

Informe Proyecto de Investigación

***Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de
Salmonella spp. asociados a ETA 2016-2018***

Oficina de Laboratorios y Control de Calidad

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Bebidas

**Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
INVIMA**

Bogotá D.C., Octubre 2023

Mariela Pardo Corredor

Directora General (E)

Carlos Alberto Robles Cocuyame

Director de Alimentos y Bebidas

Amelia Velasco Corredor

Jefe Oficina de Laboratorios y Control de Calidad

Ligia Alexandra Otero Castro

Coordinadora Laboratorio Microbiología de Alimentos y Bebidas

Elaborado por

Miguel Díaz

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Bebidas

Revisado por

Claudia González

Doris Gartner

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Bebidas

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
3. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3.1 Diseño del estudio	3
3.2 Objetivo general	3
3.3 Objetivos específicos	3
3.4 Aislamientos bacterianos	3
3.5 Susceptibilidad antimicrobiana	4
3.6 Detección de genes de resistencia a los antimicrobianos	4
3.7 Genotipificación de <i>Salmonella</i> spp. por PFGE	4
3.8 Análisis estadístico	5
4. RESULTADOS	5
4.1 Aislamientos bacterianos	5
4.2 Serotipos de <i>Salmonella</i> spp.	6
4.3 Categoría de Alimento	7
4.4 Susceptibilidad antimicrobiana	8
4.5 Detección de genes de resistencia a los antimicrobianos	11
4.6 Genotipificación de <i>Salmonella</i> spp. por PFGE	11
4.7 Análisis de agrupamiento	12
5. COMENTARIOS FINALES	14
6. BIBLIOGRAFÍA	15

1. INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos-ETA causadas por serotipos de *Salmonella* no Typhi representan un importante problema de salud pública y una carga económica en varios países a nivel mundial (1). Aunque las infecciones en humanos por estos serotipos generalmente resultan en enfermedades diarreicas auto-limitantes, se ha estimado que causan 93,8 millones de infecciones entéricas y 155.000 muertes por enfermedad diarreica cada año (2). Aproximadamente el 95% de la salmonelosis en humanos se ha asociado principalmente al consumo de alimentos contaminados tanto de origen animal: huevos, aves, leche, res, cerdo como de frutas y vegetales (3). Adicionalmente, se ha asociado con otros modos de transmisión como el contacto directo o indirecto con mascotas, reptiles, anfibios y agua contaminada (4).

El uso de antimicrobianos en animales para producción de alimentos de consumo humano en diferentes propósitos, incluido el tratamiento de infecciones, prevención de enfermedades y promotores de crecimiento, ha sido el principal factor para la diseminación de la resistencia bacteriana a los humanos a través de la cadena agroalimentaria (5). El incremento en la resistencia antimicrobiana en los serotipos de *Salmonella* no Typhi ha sido un problema serio de salud pública global. Los datos de vigilancia muestran un incremento esperado de la resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp., del 20% al 30% a principios de los años 90 y un incremento de hasta un 70% en algunos países a finales del siglo XX (6).

Debido al problema de la resistencia antimicrobiana que limita en gran medida las opciones de tratamiento y la reducción en el desempeño de algunos agentes antibacterianos, de primera línea como ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim (7). Las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de tercera generación quedan como agentes terapéuticos con relativa efectividad que podrían ser de elección bajo estas circunstancias. De igual manera, se ha reportado en países de bajos ingresos hospitalarios por la diseminación de resistencia por la presencia de β -lactamasas de espectro extendido en aislamiento de *Salmonella* spp. (8, 9).

Las técnicas de tipificación molecular son de gran utilidad para mejorar el conocimiento con relación a las rutas de infección de microorganismos patógenos (10). La serotipificación de *Salmonella* spp. en conjunto con técnicas moleculares como la electroforesis en gel de campo pulsado (Siglas en inglés PFGE), se ha utilizado para estudios epidemiológicos para identificar las relaciones genéticas entre los microorganismos, detectar y establecer brotes y determinar la asociación entre salmonelosis humana y el consumo de alimentos de origen animal (11). Igualmente permite

identificar posibles fuentes de infección y rutas de contaminación que ayuden al desarrollo e implementación de programas de control de salmonelosis en el país.

2. MARCO TEÓRICO

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados y móviles por flagelos peritricos, excepto *Salmonella* ser. Gallinarum biovars Gallinarum y Pullorum, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (12). Están ampliamente dispersas en la naturaleza y habitan por lo general el tracto intestinal de animales domésticos, salvajes, reptiles, aves, y hasta insectos. La transmisión a humanos está principalmente asociada con la ingestión de alimentos contaminados con la bacteria como resultado de la contaminación cruzada, contacto directo con animales o medio ambiente contaminado con materia fecal, almacenamiento inadecuado de alimentos, mala práctica de manipulación, inadecuado ciclos de enfriamiento y calentamiento (13). Las ETA son reconocidas como la principal causa de infección por *Salmonella*, con varias fuentes de alimentos y proveedores implicados en esas infecciones (14).

De acuerdo con estudios de hibridación de ADN, la clasificación taxonómica de *Salmonella* spp. reconoce dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *S. enterica* se subdivide con base a sus características bioquímicas en seis subespecies referidas por nombres y números romanos: *S. enterica* (I), *S. salamae* (II), *S. arizonae* (IIIa), *S. diarizonae* (IIIb), *S. houtenae* (IV), y *S. indica* (VI) (15). La serotipificación de *Salmonella* spp. se basa en el esquema de White-Kauffmann-Le Minor que identifica tres tipos de estructuras antigénicas: el antígeno somático (O) que hace parte de los Lipopolisacáridos-LPS componente integral de la membrana externa, los flagelos compuestos por unidades de proteína llamada flagelina conocida como antígeno flagelar (H) y el antígeno capsular (Vi) (16). El esquema ha permitido hasta la fecha la identificación de 2659 serotipos, en donde la especie *S. enterica* agrupa la mayoría de serotipos que son patógenos tanto para humanos como animales (17). La serotipificación de *Salmonella* en la vigilancia epidemiológica es importante para determinar la tendencia de la enfermedad y la frecuencia de serotipos que circulan a nivel local, regional y nacional, además, la detección oportuna de los brotes y su investigación proveen información primordial para identificar la fuente de infección, las vías de transmisión y verificar la eficiencia de los mecanismos de control en la prevención de su diseminación (18).

Las infecciones causadas por *Salmonella* spp. resistente a los antibióticos son un problema de interés universal, en particular, en aquellos países donde el riesgo de infección es mayor debido a las deficientes condiciones higiénico-sanitarias en la manipulación y preparación de alimentos, así como el consumo de alimentos de origen animal crudos o poco cocidos (19). Hay una creciente preocupación con estos patógenos debido a la emergencia que representan en la diseminación de la resistencia a otras bacterias, que se puedan detectar en diferentes alimentos de origen animal en el mundo, lo cual se ha atribuido en gran medida al uso inapropiado de antimicrobianos como agentes terapéuticos, profilácticos y metafiláctico en medicina humana y veterinaria (20).

Los aislamientos de *Salmonella* spp. con resistencia a varios agentes antimicrobianos, en particular, a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación son considerados como un problema emergente a nivel mundial (21) resultando en fallas terapéuticas, mayor estadía hospitalaria, lo que se traduce en mayores costos en tratamiento y un incremento en el riesgo de mortalidad. Esto puede representar un riesgo en salud pública por la transferencia de aislamientos de *Salmonella* spp. con resistencia a humanos a través del consumo de alimentos contaminados. La tasa de resistencia en *Salmonella* varía con relación a los serotipos y los diferentes antibióticos analizados. *Salmonella* ser. Enteritidis uno de los serotipos más prevalente, es más sensible a la mayoría de los antibióticos que otros serotipos. Mientras que *Salmonella* ser. Typhimurium presenta las más altas tasas de resistencia (22).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

Este estudio empleó un diseño retrospectivo observacional con un muestreo por conveniencia contemplado en el periodo 2016-2018.

3.2 Objetivo general

Caracterizar por medio de técnicas fenotípicas y genotípicas los aislamientos de *Salmonella* spp. asociados a ETA recuperados entre 2016 y 2018.

3.3 Objetivos específicos

- Identificar el serotipo en los aislamientos de *Salmonella* spp.
- Establecer los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de *Salmonella*.
- Detectar la presencia de enzimas β -lactamasas de espectro extendido en *Salmonella*.
- Determinar la diversidad genética de los aislamientos de *Salmonella*.

3.4 Aislamientos bacterianos

En el estudio se incluyeron 38 aislamientos de *Salmonella* spp. que hacen parte de la Vigilancia por Laboratorio de ETA. Del 2016 se incluyeron 11 aislamientos de los cuales dos aislamientos fueron remitidos por los Laboratorios Departamentales de Salud-LDSP y 9 aislamientos fueron obtenidos de 176 muestras de alimentos procesadas en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Bebidas –LMAB del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos-INVIMA. Del 2017 se incluyeron seis aislamientos remitidos por los LDSP y ocho aislamientos obtenidos del procesamiento de 169 muestras de alimentos en el LMAB. Del 2018 13 aislamientos que incluyeron 6 aislamientos remitidos por los LDSP y 7 aislamientos obtenidos de procesar 81 alimentos en el LMAB.

Todos los aislamientos de *Salmonella* spp. se confirmaron con pruebas bioquímicas manuales como el API 20E (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) y automatizadas con el panel UNMIC-407 (BD

Diagnostic Systems, Maryland, USA), antes de pasar al proceso de serotipificación. La identificación del serotipo se realizó con antisueros (Becton Dickinson, Sparks, USA) y (Denka Seiken Co., LTD., Tokyo, Japón) de acuerdo con el esquema de White-Kauffmann-Le Minor (23). La identificación del serotipo en los aislamientos de *Salmonella* spp. se realizó también con el sistema automatizado RiboPrinter® (Qualicon Diagnostics LLC, Wilmington, DE) con la enzima de restricción *smal* de acuerdo con las instrucciones del fabricante, los patrones de bandeo se compararon con la base de datos Dupont ID® de 2014 con el programa RiboExplorer versión 2.1. con el objetivo de definir el nombre del serotipo en aquellos aislamientos no tipificables por antisueros (ausencia en la expresión de alguno de los antígenos o aislamientos rugosos).

3.5 Susceptibilidad antimicrobiana

Se realizó la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria-CIM con el sistema automatizado Phoenix 100 y el panel regional UNMIC-407 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Diagnostic Systems, Maryland, USA). Se evaluaron los siguientes antibióticos: Amikacina: AN; Ampicilina: AM, Amoxicilina/clavulanato: AMC, Cefazolin: CZ, Cefepime: FEP, Cefoxitin: FOX, Ceftazidima: CAZ, Ceftriaxona: CRO, Cefuroxima: CXM, Ciprofloxacina: CIP, Ertapenem: ETP, Gentamicina: GM, Imipenem: IPM, Levofloxacina: LVX, Meropenem: MEM, Nitrofurantoina: FM, Norfloxacina: NOR, Piperacilina/tazobactam: TZP, Tigeciclina: TGC, Trimetoprim/Sulfametoxazol: SXT, Tetraciclina: TE (BD Diagnostic Systems, Maryland, USA). La CIM se interpretó de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de cada año.

La presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se confirmó con el método de difusión con disco combinado utilizando discos de cefotaxima y ceftazidima con y sin ácido clavulánico (24). Las cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 se utilizaron como control de calidad para las pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria-CIM y el método de difusión de disco combinado. Se definieron como bacterias multirresistentes aquellos aislamientos con resistencia al menos 1 agente en 3 o más categorías de antimicrobianos (25).

3.6 Detección de genes de resistencia a los antimicrobianos

Se utilizó una PCR múltiple para la detección de los genes *bla* (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}) en los aislamientos de *Salmonella* spp. utilizando iniciadores publicados previamente (26-28).

3.7 Genotipificación de *Salmonella* spp. por PFGE

La subtipificación molecular se realizó mediante la técnica de PFGE utilizando el equipo CHEFF-DR III (Biorad-EEUU), la enzima de restricción *Xba*I (Promega, USA) y como marcador de peso molecular universal se utilizó la cepa de referencia *Salmonella* Braenderup H9812 ATCC de acuerdo con el protocolo estandarizado de Red PulseNet (30). Los patrones de bandas generados por PFGE se analizaron con el programa Bionumerics, versión 5.1 (Applied Maths, Bélgica), utilizando en configuración el coeficiente de Dice para determinar la matriz de distancia con una optimización de 1,5 % y una tolerancia de 1,5 % en la posición de las bandas y para la construcción del dendrograma, se utilizó el algoritmo UPGMA (siglas en inglés de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). De acuerdo con las recomendaciones de la Red PulseNet, los patrones de bandeo de *Xba*I-PFGE se identificaron con la asignación de un código único para cada uno de los perfiles de PFGE

obtenidos, por ejemplo, el código COJPXX01.0001 está compuesto por el país Colombia (CO), el serotipo Typhimurium (JPX), la enzima de restricción *Xba*I (X01) y el número consecutivo del patrón (0001) en la base de datos nacional. La definición de las categorías de las relaciones genéticas entre los aislamientos se basó en los criterios de Tenover (29).

3.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se tabularon y consolidaron en hojas de Excel con el programa Microsoft Office Excel® 2013. En la presentación de los resultados se utilizó estadística descriptiva para calcular la distribución de cada una de las variables de interés por frecuencia absoluta y porcentaje.

Todas las muestras de alimentos se clasificaron dentro de categorías de alimentos, que los agrupan de acuerdo con la matriz de origen, composición y procesos de elaboración. Las categorías de alimentos definidas fueron: alimentos compuestos; alimentos infantiles y otros regímenes nutricionales; bebidas (excluidos los productos lácteos); carne y derivados cárnicos; cereales y productos a base de cereales; frutas, hortalizas y sus derivados; grasas y aceites; huevo y productos a base de huevo; leche y derivados lácteos; productos de la pesca y sus derivados; productos de confitería; panela, azúcar, jarabes y miel; sal, especias, aderezos, condimentos, vinagre y salsas y otros (incluye alimentos que no se clasifican dentro de ninguna de las anteriores categorías).

4. RESULTADOS

4.1 Aislamientos bacterianos

Los 38 aislamientos bacterianos incluidos en el estudio provenían de 13 departamentos, siendo Atlántico el departamento con el mayor número de aislamientos aportados, en la figura 1, se muestra la distribución de aislamientos por departamento.

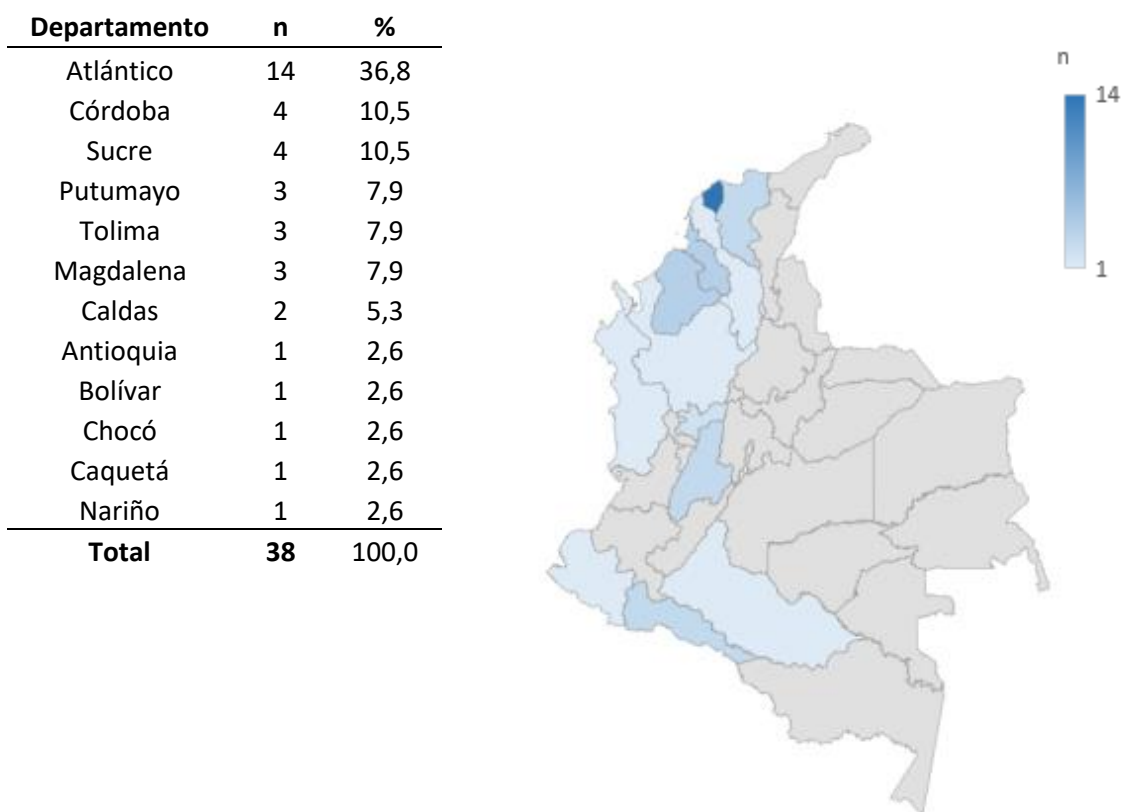


Figura 1. Distribución de aislamientos bacterianos asociados a casos de ETA por área geográfica 2016 -2018

4.2 Serotipos de *Salmonella* spp.

Se identificaron 18 serotipos en los 38 aislamientos de estudio, de los cuales 15 fueron designados con el nombre específico del serotipo y los 3 restantes se designaron con la fórmula antigénica de acuerdo con las recomendaciones del CDC (31) debido a que no se detectaron todos los antígenos por ser aislamientos rugosos o aflagelares. El serotipo con mayor frecuencia en los tres años fue *Salmonella* ser. Typhimurium con 7 (18,4%) aislamientos. En la Tabla 1, se observa la distribución de serotipos identificados.

Serotipo	Año			Total	
	2016	2017	2018		
	n	n	%		
Typhimurium	3	3	1	7	18,4
Bardo	0	4	0	4	10,5
Enteritidis	2	0	1	3	7,9
Abaetetuba	0	0	3	3	7,9
Uganda	0	0	3	3	7,9
Anatum	1	0	2	3	7,9
Chomedey	0	2	0	2	5,3
Saintpaul	0	2	0	2	5,3
I Rugosa:-:-	1	1	0	2	5,3
Brazzaville	0	0	1	1	2,6
Duesseldorf	1	0	0	1	2,6
Give	0	0	1	1	2,6
Hadar	1	0	0	1	2,6
Infantis	1	0	0	1	2,6
Javiana	0	1	0	1	2,6
Newport	0	1	0	1	2,6
I 3,10:-:-	1	0	0	1	2,6
I Rugosa:y:1,2	0	0	1	1	2,6
Total	11	14	13	38	100,0

Tabla 1. Distribución de serotipos de *Salmonella* spp. por año

Cabe destacar que en 3 de los 4 aislamientos no tipificables por la técnica de serotipificación, se identificó el nombre específico del serotipo por la técnica de Ribotipificación. Los serotipos *Salmonella* ser. I 3,10:-:- y *Salmonella* ser. I Rugosa:-:- se identificaron ambos como *Salmonella* ser. Enteritidis, mientras que el serotipo *Salmonella* ser. I Rugosa:y:1,2 se identificó como *Salmonella* ser. Altendorf. No se logró definir nombre del serotipo en el otro aislamiento de *Salmonella* ser. Rugosa:-:-

4.3 Categoría de Alimento

La principal categoría de alimento asociada a casos de ETA fue la leche y derivados lácteos con 31 (81,6%) muestras, representado en queso fresco. En la figura 2. Se establecen las demás categorías de alimentos de las muestras con concepto rechazado.

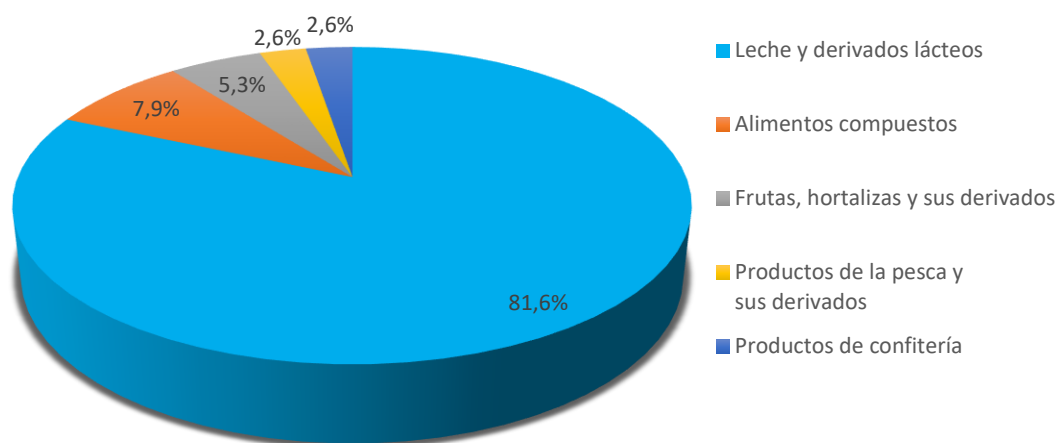


Figura 2. Distribución muestras con concepto rechazado por categoría de alimento 2016-2018

4.4 Susceptibilidad antimicrobiana

La mayoría de los aislamientos de *Salmonella* spp. 74% (28/38) fueron sensibles a todos los antimicrobianos evaluados (perfil pansensible), mientras que el 24% (9/38) de los aislamientos fueron resistentes a tetraciclina, el 3% (1/38) con resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol y el 3% (1/38) con resistencia tanto a ampicilina como cefuroxima y ceftriaxona. Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana se muestran en la tabla 2 y figura 3.

Antimicrobiano	Año		
	2016 (n=11)	2017 (n=14)	2018 (n=13)
Amikacina	0	0	0
Ampicilina	1	0	0
Cefazolina	0	0	0
Cefepime	0	0	0
Cefotaxime	0	0	0
Ceftazidima	0	0	0
Ceftriaxona	1	0	0
Cefuroxima	1	0	0
Ciprofloxacina	0	0	0
Ertapenem	0	0	0
Gentamicina	0	0	0
Meropenem	0	0	0
Trimetoprim/ sulfametoxazol	0	0	1
Tetraciclina	1	2	6

Tabla 2. Distribución de aislamientos con resistencia antimicrobiana por año.

Ninguno de los aislamientos de *Salmonella* spp. presentó perfil de multirresistencia. En la tabla 3. se muestran los perfiles de resistencia por serotipo.

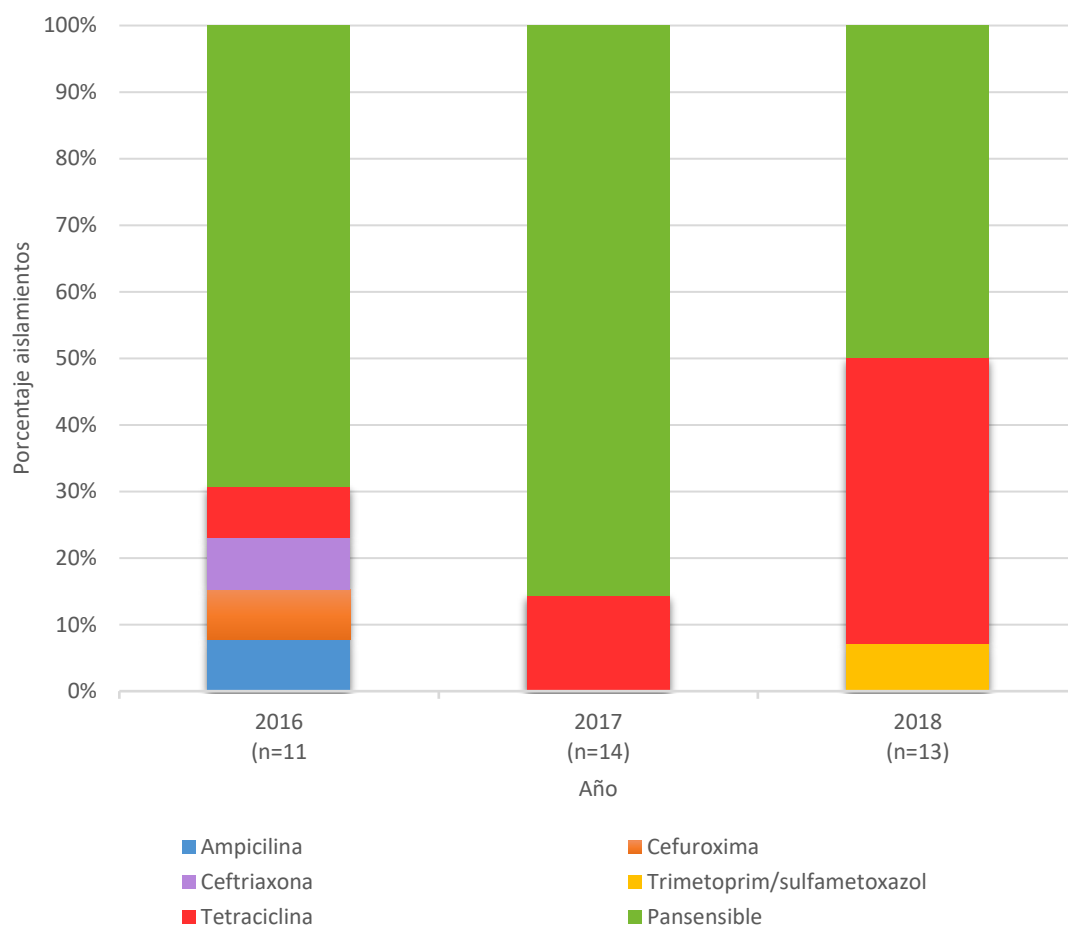


Figura 3. Distribución perfiles de RAM en *Salmonella* spp. por año 2016-2018

Serotipo	n	Perfil de resistencia*
Abaetetuba	3	TE
Chomedey	2	TE
Anatum	2	TE
Hadar	1	TE
Infantis	1	AM-CXM-CRO
I Rugosa:y:1,2	1	TE- SXT
Total	10	

*TE: tetraciclina; AM: ampicilina; CXM: cefuroxima; CRO: ceftriaxona; SXT: trimetoprim- sulfametoxazol

Tabla 3. Distribución de perfiles de RAM por serotipos de *Salmonella* spp. 2016-2018

4.5 Detección de genes de resistencia a los antimicrobianos

Ninguno de los aislamientos evaluados presentó genes *bla* (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}).

4.6 Genotipificación de *Salmonella* spp. por PFGE

Se obtuvieron patrones electroforéticos en 33 de los 38 aislamientos de *Salmonella* spp., ya que 5 aislamientos (2 pertenecientes al serotipo Saintpaul, 1 Javiana, 1 Typhimurium y 1 Newport) no fueron subtipificables por la técnica de PFGE debido a que no presentaron perfil de bandas para su análisis (líneas con DNA smearing). Además, se excluyó del análisis de agrupamiento *Salmonella* ser. I Rugosa:-:- debido a que es un aislamiento no tipificable por serotipificación y no cumple con el requisito de tener un nombre de serotipo definido para ser incluido dentro del análisis de patrones de PFGE; por lo tanto, quedaron en total 32 aislamientos para ser incluidos en los análisis de genotipificación.

Con la digestión de la enzima *Xba*I del ADN cromosómico de los 32 aislamientos de *Salmonella* spp. se obtuvieron 17 patrones únicos de *Xba*I-PFGE diferentes, cada perfil de bandeo estuvo conformado entre 12 a 17 fragmentos de restricción, con pesos moleculares entre 19,12 y 1.156 kbp (figura 4). Los patrones prevalentes fueron COJEGX01.0001 identificado en 5 (15,6%) aislamientos, seguido por COJREX01.0001, COTEGX01.0002, COJPXX01.0008 y COTDWX01.0001 con 3 (9,4%) aislamientos cada uno, en la tabla 4 se muestran los patrones de bandeo identificados en los 32 aislamientos de *Salmonella* spp. Los patrones únicos estuvieron representados por aislamientos que podían provenir del mismo o diferente departamento y estar asociados a uno o más tipos de alimento, por ende, se determinó que los 5 aislamientos de *Salmonella* ser. Enteritidis con patrón único COJEGX01.0001 se encontró que provenían de los departamentos de Tolima con 2 aislamientos, Caldas con 2 aislamientos y Nariño con 1 aislamiento y asociados a diferentes alimentos como queso, postre, pollo y galantina de pollo. Mientras que en los 3 aislamientos de *Salmonella* ser. Typhimurium con patrón COJPXX01.0008 se asociaron con el consumo de queso los cuales fueron remitidos desde diferentes departamentos Atlántico, Magdalena y Caquetá; en el caso de *Salmonella* ser. Abaetetuba con patrón único COJREX01.0001 todos los aislamientos se encontraron asociados a muestras de queso y provenían del mismo departamento Atlántico y municipio Sabanalarga, lo mismo con los 3 aislamientos de *Salmonella* ser. Bardo con patrón único COTEGX01.0002 se recuperaron todos de muestras de queso y del mismo departamento Atlántico.

Patrón <i>Xba</i> I-PFGE*	n	%
COJEGX01.0001	5	15,6
COJREX01.0001	3	9,4
COTEGX01.0002	3	9,4
COJPXX01.0008	3	9,4
COTDWX01.0001	3	9,4
COJAGX01.0002	2	6,3
COJPXX01.0007	2	6,3
COCHOX01.0001	2	6,3
Otros [§]	9	28,1
Total	32	100,0

*JEG: Enteritidis; JRE: Abaetetuba; TEG: Bardo; JPX: Typhimurium; TDW: Uganda; JAG: Anatum; CHO: Chomedei

[§]COJPXX01.0010, COJEXX01.0002, COALTX01.0001, COTDKX01.0001, COBRAX01.0001, COJFX01.0001, COSDFX01.0001, COTEGX01.0001

Tabla 4. Distribución de patrones de *Xba*I-PFGE de *Salmonella* spp.

4.7 Análisis de agrupamiento

En general los 32 aislamientos con diferentes serotipos presentaron una similitud de 59,20% con base en el análisis de los patrones de restricción. El serotipo con la mayor diversidad de patrones de PFGE fue *Salmonella* ser. Typhimurium con 3 patrones únicos: COJPXX01.0007 con 2 aislamientos, COJPXX01.0008 con 3 aislamientos y COJPXX01.0010 con 1 aislamiento mostrando un rango de similitud genética de entre 88,9% y 100 % con 3 grupos definidos por cada uno de los patrones únicos encontrados. Sin embargo, los aislamientos de *Salmonella* ser. Enteritidis fueron indistinguibles formando un solo grupo homogéneo con un 100% de similitud muy característico en los análisis de PFGE. Así mismo, la técnica de PFGE permitió confirmar la identificación del serotipo Enteritidis en dos aislamientos que no se habían logrado identificar por la técnica de serotipificación pero que a través de la ribotipificación se había identificado como *Salmonella* ser. Enteritidis, lo que evidencia la utilidad del análisis de patrones de restricción no solo para determinar relaciones genéticas entre aislamientos bacterianos, sino también la identificación de serotipos en los casos en los que no se expresan los antígenos o flagelinas.

Dice (Cpt:1.50%) (Tol: 1.5%-1.5%) (H=0.0% S=0.0%) (0.0%-100.0%)
PFGE-XbaI

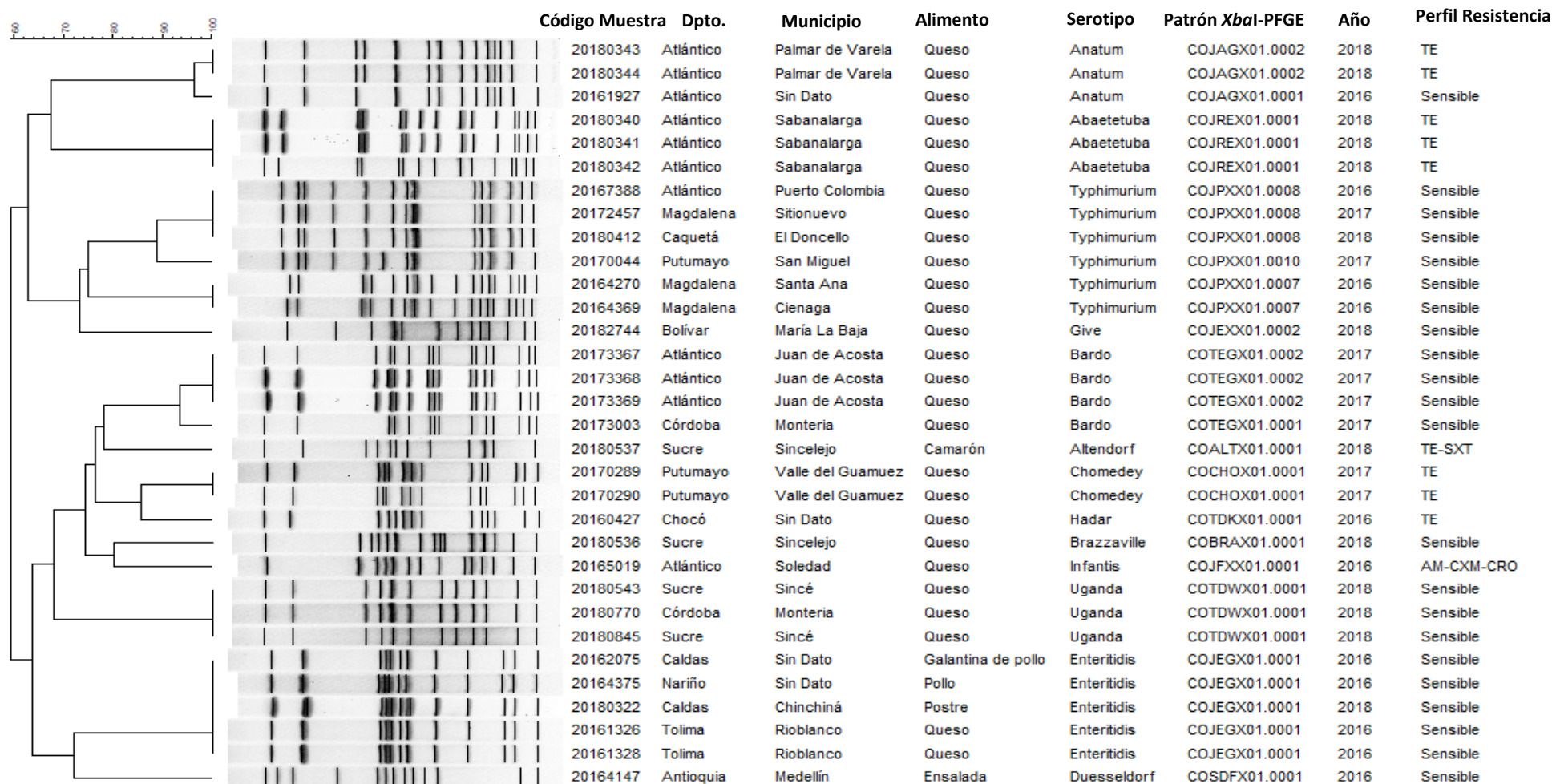


Figura 4. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas con base a los patrones de PFGE-XbaI entre los 32 aislamientos de *Salmonella* spp., 2016-2018.

5. COMENTARIOS FINALES

En diferentes estudios a nivel mundial, *Salmonella* ser. Typhimurium es el serotipo más frecuente tanto en el área de inocuidad de alimentos, como en salud humana y bienestar animal, lo cual se observó en este estudio, sin embargo, se evidenció que en general los aislamientos recuperados de ETA que fueron incluidas este estudio, hay una mayor frecuencia del perfil pansensible contrastando con los perfiles de resistencia observados en aislamientos provenientes de humanos y animales, donde el uso y prescripción de antimicrobianos es mayor.

Se demostró la utilidad de la técnica de PFGE como metodología de apoyo en la identificación del nombre del serotipo en el caso de aislamientos que no expresan los antígenos somáticos o flagelinas.

El queso fue el principal alimento implicado en los casos de ETA y se encontró asociado a una diversidad de serotipos de *Salmonella* spp. en especial el serotipo Typhimurium que fue el más frecuente y donde se presentaron diferentes porcentajes de similitud con base a los patrones de *Xba*I-PFGE.

Con el dendrograma se determinó que la técnica de PFGE diferencia los aislamientos de *Salmonella* spp. en varios grupos que se correlacionan con los serotipos a los cuales pertenecen, definiendo de esta manera el grado de similitud que pueden presentar con base a los patrones de restricción entre los serotipos a los cuales pertenecen.

Aunque este estudio se incluyó un pequeño grupo de aislamientos, se observó que existe un posible clon de *Salmonella* ser. Typhimurium con patrón COJPXX01.0008 que podría estar circulando en los departamentos de Atlántico, Magdalena y Caquetá, así como otro clon relacionado con los aislamientos de *Salmonella* ser. Enteritidis con patrón COJEGX01.0001 detectado en los departamentos de Tolima, Caldas y Nariño. Sin embargo, se debe tener presente el poder de resolución de la técnica de PFGE con este último serotipo en particular y confirmar estos clones con metodologías de secuenciación genómica completa.

Con estos resultados obtenidos en los aislamientos de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos se podría realizar un análisis a futuro con muestras de los respectivos pacientes de los casos de ETA notificados para establecer una la relación con el posible agente causal de contaminación, fortaleciendo el análisis integrado de los datos que se recopilan entre el INVIMA y el Instituto Nacional de Salud-INS.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Stat Q. 1997;50:81–9.
2. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, O'Brein SJ, Jones TF, The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010;50:882–9.
3. Vugia, D. J., M. Samuel, M. M. Farley, R. Marcus, B. Shiferaw, S. Shallow, K. Smith, and F. J. Angulo. 2004. Invasive Salmonella infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. Clin. Infect. Dis. 38:S149–S156.
4. Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S, Daily P, Bender J, Koehler J, Marcus R, Angulo FJ. Reptiles, amphibians, and human Salmonella infection: a population-based, case-control study. Emerging Infections Program FoodNet Working Group.
5. Angulo F, Nargund V, Chiller T. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2004; 51: 374–9.
6. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. Antimicrobial resistance in nontyphoid Salmonella serotypes: a global challenge. Clin Infect Dis. 2004 15;39:546-51.
7. Van Boxtael S, Dierick K, Van Huffel X, Uyttendaele M, Berkvens D, et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of Salmonella Typhimurium isolated from pigs, pork, and humans in Belgium between 2001 and 2006. Food Res Int 2012; 45:913–918.
8. Zaidi MS, Leon V, Canche C, et al. Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant blaCMY-2 Salmonella Typhimurium in Mexico. J Antimicrob Chemother 2007; 60:398-401.
9. Usha G1, Chunderika M, Prashini M, Willem SA, Yusuf ES. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases in Salmonella spp. at a tertiary hospital in Durban, South Africa. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(1):86-91.
10. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Euro Surveill. 2013 Jan 24;18(4):20380.
11. McLaughlin, J. B., L. J. Castrodale, M. J. Gardner, R. Ahmed, and B. D. Gessner. 2006. Outbreak of multidrug-resistant Salmonella typhimurium associated with ground beef served at a school potluck. J Food Prot 69 (3):666-670.
12. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Stockbine NA. Escherichia, Shigella, and Salmonella. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White
13. Carrasco E., Morales-Rueda A., García-Gimeno R. M. Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: a review. Food Research International. 2012;45(2):545–556.
14. S. E. Majowicz, J. Musto, E. Scallan et al., "The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis," Clinical Infectious Diseases, vol. 50, no. 6, pp. 882–889, 2010

15. Popoff MY. Antigenic formulas of the Salmonella serovars 8th revision, WHO Collaborating Centre for Reference Research on Salmonella, Institute Pasteur, Paris, 2001.
16. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. Carbohydr Res 2003;338:2431–47.
17. Joys TM. The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of Salmonella Typhimurium and its comparison with other flagellins. J Biol Chem 1985;260:15758–61.
18. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, *et al.*, Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2014;165:526–30.
19. Olsen SJ, Bishop R, Brenner FW, Roels TH, Bean N, Tauxe RV. The changing epidemiology of Salmonella: trends in serotypes isolated from humans in the United State, 1987–1997. J Infect Dis 2001;183:753–61.
20. Chin J (ed.). El control de las enfermedades transmisibles. 17a ed. Publicación Científica y Técnica N° 581. Washington: OPS/OMS; 2001. p. 552-560.
21. WHO (World Health Organization), The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance: Options for Action, WHO, Geneva, Switzerland, 2012.
22. WHO (World Health Organization), Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, WHO, Geneva, Switzerland, 2014
23. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. Antimicrobial resistance in nontyphoid Salmonella serotypes: a global challenge. Clin Infect Dis. 2004 15;39:546–51.
24. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur; 2007. Disponible en: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf. Consultado 10 de octubre de 2018.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S24:2014. Wayne, PA: CLSI; 2014.
26. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.*, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18:268–81)
27. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2010;65(3):490–495.
28. Bonnet, R., Sampaio, J. L. M., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C. & Sirot, J. A novel CTX-M b-lactamase (CTX-M- 8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44: 1936–42.
29. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. APMIS. 2007;115(12):1400–1408.

29. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33:2233-9.
30. Procedimiento Operativo Estándar para PFGE de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Shigella sonnei*, PNL05 Last Updated December 2017. disponible en: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
31. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.