sido la causa se podría haber dejado los bloques con la solución de restricción más horas o aumentar la cantidad de enzima utilizada, si ninguna de estas pruebas funcionara se puede decir que el lote era defectuoso, al menos para esta técnica. Aunque estas condiciones no fueron probadas, existen antecedentes de otras experiencias fallidas con el mismo lote.

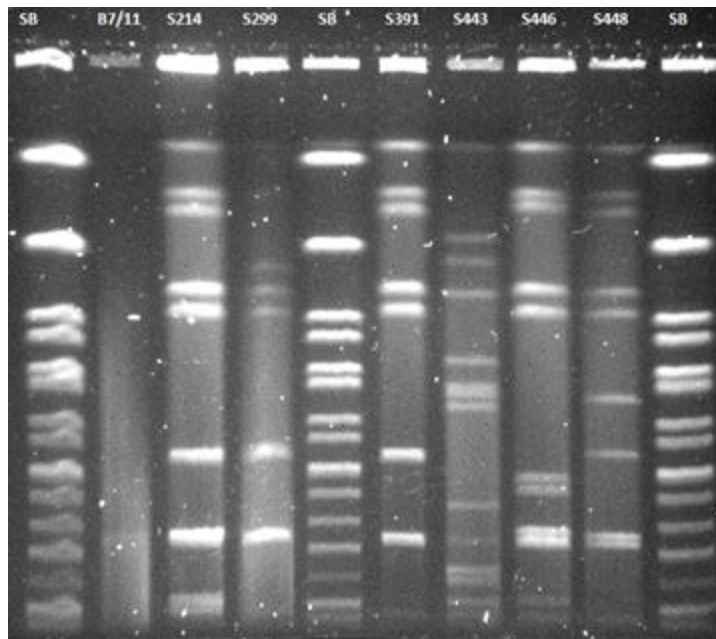


Figura 4: PFGE de *Salmonella* digerida con AvrII. Los carriles 1, 5 y 10 corresponden al marcador *S. Branderup*. En el carril 7 se encuentra la única *S. Enteritidis* y en los restantes *S. Typhimurium*. Se observa restricción parcial en todas las cepas a excepción del marcador con XbaI.

4.2.-*Shigella*

4.2.1.- Identificación y susceptibilidad antimicrobiana

La identificación de las cepas se realizó mediante aislamiento en placas Mc Conkey y SS, las pruebas bioquímicas utilizadas fueron las mismas que para *Salmonella* obteniéndose los resultados típicos de *S. sonnei*.

La aglutinación en placa fue positiva para el antisuero ensayado D correspondiente a *S. sonnei*. En las pruebas de disco- difusión la mayoría de las cepas fueron sensibles a todos los antibióticos probados, a excepción de SH172

resistente a ampicilina, trimetoprim- sulfametoxazol, cloranfenicol y tetraciclina; y SH155 resistente a ampicilina y , trimetoprim-sulfametoxazol.

4.2.2.- PFGE

Se hicieron dos geles por PFGE con la enzima de restricción XbaI. En el primer gel que incluyó algunas cepas de 2014 (SH160 a SH172) y las cepas de 2011 y 2004, SH70 y SH20 respectivamente no hubo una correcta normalización. Probablemente por el desplazamiento de las bandas hacia la parte inferior del gel. Este gel no brindó una buena resolución (Figura 5) por lo que los resultados no fueron incluidos en el dendrograma de cepas circulantes en Uruguay y tampoco fue analizado.

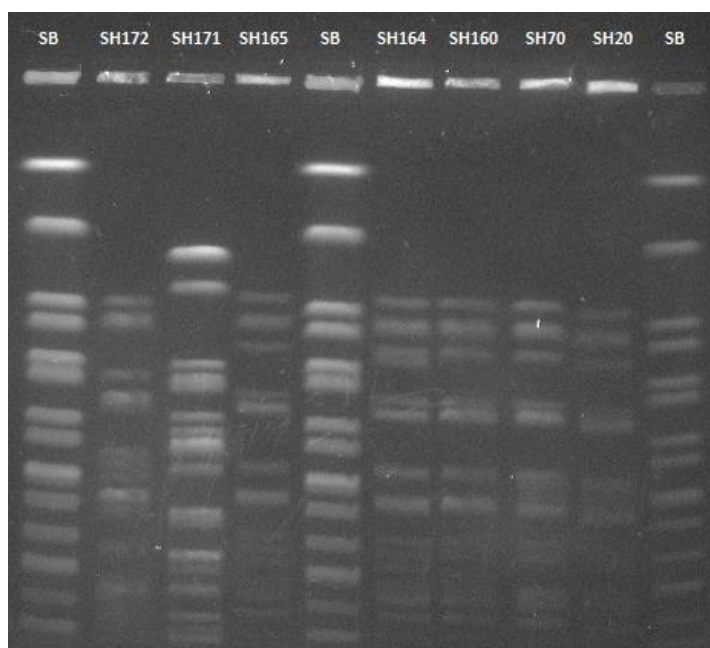


Figura 5: PFGE de *Shigella sonnei* digerida con XbaI. Carriles 1, 5 y 10: marcador S. Branderup. Carriles 2, 3, 4, 6 y 7: *S. sonnei* del año 2014. Carril 8 *S. sonnei* de 2011 y carril 9 *S. sonnei* de 2004.

En el segundo gel se incluyeron únicamente cepas de *S. sonnei* de 2014, SH152 a SH158 (Figura 6). Se normalizó con el GelCompare II y se incluyó en la base de datos de la Red PulseNet.

Los carriles 2, 3, 4 y 9 presentan un perfil de bandas indistinguibles entre sí, las cepas de los carriles 7 y 8 difieren en una única banda por lo que se consideraron posiblemente relacionadas entre sí y también posiblemente relacionadas con las de los carriles 2, 3, 4 y 9. En contraste, la cepa del carril 6 tiene el perfil más distinto.

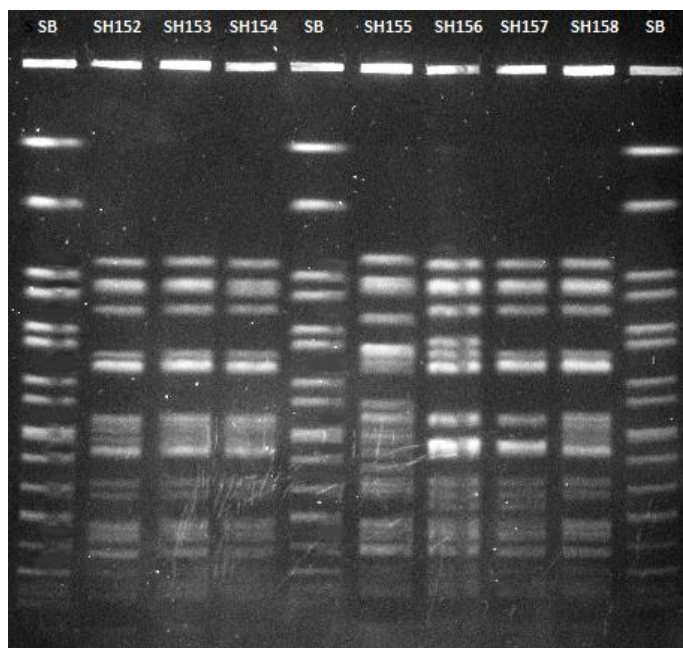


Figura 6: PFGE de *Shigella sonnei* digerida con XbaI. Carriles 1, 5 y 10: marcador S. Branderup. Todos los otros carriles pertenecen a *S. sonnei* del 2014.

4.2.3.- Brote de *S. sonnei*

Los resultados de las pruebas bioquímicas y serológicas fueron positivos para *S. sonnei*, todas sensibles a los antibióticos probados en la prueba de disco-difusión.

Según la encuesta alimentaria realizada: los niños desayunan, almuerzan y meriendan en la escuela. Algunos alimentos del almuerzo y desayuno de los días 3 y 4 de abril fueron analizados pero no se recuperó la cepa del brote.

4.2.3.1.- PFGE- *Xba*I y análisis filogenético

Se realizó un análisis por PFGE con la enzima de restricción *Xba*I con siete de las cepas recuperadas de los coprocultivos (Figura 7). Los perfiles de bandas indistinguibles entre sí confirman que la enfermedad fue provocada por la misma cepa.

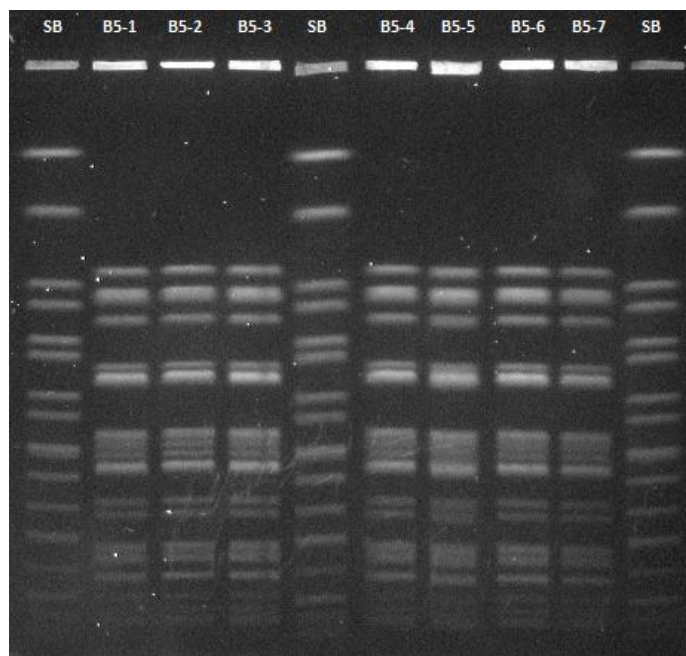


Figura 7: PFGE de un brote de *S. sonnei* digerida con *Xba*I. Carriles 1, 5 y 10: marcador *S. Branderup*, carriles 2 a 4 y 6 a 9: cepas del brote recuperadas de 7 coprocultivos.

Los perfiles genéticos obtenidos fueron analizados en un dendrograma y se utilizó una cepa de perfil diferente de *S. sonnei* (SH13) como grupo externo (Figura 8). Todos los perfiles fueron idénticos con el 100% de similitud. SH13 utilizada como grupo externo solamente muestra 80% de similitud con el resto. Cada cepa se nombró como b5 (brote informado número 5) seguido del número de cepa.

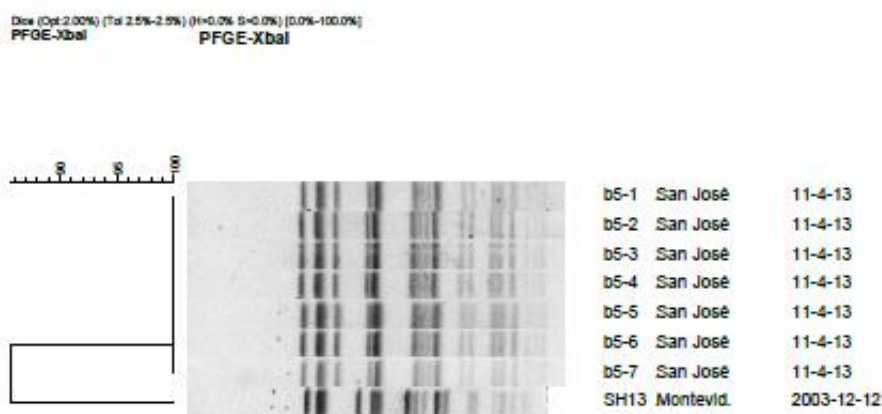


Figura 8: Dendrograma de un brote de *S. sonnei*.

4.2.4.- Análisis filogenético de cepas de *S. sonnei* circulantes en Uruguay (2000- 2014)

Para el análisis de las cepas de *S. sonnei* circulantes en Uruguay, se realizó un dendrograma utilizando los geles de las figuras 5 y 6, y además se agregaron todas las cepas de *S. sonnei* de Uruguay ingresadas anteriormente en la base de datos. Se analizaron cepas del período 2000 a 2014, siendo en total 42 cepas (Figura 9).

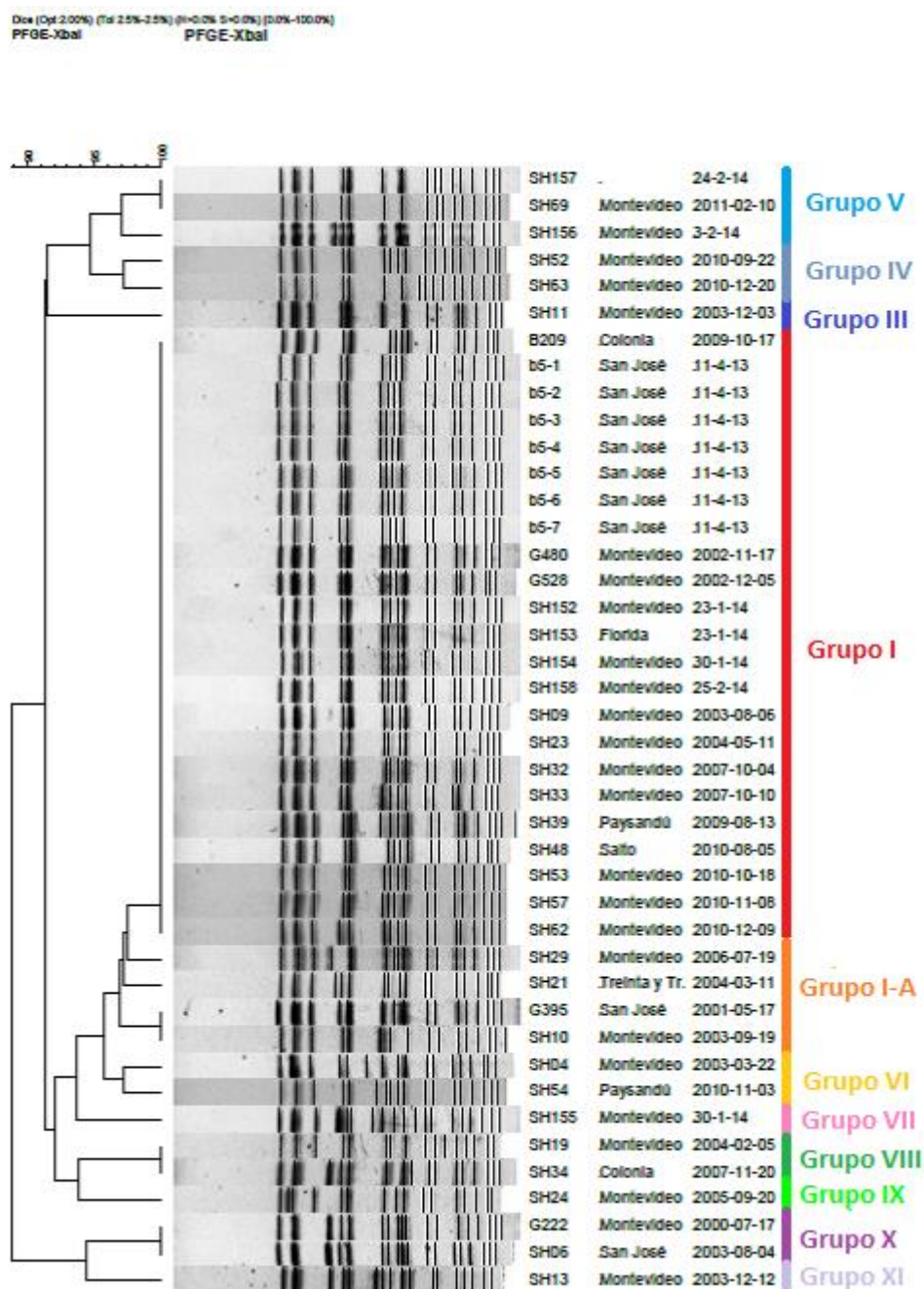


Figura 9: Dendrograma de la cepas de *S. sonnei* circulantes en Uruguay entre 2000 y 2014.

Existe claramente un pulsotipo mayoritario, un grupo extenso con 100% de similitud dentro del cual se encuentra la cepa del brote (b5/13), cepas del año 2002, 2003, 2004, 2007, 2009, 2010 y 2014. Este grupo se denominó Grupo I y está cercanamente emparentado con otro más pequeño y menos frecuente con el que mantiene una similitud 97% por lo que podría ser considerado un subtipo (Grupo I-A). El resto de las cepas se encuentran conformando grupos más pequeños en número: desde una cepa (perfiles únicos) hasta tres, con 97% a 100% de similitud entre ellos (Grupos II a XI).

Los antecedentes muestran que *S. sonnei* es un microorganismo genéticamente muy conservado (Karaolis et al., 1994). Estudios recientes han sugerido que la diversidad de linajes de *S. sonnei* surge a partir de un único ancestro común que existió hace menos de 500 años (Holt et al., 2012). A raíz de ese estudio se planteó la necesidad de estudiar la diversidad en América Latina, por lo cual se elaboró un proyecto de colaboración entre los países miembros de la Red PulseNet y Wellcome Trust Sanger Institute. A los aislamientos ya caracterizados por PFGE en cada país se les realizó una secuenciación completa del genoma en Sanger Institute (datos no publicados). Se observó que la mayoría de las cepas de *S. sonnei* circulantes en Uruguay entre los años 2000 y 2011 (un total de 30 cepas) formaban parte de un cluster regional y se ubicaban dentro de un linaje único (linaje II) del cluster, a excepción de 2 cepas que se ubicaron en otras partes del árbol filogenético (Anexo II). Se debe observar también que, al parecer, no hay intercambio de cepas entre Uruguay y otros países ya que no se ubicaron cepas de otras regiones en el cluster donde se encuentran la mayoría de los aislados uruguayos, no obstante la conducción del intercambio entre países o su falta no está clara.

Si bien el análisis filogenético presentado en este trabajo incluyó cepas aisladas hasta el 2014, se puede suponer que los grupos con mayor porcentaje de similitud que aparecen en el dendrograma pertenecen al linaje II.

5.- CONCLUSIONES

5.1.- *Salmonella Typhimurium* productora de BLEE

- Cuatro de los aislamientos de *S. Typhimurium* productores de BLEE correspondían al mismo pulsotipo y un quinto tenía 99% de similitud con los anteriores, lo cual sugiere una expansión clonal.
- Las otras tres cepas que se analizaron se consideraron diferentes entre sí y al resto, es decir que sugieren una co-circulación de clones de diferentes orígenes.
- Teniendo en cuenta que todas fueron aisladas en un período corto de tiempo, sería conveniente un análisis filogenético más profundo como la secuenciación del genoma completo para comprobar las relaciones genéticas entre las cepas que se catalogaron como no relacionadas.

5.2.- *Shigella sonnei*

- La identidad genética de los aislamientos de *S. sonnei* con las mismas características fenotípicas de 8 coprocultivos provenientes de un brote se corroboró mediante PFGE.
- El estudio filogenético realizado con cepas de 2000 a 2014, mostró que 24 de los 42 perfiles que se analizaron (incluyendo 7 correspondientes a la cepa del brote) tienen 100% de similitud.
- La preponderancia de este grupo sobre todos los otros, bastante reducidos en número, indica que hay un genotipo con mayor prevalencia.

5.3.- Conclusión general

La técnica de PFGE resultó útil para determinar relaciones de parentesco tanto de cepas de *Salmonella enterica* como de *Shigella sonnei*.

REFERENCIAS

Alcaine SD, Warnick LD, and Wiedmann M. Antimicrobial resistance in nontyphoidal Salmonella. Journal of Food Protection, 70(3): 780-790, 2007.

Baker Kate. Report on whole genome sequencing of *Shigella sonnei* across Latin America. Wellcome Trust Sanger Institute (Datos no publicados).

Barrett T, Gerner-Smidt P, and Swaminathan B. Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Foodborne Disease Investigations and Surveillance. Foodborne Pathogens and Disease, 3(1): 20-31, 2006.

Basim E & Basim H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. Turk J Biol, 25: 405-418, 2001.

Bauernfeind A, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Röhnisch T, Schweighart S, Wilhelm R, Casellas J.M, Goldberg M. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella* Typhimurium. Infection, 20:158-163, 1992.

Brenner F, Villar R, Angulo F, Tauxe R and Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature, Journal of Clinical Microbiology. 38(7): 2465-2467, 2000.

Bush K, Jacoby G, Madeiros A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother, 39:1211-1233, 1995.

Centers for Disease Control and Prevention. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulsed-field gel electrophoresis: training manual. Atlanta: CDC; 2000.

CLSI. Performance Standards for Antibiotic Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, Wayne P.A. CLSI document M100-S24: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

Corkill J, Graham R, Hart C, Stubbs S. Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from *Clostridium difficile* PCR ribotype 1 strains. Journal of Clinical Microbiology, 38(7): 2791-2792, 2000.

Foley SL and Lynne AM. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance, Journal of Animal Science, 86(14): E173-E187, 2008.

Guáveta. División de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles. Programa de Salud Pública Veterinaria. I.N.P.P.A.Z. 1993.

Gutmann L, Ferre B, Goldstein F, Risk N, Pinto E, Acar J, Collatz E. SHV-5, a novel SHV-type β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. Antimicrob Agent Chemother, 33:951-956, 1989.

Holt KE, Baker S, Weill FX, Holmes EC, Kitchen A, Yu J, Sangal V, Brown DJ, Coia JE, Kim DW, Choi SY, Kim SH, da Silveira WD, Pickard DJ, Farrar JJ, Parkhill J, Thomson NR. *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. Nature genetics, 44(9):1056-1059, 2012.

Jacoby G & Munoz S. The new β -lactamases. N Engl J Med, 352: 380-391, 2005.

Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. Sequence variation in *Shigella sonnei* (Sonnei), a pathogenic clone of *Escherichia coli*, over four continents and 41 years. Journal of Clinical Microbiology, 32(3):796-802, 1994.

Knothe H, Shah V, Kremery M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection, 11:315-317, 1983.

Linder, E. Toxicología de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 53-65, 1995.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock, Biología de los Microorganismos. Octava edición revisada. Prentice Hall Iberia. Madrid, 1999.

Mather AE, Reid SWJ, Maskell DJ et al., Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts, *Science*, 341(6153):1514-1517, 2013.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., ASM Press. 719-28, 2003.

Olsen A, Hammark T. Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica*; and the dumpfly, *Hidrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera muscidae) at caged layer houses. *J Food Prot* 70:958-960, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Pfaller M, Sagreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum- β -lactamases. *Clin Infect Dis*, 42: S153- S163, 2006.

Popoff, MY. Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars, 8th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Reserch on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France, 2001.

Ray T, Mills A, Dyson P. Tris-dependent oxidative DNA strand scission during electrophoresis. *Electrophoresis*, 16(6): 888-894, 1995.

Römling U and Tümmler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1): 464-465, 2000.

Salam M, Bennish M. Antimicrobial therapy for shigellosis. *Reviews of Infectious Diseases*, 13(4): S332-S341, 1991.

Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, Cantor CR. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 47(1): 189-195, 1982.

Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance, Drugs, The Scientific World Journal, 62(4): 557-566, 2002.

Swaminathan B, Barrett T, Hunter S, and Tauxe R. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborn bacterial disease surveillance in the United States. Emerg. Infect. Dis. 7:382-389, 2001.

Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233–2239, 1995.

Torres M, Pérez M, Schelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, et al. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. J Clin Microbiol, 39(6): 2134-2139, 2001.

Vignoli R, Cordeiro N, García V, Mota M, Betancor L, Power P, Chabalgoity J, Schelotto F, Gutkind G, Ayala J. New TEM-derived extended-spectrum β -lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* serovar derby isolates from Uruguay. Antimicrob Agent Chemother, 50:781-784, 2006.

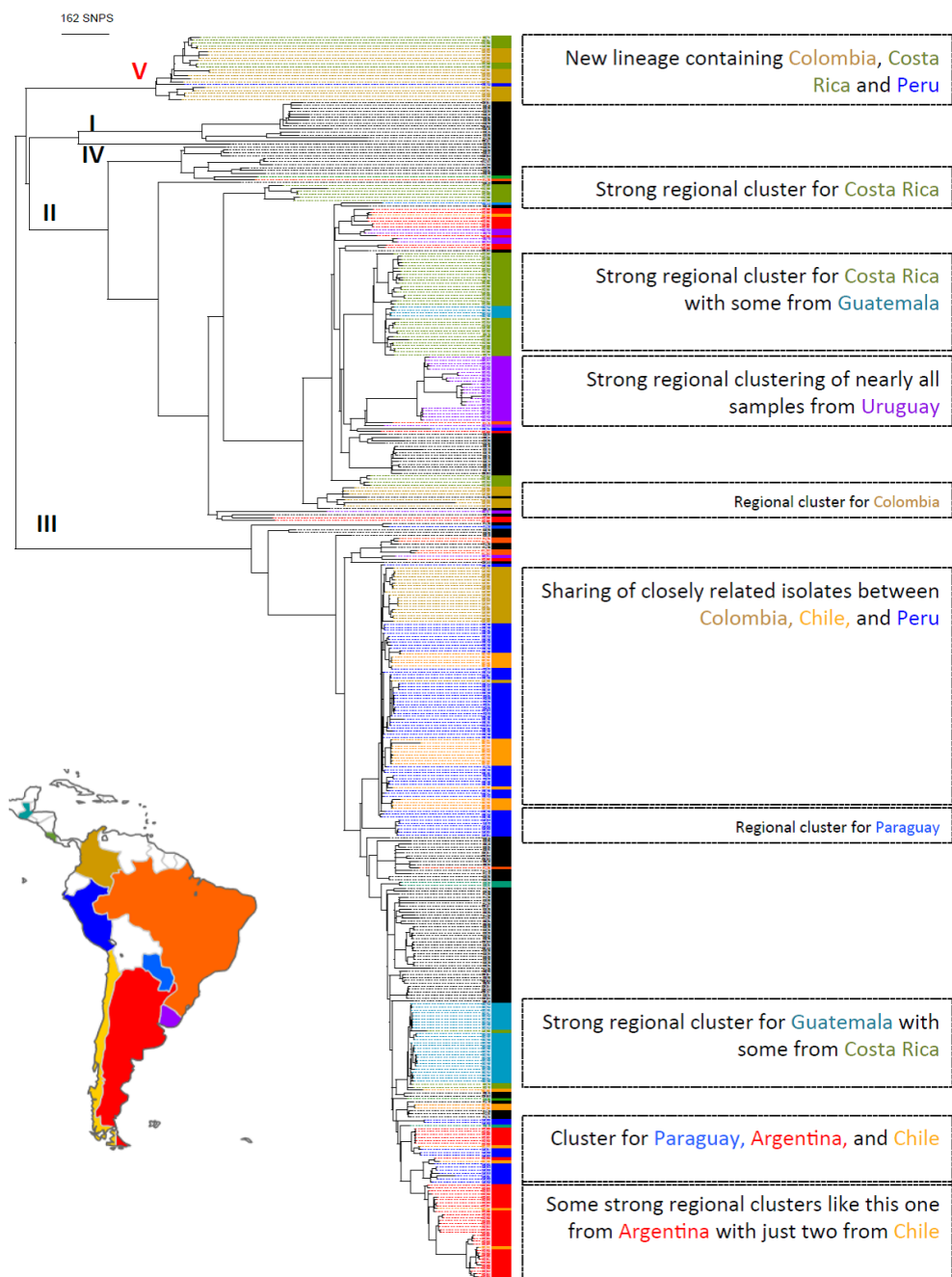
www.pulsenetinternational.org – Consultado: Julio 2015.

ANEXO I

Anterior a la realización de los geles de *Shigella sonnei* que se muestran en el trabajo se realizó otro bajo las condiciones estandarizadas por PulseNet. El bandeo que se obtuvo se vio desplazado hacia abajo por lo cual las bandas inferiores no estaban bien resueltas. Se pensó que al aumentar el tiempo de corrida podría mejorar la resolución de los fragmentos más pequeños, por lo cual se modificó el tiempo de corrida de 16 a 16,5 horas (Figura 5) sin embargo este gel no normalizó correctamente mostrando el mismo defecto que el anterior. Para la corrida siguiente (Figura 6) se agregó más tiempo de corrida: 16,7 y si bien logró normalizar aún se encontraba difuso el bandeo de la parte inferior. Para el gel con las cepas del brote (Figura 7) se decidió utilizar otra estrategia: se cambió el lote de buffer TBE 10X, se dispuso un tiempo de corrida de 16,6 horas y se colocó el peine dado vuelta en el soporte lo cual daría más espacio en la parte inferior del gel, el resultado fue una mejora reflejada en la normalización con Gel Compare II.

ANEXO II

Árbol filogenético realizado en el proyecto entre Wellcome Trust Sanger Institute con la Red PulseNet América Latina y el Caribe. Para realizarlo se secuenciaron los genomas completos de cepas de *S. sonnei* de los distintos países de América Latina ingresadas en la base de datos de PulseNet.



ey (Country): Argentina Brazil Canada Chile Colombia Costa Rica Cuba Dominican Republic French Guiana Guatemala Haiti Mexico Paraguay Peru USA Uruguay

Árbol filogenético realizado según la secuencia de los genomas de las cepas de *S. sonnei* circulantes en América Latina. Se observa un fuerte cluster regional de Uruguay (violeta) pertenecientes al linaje II, en el cual se ubican la gran mayoría de las cepas uruguayas analizadas y no se encuentran allí cepas aisladas de otros países. Datos no publicados (Kate Baker Report- Wellcome True Sanger Institute, Red PulseNet América Latina y el Caribe).

