Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología

CLONALIDAD DE *Salmonella*, serotipo Typhi: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Memoria presentada para optar al
Grado de Doctor en Farmacia
por M. Aurora Echeita Sarrionandia

Madrid, 1996

A la memoria de mi padre y a mi madre

A Jesus

A mi hijo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel A. Usera Gonzalez, por su estímulo y dirección en esta Tesis y por tantas horas de trabajo compartido.

Al Dr. Juan Antonio Sáez Nieto, Jefe del Servicio de Bacteriología, por su apoyo y actitud de ayuda.

Al Dr. Cesar Nombela Cano, por haber accedido a ser el Tutor de esta Tesis.

Al Dr. Julio Vazquez Moreno y a Carmen Pelaz Antolín que con la lectura crítica de este trabajo y con sus apreciados consejos han contribuido a su perfeccionamiento.

A Ana Aladueña, por su asesoramiento en la discusión de los resultados de la fagotipificación de *Salmonella*, serotipo Typhi.

A mis compañeras Rosa Díez, Rafaela Gutierrez, Paquita Cerdán, Manuela de la Fuente y Vicenta Cárdaba, que con su bien hacer en el trabajo del laboratorio de Referencia de *Salmonella* han permitido que surgiera esta Tesis.

A todos mis compañeros del Servicio de Bacteriología y en especial a aquellos con los que comparto tantos momentos que han llegado a convertirse en amigos y a los que me han dedicado su tiempo anteponiendo mis necesidades a las suyas durante la realización de este trabajo: a Ana Ibañez, a Laura de la Fuente, a Sonsoles Berrón, a Ana Vindel, a Teresa Boquete y a Carmen Marcos.

A todos los microbiólogos hospitalarios, que envían regularmente cepas, sin los que hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

A Begoña Aldama, por su amistad de tantos años.

A mi madre y hermanos, porque puedo contar siempre con ellos.

A Jesus y a mi hijo a los que he sustraido tantas horas, que soportaron mi refunfuño, perdonaron mi yo desagradable y que han sido el verdadero motor de esta Tesis.

"La gente que por primera vez mira por un cristal de aumento, dice: Ahora veo una cosa, luego veo otra; es que el observador más experto puede equivocarse. En estas observaciones he empleado más tiempo del que muchos creerán; pero las he hecho con satisfacción, sin hacer caso de quienes me preguntaban por qué me tomaba tanto trabajo y qué finalidad tenía todo eso. Más yo no escribo para esas gentes, escribo solamente para los filósofos."

Antonio Van Leeuwenhoek
En: Los cazadores de microbios
Dr. Paul de Kruif

INDICE

INTRODUCCION Página

I. El Microorganismo

A. Taxonomía y nomenclatura 1

B. Caracterización fenotípica 3

1. Identificación serológica 3

a. *Antígenos somáticos* 3

b. Antígenos flagelares 4

c. Antígeno capsular 5

2. Fagotipificación 5

3. Colicinotipificación 6

4. Biotipificación 7

5. Antibiotipificación 7

C. *Caracterización genotípica* 8

1. Plasmidotipificación 8

2. Patrones electroforéticos de isoenzimas 9

3. Patrones de digestión de ADN *por endonucleasa* 10

a. Electroforesis en campo pulsado 10

b. Ribotipificación 11

c. Tipificación por secuencias de inserción IS200 12

4. *Métodos basados en la reacción en cadena de la* polimerasa "PCR". 12

a. PCR basada en secuencias repetitivas "REP-PCR", "ERIC-PCR". 14

b. PCR basada en secuencias de inserción "IS200-PCR". 14

c. PCR-ribotipificación. 15

d. *Amplificación arbitraria múltiple* "AP-PCR". 15

e. Fragmentos de restricción de ADN amplificado por PCR, "RFLP-PCR". 15

II. La enfermedad: Fiebre tifoidea

A. Breve historia 16

B. Aspectos clínicos 17

C. Tratamiento 19

D. Control:

1. Interrupción de la vía de transmisión 20

2. Vacunación 21

E. Epidemiología 22

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS 24

MATERIAL Y METODOS

I. Cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi 27

1. Grupo control 28

2. Muestra aleatoria años 1988-1994 28

3. Cepas productoras de brotes 30

4. Cepas multirresistentes 30

II. Electroforesis en campo pulsado 31

A. Preparación de los bloques de ADN 31

B. Digestión con endonucleasas de restricción 32

C. Electroforesis 33

III. Ribotipificación 33

A. Extracción de ADN 33

B. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción 34

C. Electroforesis de los fragmentos de restricción 34

D. Preparación de una sonda ADNc marcada con Digoxigenina 35

E. Transferencia Southern 36

F. Prehibridación e hibridación 36

G. Detección de genes 37

IV. Detección de secuencias de inserción IS200 38

D. Preparación de una sonda ADN-IS200 marcada con Digoxigenina 39

V. Reacción en cadena de la polimerasa "PCR" 40

VI. Prueba de sensibilidad a antimicrobianos 42

VII. Inducción de fagos lisogénicos 42

VIII. Poder de discriminación 43

IX. Análisis estadístico de los datos 43

RESULTADOS

I. Grupo control

1. Patrones de digestión de ADN por endonucleasas 44
   a. Tipos electroforéticos en campo pulsado 44
   b. Ribotipificación 46
   c. Tipificación por secuencias de inserción IS200 47

2. Tipificación basado en la técnica de "PCR" 48
   a. REP-PCR 48
   b. ERIC-PCR 48
   c. IS200-PCR 48
   d. PCR-ribotipificación 49
   e. AP-PCR 49

II. Muestra aleatoria

1. Patrones de digestión de ADN por endonucleasas 51
   a. Tipos electroforéticos en campo pulsado 51
   b. Ribotipificación 51
   c. Tipificación por secuencias de inserción IS200 53

III. Cepas productoras de brotes epidémicos 57

IV. Cepas multirresistentes 65

V. Análisis de los datos 66
1. Electroforesis en campo pulsado 67
2. Ribotipificación 69

DISCUSION 76

I. Electroforesis en campo pulsado 77

II. Ribotipificación 83

III. Tipificación por secuencias de inserción IS200 88

IV. Tipificación basada en la reacción en cadena de la polimerasa 89

CONCLUSIONES 92

BIBLIOGRAFIA 96

INTRODUCCION.....

EL MICROORGANISMO: *Salmonella enterica*, serotipo Typhi.

Salmonella enterica, serotipo Typhi es el germen causante de la fiebre tifoidea que, a diferencia de otras salmonelosis, es una enfermedad infecciosa sistémica generalizada y tiene como huésped específico al hombre.

A.Posición taxonómica y nomenclatura.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* integrada en el grupo de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, cuyas características morfológicas y bioquímicas se describen en el Manual de Bergey (Holt, 1994).

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* se dividen en dos especies: *Salmonella enterica* (Le Minor, 1987) y *Salmonella bongori* (Reeves, 1989). *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies por hibridación ADN-ADN y taxonomía numérica.

Las subespecies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtanae* e *indica* pueden distinguirse en base a un pequeño número de reacciones bioquímicas recogidas en la tabla 1 (Le Minor, 1982; Le Minor,1986). La subespecie *enterica* representa más del 99.5% de los aislamientos de *Salmonella* de origen humano (Le Minor, 1988).

La identificación serológica de *Salmonella* en base a sus antígenos somáticos divide a este género en 46 serogrupos y la combinación de estos con los antígenos flagelares en más de 2300 serotipos (Popoff, 1992).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto la nomenclatura del microorganismo objeto de este trabajo sería: *Salmonella enterica*, subespecie *enterica*, serotipo Typhi aunque por razones prácticas el mismo Le Minor sugiere que se puede emplear una nomenclatura abreviada que es la que vamos a utilizar en este estudio: *Salmonella*, serotipo Typhi.

Tabla 1. Diferenciación bioquímica del género *Salmonella* en especies y subespecies.

Especie	*S. enterica*						*S.bongori*
Subesp.	*enterica*	*salamae*	*arizonae*	*diarizonae*	*houtanae*	*indica*	
Caracteres:							
Dulcitol	+	+	−	−	−	v	+
ONPG (2h)	−	−	+	+	−	v	+
Malonato	−	+	+	+	−	−	−
Gelatina	−	+	+	+	+	+	−
Sorbitol	+	+	+	+	+	−	+
KCN	−	−	−	−	+	−	+
L(+)tartrato	+	−	−	−	−	−	−
Galacturonato	−	+	−	+	+	+	+
γ-glut.transfer.	+	+	−	+	+	+	+
β-glucuronidasa	v	v	−	+	−	v	−
Mucato	+	+	+	−(70%)	−	+	+
Salicina	−	−	−	−	+	−	−
Lactosa	−	−	−(75%)	+(75%)	−	v	−
Lisis fago O1	+	+	−	+	−	+	v

Bioquímicamente *Salmonella*, serotipo Typhi posee algunas características diferentes de las demás salmonelas: no produce gas a partir de la fermentación de la glucosa, no descarboxila la ornitina, no utiliza el citrato como única fuente de carbono, no fermenta la arabinosa y la producción de SH_2 en TSI es mucho menor, apareciendo un ligero ennegrecimiento del medio sólo en la zona de inoculación.

B. Caracterización fenotípica.

1. Identificación serológica.

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* tienen tres clases de antígenos, somáticos "O", flagelares "H" y el antígeno capsular "Vi", que dan lugar a los distintos serotipos según el esquema instituido por White (1926). Otros antígenos, raras veces detectados, no tienen ningún interés desde el punto de vista diagnóstico, como el antígeno "M" (mucoide), idéntico en todas las salmonelas, o el antígeno "Fim" (fimbria) escasamente encontrado en ciertos serotipos y nunca en cepas de la subespecie entérica .

Los serotipos, que son utilizados como el primer marcador epidemiológico de la especie, vienen definidos por una particular asociación de antígenos somáticos, flagelares y en algunos casos capsulares que tienen las siguientes características:

a. Antígenos somáticos "O".

Estos antígenos son de naturaleza lipopolisacárida, son termoestables y de acuerdo con Lüderitz (1971), se pueden dividir en tres regiones, una región denominada III que constituye el lípido "A" y es la responsable de la toxicidad del lipopolisacárido, la región II de naturaleza polisacárida muy parecida en todas las salmonelas y la región I también polisacárida que es variable y responsable de la especificidad de los antígenos somáticos.

Los antígenos somáticos pueden ser clasificados en:

1. "Mayores", que son los responsables de la división del género en serogrupos y están determinados por el grupo "cluster" de genes *rfb* (Mäkelä, 1984).
2. "Menores", que tienen un menor valor discriminatorio, y están asociados a otros antígenos y por lo tanto pueden encontrarse en diferentes serogrupos, o proceden de la modificación química

de los antígenos "mayores".

Salmonella serotipo Typhi posee el antígeno mayor O:9 característico del serogrupo D, el antígeno menor O:12 común a varios serogrupos y, en algunas cepas, el antígeno O:1 resultante de una conversión mediada por el fago P22, que introduce un residuo de glucosa unido a la galactosa presente en la unidad de repetición oligosacárida que constituye el polisacárido de la región I.

Los antígenos somáticos pueden sufrir diversas variaciones entre las que la variación lisa-rugosa es la más importante. Esta variación puede suceder en todas las salmonelas y se debe a mutaciones que afectan a la síntesis de las cadenas polisacáridas de las regiones I y II. Las cepas rugosas se vuelven autoaglutinables.

b. Antígenos flagelares "H".

Los flagelos del género *Salmonella* son peritricos, de naturaleza proteica y estructura compleja formada por un cuerpo basal, cuello y filamento. Los flagelos son polímeros de unas proteínas filamentosas denominadas flagelinas en las que reside la especificidad antigénica.

La mayor parte de las bacterias de este género, por razones no muy bien conocidas pero que podrían estar relacionadas con la supervivencia de la bacteria contra los sistemas de defensa del huésped, pueden expresar dos especificidades de flagelos denominados históricamente de primera y segunda fase, codificados por dos genes *fliC* (fase 1) y *fljB* (fase 2), situados en diferentes posiciones del cromosoma , apareciendo flagelos de una u otra especificidad después de 10^3 a 10^5 divisiones bacterianas (Silverman, 1979; Iino, 1983).

La inmensa mayoría de las cepas de *Salmonella* serotipo Typhi son monofásicas y tienen un solo tipo de flagelos

denominados H:d (fase 1), pero se han descrito cepas aisladas en Indonesia con un antígeno H:j considerado por Kauffman (1936) como derivado del antígeno H:d.

También se han encontrado cepas difásicas procedentes así mismo de Indonesia, que junto al antígeno H:d (1ª fase) poseen otro denominado H:z_{66} (2ª fase) (Vieu, 1986; Guineé, 1981).

c. Antígeno capsular "Vi".

La mayoría de las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi poseen un antígeno capsular "Vi" que es un homopolisacárido de ácido D-galactosaminurónico y que puede eliminarse por ebullición.

En este antígeno "Vi" residen los receptores de los fagos que conforman el esquema internacional de fagotipificación para este germen.

La identificación serológica se realiza en base a la detección de los tres tipos de antígenos de *Salmonella*, serotipo Typhi mediante aglutinación en porta, tubo o microcápsula (Shipp, 1980).

La aglutinación de los antígenos somáticos y capsular es estable y en grumos, mientras que en el caso de los antígenos flagelares, que debe hacerse a partir de gérmenes muy móviles, es reversible y tiene aspecto flocular.

2. Fagotipificación.

El primer esquema de fagotipificación para este germen fue desarrollado por Craigie y Yen (1938a, 1938b), quienes describieron 4 fagos "Vi virulentos" que denominaron I, II, III y IV y que se diferenciaban tanto en sus propiedades físicas como serológicas. El fago "Vi II" demostró tener la propiedad poco común de adaptarse a distintas cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi de manera que se convertía en específico de la última cepa en la que se podía propagar.

En 1947 el método de fagotipificación de *Salmonella*, serotipo Typhi fue estandarizado (Craigie, 1947). El juego de fagos actualmente

en uso, internacionalmente reconocido, consta de 106 fagos derivados del fago "Vi II" que distinguen 106 fagotipos diferentes (Edelman, 1986). Los fagotipos y los fagos se nombran de la misma manera utilizando letras, números ó una combinación de ambos, por ejemplo A, E1a, 26, etc.

Las cepas que no se pueden tipificar por el esquema general y lo son por los fagos I y/ó IV se dice que son del fagotipo I+IV.

Las cepas que no poseen cápsula no se pueden tipificar y se denominan "no fagotipificables Vi negativas" (NT−), mientras que las que no se tipifican pero sí poseen cápsula se dice que son "no fagotipificables Vi positivas" (NT+).

Por último, hay cepas que son lisadas por la mayoría de los fagos del juego pero que no pertenecen a ningún fagotipo establecido, son cepas "A degradadas" ó "Vi degradadas" (Bergan, 1978).

La fagotipificación ha sido tradicionalmente el marcador epidemiológico de elección para la subdivisión del serotipo Typhi, a pesar de lo cual unos pocos fagotipos pueden representar a la mayoría de las cepas aisladas en una determinada región.

En España, al analizar los diferentes fagotipos de *Salmonella*, serotipo Typhi durante más de 10 años, se observó que los fagotipos E1 (30,8%), C1 (14,2%), A (9,7%), Ade (9,6%), 46 (6,6%), D1 (5,6%), NT+ (4,7%), 34 (4,2%), I+IV (3,3%) y NT− (2,6%) eran los más frecuentes, constituyendo más del 90% de las cepas estudiadas (Usera, 1993).

3. Colicinotipificación.

Consiste en la detección de una bacteriocina, activa frente a una cepa de *Escherichia coli* K12, producida por algunas cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi. Su utilidad como marcador epidemiológico es muy pequeña y su detección en cepas diferentes del fagotipo 40 es muy escasa (Nicolle, 1985).

Entre las cepas aisladas en España todas las cepas productoras de esta bacteriocina pertenecían al fagotipo 40 (Usera, 1993).

4. Biotipificación.

Se investigan dos pruebas bioquímicas variables en *Salmonella*, serotipo Typhi, la fermentación de la Xylosa "Xy" y la presencia de la enzima Tetrationato-reductasa "TTR" (Vieu, 1983). En el trabajo de Usera (1993) el 13% de las cepas estudiadas no fermentaban la Xy pero solamente en el 1% no se detectó la presencia de la enzima TTR.

5. Antibiotipificación.

En general, la resistencia a antimicrobianos en *Salmonella*, viene codificada por plásmidos que adquieren los genes de resistencia por transposición desde otros plásmidos, de la misma o de otras bacterias del huésped, o desde el cromosoma. La resistencia también puede ser debida a mutaciones espontáneas en los genes del cromosoma bacteriano. Finalmente, como consecuencia de la presión antibiótica ejercida en medicina, se favorece la supervivencia de las estirpes resistentes y su proliferación.

Sin embargo, en España los aislados de *Salmonella*, serotipo Typhi son generalmente sensibles a los antimicrobianos habitualmente utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea (Usera, 1993) y la antibiotipificación no resulta eficaz como primer método de discriminación en este serotipo aunque si como sistema de vigilancia para la detección de cepas resistentes.

La aparición de una cepa resistente al cloranfenicol y otros antibióticos, que causó una gran epidemia en Méjico en 1972 con un número de muertes similar a la era preantibiótica (Olarte, 1973; Anderson, 1972) fue el detonante para la generalización de la antibiotipificación como marcador epidemiológico.

Más recientemente la emergencia de una nueva epidemia de fiebre

tifoidea en el subcontinente asiático, producida por una cepa multirresistente (Annad, 1990; Gulati, 1992) ha hecho imprescindible el conocimiento de la resistencia a los diferentes antimicrobianos para un tratamiento eficaz de los enfermos de fiebre tifoidea y para el desarrollo de medidas de control adecuadas.

C. Caracterización genotípica.

1. Plasmidotipificación.

Consiste en la determinación del contenido plasmídico de las bacterias. Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, circular, de doble cadena y cerrado covalentemente que replican independientemente del cromosoma bacteriano. Pueden transferirse entre bacterias del mismo o distinto género y, normalmente, poseen los genes que codifican para las funciones requeridas en su transferencia y replicación.

Los plásmidos pueden también transportar genes que codifican para una gran variedad de funciones que, en teoría, no son esenciales para la supervivencia de la bacteria. Algunos plásmidos codifican para propiedades bien conocidas como la resistencia a antibióticos (Karmaker, 1991) y a metales pesados o factores que contribuyen a la virulencia del organismo (Gotuzzo, 1987).

Una de estas propiedades basada en la incapacidad de ciertos plásmidos de coexistir en la misma bacteria ha sido usada para desarrollar un esquema de clasificación en "grupos de incompatibilidad" reconocido internacionalmente (Jacob, 1977).

En el serotipo Typhi, la resistencia plasmídica al cloranfenicol y otros antibióticos se ha debido en todos los casos a plásmidos del grupo de incompatibilidad H_1 (Rowe, 1984). La alta incidencia de plásmidos H_1 en este serotipo sugiere una cierta afinidad entre ambos (Goldstein, 1986).

Algunos trabajos han demostrado que *Salmonella*, serotipo Typhi puede sufrir cambios de fagotipo debido a la presencia de plásmidos de resistencia (Toucas, 1978).

Aunque la plasmidotipificación se ha utilizado con éxito como marcador epidemiológico complementario en diferentes especies bacterianas, sobre todo en brotes (Mayer, 1988), en *Salmonella*, serotipo Typhi la presencia de plásmidos es escasa, lo que limita la aplicación de este marcador en las cepas de este serotipo. En un estudio realizado en Chile sobre 70 cepas pertenecientes a 11 fagotipos, solo el 17% de ellas transportaban 1 ó 2 plásmidos (Maher, 1986) y este porcentaje fue aún menor en otros estudios (Murray, 1985; Phipps, 1991).

2. Patrones electroforéticos de isoenzimas.

Este procedimiento, ampliamente desarrollado en eucariotas, se basa en el principio de que pequeñas mutaciones en los genes que codifican para la síntesis de enzimas, pueden ser detectadas por electroforesis y utilizadas como marcador clonal. La carga eléctrica neta de una proteína está en relación con su secuencia de aminoácidos y la sustitución de un aminoácido en la molécula, puede no afectar a la función del enzima, pero probablemente modificará su movilidad electroforética.

Esta técnica ha sido utilizada con éxito por Selander (1987) en el estudio evolutivo de gran número de bacterias y de acuerdo con él, se pueden detectar el 90% de las sustituciones de aminoácidos.

El número de clones en una especie típica está comprendido entre 100 y 1000. En el caso de serotipos dentro de una misma especie, algunos parecen pertenecer a un único clon, mientras que clones no relacionados convergen en el mismo serotipo.

Reeves y cols. (1989) y Selander y cols. (1990) han realizado estudios de diferenciación electroforética de isoenzimas en *Salmonella*, serotipo Typhi demostrando que las cepas estudiadas procedían de un

solo clon según Reeves o dos según Selander y que este serotipo era genéticamente el menos heterogéneo de entre los estudiados, lo que es muy interesante en cuanto su origen filogenético.

3. Patrones de digestión de ADN por endonucleasas.

Las endonucleasas de restricción, enzimas que cortan el ADN plasmídico ó cromosómico por secuencias fijas de nucleótidos, permiten la obtención de fragmentos estables para un mismo ADN, que pueden ser separados por electroforesis en geles de agarosa.

Estudiándose los patrones electroforéticos obtenidos para cada bacteria y enzima pueden establecerse diferencias entre las cepas. Si bien estos patrones son fáciles de analizar cuando se trata de la digestión de plásmidos, en el caso del ADN cromosómico la interpretación es mucho mas difícil al generarse un gran número de fragmentos. La electroforesis en campo pulsado, y el revelado de fragmentos específicos mediante hibridación con sondas como en el caso de la ribotipificación y de la tipificación de las secuencias de inserción IS200 permiten clarificar dichos patrones.

a. Electroforesis en campo pulsado.

Un buen método para la diferenciación entre cepas es la utilización de endonucleasas de restricción que cortan el ADN en secuencias poco frecuentes en el genoma bacteriano y por tanto generan un discreto número de bandas, junto con la técnica de electroforesis en campo pulsado desarrollada por Schwartz (1984), que permite la separación de bandas de ADN desde 1 Kb hasta 6 Mb mediante la utilización de dos campos eléctricos alternativos.

Durante la electroforesis, el ADN cambia su conformación produciéndose la elongación de la molécula en la dirección del campo eléctrico. Si se produce una variación en la dirección de dicho campo, las moléculas, antes de comenzar a migrar, son obligadas a relajarse y reorientarse en la nueva dirección. El tiempo

de relajación y reorientación está relacionado con el peso molecular del ADN (las moléculas mayores necesitan más tiempo que las pequeñas), y la electroforesis en estas condiciones permite una buena resolución de los fragmentos por encima de 50Kb.

La electroforesis en campo pulsado ha sido utilizada con éxito en estudios epidemiológicos de *Salmonella*, serotipo Typhi (Thong, 1994; Nair, 1994).

b. Ribotipificación.

En el cromosoma bacteriano los genes que codifican para la producción de 16S, 23S y 5S ARN están organizados en unidades de transcripción policistrónicas u operones. Los operones ARNr de diferentes especies bacterianas están muy conservados y presentes en múltiples copias, entre 5 y 10 por genoma (Davies, 1972) por lo que una digestión del cromosoma con endonucleasas de restricción presumiblemente originará varios fragmentos que transporten secuencias de estos genes ARNr.

El número y localización de estos operones en el genoma difiere ampliamente de unas bacterias a otras, situándose en diferentes fragmentos de restricción, por lo que su análisis puede ser utilizado como herramienta taxonómica (Grimont, 1986; Pignato, 1992). La caracterización de estos fragmentos requiere su separación mediante electroforesis en geles de agarosa, transferencia a membranas de nylon o nitrocelulosa por el método de Southern (1975) e hibridación con sondas ADNc específicas marcadas que permitan su visualización (Stull, 1988).

Altwegg y cols. (1989) estudiaron los patrones de restricción de los genes ARNr en una selección de cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi procedentes de EEUU, comparándolos con los fagotipos y observando que un fagotipo podía dividirse en distintos ribotipos y viceversa. Los resultados indicaban que la técnica es estable, reproducible y puede ser empleada como

marcador epidemiológico.

c. Tipificación por secuencias de inserción IS200.

En 1983, Lam y Roth describieron en *Salmonella*, serotipo Typhimurium una pequeña secuencia de inserción de ADN, llamada IS200, que era específica del género *Salmonella*. IS200 es la secuencia de inserción bacteriana más pequeña descrita, 708 pares de bases, y el número de copias y su localización en el cromosoma ha sido utilizado para el estudio epidemiológico y filogenético de diversos serotipos (Stanley, 1992a,b,c, 1993).

En un estudio realizado sobre 49 fagotipos diferentes de *Salmonella*, serotipo Typhi, se encontró que de 11 a 15 de los fragmentos generados por la restricción de ADN con la enzima *Pst*I transportaban al menos un elemento IS200 (Threlfall, 1994). Se obtuvieron 14 tipos diferentes, de los que dos fueron mayoritarios, y se concluía que, aunque debía mantenerse la fagotipificación como marcador epidemiológico de elección en la diferenciación primaria de este serotipo, la tipificación mediante las secuencias de inserción IS200 era un buen marcador complementario de aquella.

4. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa "PCR".

Esta poderosa técnica, rápida y sensible fue introducida por Saiki y colaboradores en 1985 y permite la obtención de un gran número de copias de un fragmento específico de ADN desde un tamaño de unos pocos pares de bases hasta más de 10 Kilobases. Una sola copia de ADN puede ser amplificada 10^9 veces en unas 3 horas y posteriormente analizada mediante electroforesis en geles de agarosa, directa o posteriormente a su digestión con endonucleasas. El tamaño del segmento de ADN que se quiere amplificar y la necesidad de algún conocimiento previo de las secuencias que flanquean dicho segmento

son las principales limitaciones de la técnica como método de tipificación.

Las amplificaciones no deseadas de posibles moléculas de ADN contaminantes deben ser tenidas en cuenta para extremar las precauciones en las condiciones de la reacción.

La reacción necesita de 2 iniciadores o "primers" que son oligonucleótidos sintéticos de 20 a 30 bases de longitud y secuencias complementarias a cada uno de los extremos de las bandas opuestas del fragmento de ADN molde. El ADN, del que solamente se requieren cantidades del orden de nanogramos, previamente desnaturalizado, se aparea (híbrida) con las secuencias complementarias de los iniciadores y una enzima termoestable, la "*Thermus aquaticus* DNA polimerasa" (Saiki, 1988a) cataliza la reacción de extensión a partir de estos iniciadores. La repetición de este proceso o ciclo, desnaturalización, apareamiento y extensión durante 20-30 ciclos produce rápidamente un gran número de copias del ADN molde.

La técnica de PCR tiene un enorme potencial en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, sobre todo cuando el diagnóstico tradicional está sujeto a pruebas bioquímicas ambiguas, cantidades insuficientes de muestra clínica, cultivos difíciles que necesitan gran cantidad de tiempo, etc. La técnica de PCR se ha utilizado para la detección de cepas de *Salmonella* pertenecientes a los serogrupos A, B, C_2 y D (Luk, 1993), para la diferenciación entre el serogrupo D y el serotipo Paratyphi A (principal serotipo del serogrupo A) (Echeita, datos no publicados), etc. En *Salmonella*, serotipo typhi se ha desarrollado últimamente un método de detección combinado PCR-ELISA (Luk, 1994).

Algunas de las variaciones de la técnica de PCR convencional que pueden ser utilizadas como marcadores epidemiológicos complementarios son:

a. PCR basada en secuencias repetitivas.

Recientemente se han identificado en el genoma bacteriano (originariamente en enterobacterias y posteriormente en un gran número de bacterias no relacionadas) familias de secuencias cortas repetitivas de ADN que se encuentran ampliamente distribuidas en el cromosoma (Lupski, 1992). Su función no está clara, pudiendo colaborar en la terminación de la transcripción, en la estabilidad de ARNm o en la organización del cromosoma. Las mejor caracterizadas son las secuencias "REP" (palindrómicas, extragénicas y repetitivas) y las secuencias "ERIC" (secuencias consenso enterobacterianas, intergénicas y repetitivas.

El resultado de la técnica de PCR con iniciadores específicos para las secuencias REP (REP-PCR) o ERIC (ERIC-PCR), son múltiples fragmentos de ADN que representan la amplificación de las zonas de ADN entre dos elementos repetitivos adyacentes. Los iniciadores utilizados son complementarios de la zona central altamente conservada de las secuencias repetitivas, por lo que la reacción puede ser llevada a cabo con un solo iniciador en lugar de dos. Esta técnica sola o en combinación con otros métodos ha sido empleada en la investigación de brotes, demostrando en algunos casos un poder discriminatorio comparable a la electroforesis de isoenzimas (Woods, 1992) o a la electroforesis en campo pulsado (Struelens, 1993).

b. PCR basado en secuencias de inserción IS200-PCR.

Recientemente se ha desarrollado este método (Ross, 1993), mas rápido y simple que la hibridación de las secuencias IS200 con sondas específicas comentada en el apartado 2c.

Los iniciadores, complementarios de los extremos de la secuencia, tal que el extremo 3´ de cada iniciador se dirija hacia el exterior del elemento de inserción, amplificarán las regiones entre 2 copias consecutivas. El resultado serán fragmentos de

ADN diferentes en peso molecular y número, que pueden ser utilizados en la diferenciación epidemiológica de aislados bacterianos.

c. Ribotipificación mediante PCR.

En todos los operones ARNr, se encuentran uno o dos genes que codifican para ARNt situados en el espacio entre los genes que codifican para el ARNr 16S y 23S. Los diferentes patrones obtenidos de la amplificación de la región intergénica 16S-23S, "PCR-Ribotipificación", con iniciadores específicos diseñados a partir de las secuencias conservadas de estos genes, han sido reproducibles, estables y útiles en el análisis epidemiológico de diferentes especies bacterianas (Kostman, 1992; 1995).

d. Amplificación arbitraria múltiple "AP-PCR".

Utiliza uno o más iniciadores elegidos de forma arbitraria que a bajas temperaturas de hibridación permiten cierto número de errores en el apareamiento de bases y como consecuencia se produce la amplificación de múltiples fragmentos de ADN, algunos de ellos polimórficos, que pueden ser analizados por electroforesis en geles de agarosa. El polimorfismo puede ser debido a que existan fragmentos de diferente peso molecular, a la diferente intensidad de las bandas y a la presencia o ausencia de bandas.

La amplificación,si bien es arbitraria, es reproducible y estable para unas condiciones determinadas, que deben ser cuidadosamente seguidas, y permite la diferenciación entre aislados, por lo que "AP-PCR" se ha utilizado en la subtipificación de bacterias (Welsh, 1990; Caetano-Anollés, 1993).

e. Patrones de restricción de ADN amplificado por PCR.

Las secuencias de ADN amplificadas por PCR, generalmente de un tamaño entre 1 y 3 Kb, pueden ser cortadas por enzimas de restricción y la resolución de estos fragmentos por electroforesis

en geles de agarosa utilizados para la comparación de diferentes aislados, "RFLP-PCR". Las enzimas utilizadas suelen ser aquellas que reconocen secuencias cortas y que presumiblemente se encontrarán más frecuentemente en el fragmento a analizar.

II. LA ENFERMEDAD: Fiebre tifoidea.

A. Breve historia.

La fiebre tifoidea es una enfermedad conocida desde antiguo que continúa siendo un serio problema de salud pública en los países en vías de desarrollo, donde suele ser endémica. En los países desarrollados, con unas tasas pequeñas de enfermedad, un alto porcentaje de casos suelen ser importados. En 1986 la Organización Panamericana de Salud llevó a cabo un simposio para reexaminar viejas "verdades" discutiendo y criticando la gran cantidad de nueva información que existía acerca de la fiebre tifoidea. Edelman (1986) recoge los puntos mas importantes de aquel simposio y, entre ellos, una descripción histórica de la enfermedad.

Louis en 1829 describe por primera vez la fiebre tifoidea claramente separada de otras fiebres y la asocia con lesiones en intestinos, nódulos linfáticos mesentéricos y bazo.

En 1873 Budd evidencia que las heces son la principal fuente de infección de la fiebre tifoidea, que es una enfermedad de transmisión hídrica, que la leche, alimentos y ropas contaminadas son fuentes de diseminación y sugiere que la causa de la enfermedad podría ser un germen.

En 1880 Eberth consigue visualizar y demostrar la existencia de un bacilo, en los nódulos mesentéricos de un enfermo, como agente productor de la enfermedad (Germanier, 1984).

Gaffkey en 1884 logra cultivar y aislar por primera vez, en cultivo puro, *Salmonella*, serotipo Typhi de bazos de pacientes infectados.

La inmunización contra la enfermedad se inicia en 1896 con Pfeiffer y

Kalle, usando vacunas preparadas con bacilos muertos por calor y conservados en fenol.

En el mismo año 1896 Gruber, Durham y Widal de forma independiente demuestran, que la mezcla de una suspensión de bacilos con suero de personas en fase convaleciente, produce una agrupación de aquellos, naciendo el término aglutininas e introduciendo en el diagnóstico de la fiebre tifoidea la clásica prueba serológica conocida como "Reacción de Widal".

En 1877 Koch propone tres principios fundamentales (Hall, 1991) para el control de la enfermedad:

1. Desinfección de las heces del enfermo.
2. Mejora en el manejo y eliminación de las aguas residuales.
3. Aislamiento de las personas convalecientes hasta que dejen de eliminar bacilos.

Sin embargo la mortalidad continúa siendo superior al 30% hasta que Woodward y colaboradores anuncian en 1948 que la cloromicetina había esterilizado los hemocultivos de 10 pacientes de fiebre tifoidea en Malasia. El uso de antibióticos marcó la era moderna en el tratamiento de la fiebre tifoidea.

Aunque a partir de esta fecha disminuye considerablemente la incidencia de la mortalidad por fiebre tifoidea en los países desarrollados, se siguen detectando brotes epidémicos asociados a portadores asintomáticos que pueden excretar *Salmonella*, serotipo Typhi durante años y por lo tanto esta enfermedad sigue constituyendo un importante problema de salud pública en la actualidad.

B. Aspectos clínicos.

Salmonella, serotipo Tiphi es una bacteria adaptada al ser humano, siendo por lo tanto éste el único reservorio natural y el transmisor de la enfermedad, ya sea directamente o a través de un vehículo por él contaminado como agua, leche, etc.

Los factores responsables de sus manifestaciones clínicas no han sido

totalmente definidos, presentándose generalmente como una enfermedad sistémica grave, a menudo acompañada de complicaciones.

Se acepta de forma general que la vía de entrada del germen es el intestino delgado pasando rápidamente la pared intestinal y llegando a los nódulos linfáticos e invadiendo el torrente sanguíneo. Esta primera bacteriemia no cursa con síntomas.

Los microorganismos diseminados resisten dentro de las células reticuloendoteliales donde se multiplican y vuelven a invadir el torrente circulatorio. Esta segunda bacteriemia es la responsable de la aparición de la sintomatología.

La enfermedad tiene un período de incubación de entre 7 y 21 días. Entre los síntomas cabe destacar el aumento paulatino de la fiebre hasta llegar al final de la primera semana a los 40°C. Es muy característica la cefalea intensa, la obnubilación, una bradicardia relativa y dolor abdominal, siendo mas frecuente el estreñimiento que la diarrea.

Si la enfermedad no ha sido diagnosticada y tratada convenientemente, durante la tercera semana se inicia una fiebre en agujas pudiendo aparecer complicaciones severas como hemorragias intestinales, perforación intestinal, choque endotóxico, colecistitis e incluso el fallecimiento del paciente.

En algunas ocasiones *Salmonella*, serotipo Typhi produce síndromes diferentes a la fiebre tifoidea como meningitis, abscesos cerebrales, neumonías, hepatitis...etc (Verger, 1988).

Al ser el hombre el único huésped de *Salmonella*, serotipo Typhi, la prevalencia de portadores es crítica para la perpetuación de la enfermedad. Entre el 2% y el 5% de los pacientes con fiebre tifoidea se convierten en portadores crónicos, definidos estos como personas que excretan *Salmonella*, serotipo Typhi durante más de 12 meses después de la infección aguda. Los portadores son potencialmente infectivos, sobre todo si manipulan alimentos o tienen contacto con niños o personas hospitalizadas (Hook, 1990).

C. Tratamiento.

Antes de la introducción del cloranfenicol en 1948, el tratamiento de la fiebre tifoidea se limitaba a mantener estables las constantes vitales del enfermo hasta que éste superase la infección. La mortalidad era superior al 10%, disminuyendo considerablemente a partir de entonces hasta llegar a ser inferior al 2% en los países desarrollados (Herzog, 1982).

El cloranfenicol ha sido el agente antimicrobiano usado más frecuentemente en el tratamiento de la fiebre tifoidea. La resistencia "in vitro" es rara y esporádica y al contrario de lo que sucede en la mayoría de los patógenos entéricos y de los otros serotipos de *Salmonella*, el serotipo Typhi permanece susceptible a los antibióticos más comúnmente utilizados.

El cloranfenicol no es caro, es de una eficacia probada, puede ser utilizado por vía oral o parenteral y generalmente restablece la temperatura corporal normal entre 5 y 10 días después de haberse iniciado el tratamiento. Sin embargo el cloranfenicol presenta potenciales efectos adversos colaterales como anemia aplásica, depresión medular y no previene el "estado de portador" o las complicaciones tales como perforación intestinal.

Otros antibióticos han sido utilizados así mismo con éxito, como ampicilina o amoxicilina, administrada de forma intravenosa y a dosis altas ó trimetoprim-sulfametoxazol sobre todo como alternativa en el caso de cepas resistentes a cloranfenicol y ampicilina (Hook, 1990).

Cada vez con mas frecuencia se publica en la literatura la aparición de cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi resistentes al cloranfenicol, ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol como causantes de brotes en países como Méjico, Perú, Vietnam ó La India (Wallace, 1990; Anand, 1990), lo que ha llevado a buscar otras terapias alternativas.

Las cefalosporinas de tercera generación, especialmente cefotaxima, ceftriaxona y cefoperazona son altamente eficaces frente a *Salmonella*, serotipo Typhi (Soe, 1987). Estas cefalosporinas son más estables en presencia de beta-lactamasas que otras cefalosporinas y tan efectivas como el cloranfenicol.

Cefoperazona parece incluso ofrecer una respuesta mejor a la del cloranfenicol en cuanto a número de días de tratamiento necesarios para que el paciente no presente fiebre y el hemocultivo resulte negativo (Pape, 1986).

Fluoroquinolonas como ofloxacino, ciprofloxacino, perfloxacino, norfloxacino y otras tienen una excelente actividad frente a *Salmonella*, serotipo Typhi, incluso en aquellas cepas resistentes al cloranfenicol, ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol. Estos agentes alcanzan buenas concentraciones intracelulares, particularmente en fagocitos y adecuados niveles en tejidos, bilis y heces. Este grupo de drogas debería ser considerado actualmente como de elección en el tratamiento de la fiebre tifoidea si ésta se ha adquirido en el sudeste asiático (Asperilla, 1990).

El tratamiento de niños con cepas multirresistentes, merece una consideración especial debido a que se ha descrito que las quinolonas pueden causar un daño irreversible en el cartílago de crecimiento, por lo que no se recomienda su uso en niños ni en mujeres embarazadas. En estos casos, los clínicos tienen la opción de usar las nuevas cefalosporinas si bien son más caras y deben ser administradas de forma intravenosa, lo que es una desventaja sobre todo en zonas endémicas económicamente pobres.

Por último es de gran importancia la erradicación del estado de portador ya que los pacientes excretan salmonelas durante un largo período de tiempo, incluso más de dos años. El tratamiento tradicional no resultaba satisfactorio en el caso de los portadores crónicos, con un 10-36% de recaídas. Las fluoroquinolonas parecen ser más eficaces en su erradicación.

D. Control.

El Control de la fiebre tifoidea puede abordarse bloqueando la vía de transmisión fecal-oral, mediante la vacunación, o ambas.

1. Interrupción de la vía de transmisión.

Se consigue con medidas higiénicas de carácter general como la

potabilización del agua de bebida, la correcta eliminación de las aguas fecales a través de sistemas de alcantarillado y su posterior tratamiento en depuradoras, el lavado de alimentos que se vayan a consumir crudos y las medidas de higiene personal adecuadas sobre todo con vistas a la manipulación de alimentos.

Por otra parte, es necesario evitar todo contagio provocado por las personas enfermas o los portadores asintomáticos tratando de localizar a estos últimos, para lo que se han desarrollado diferentes técnicas inmunológicas, a fin de aplicarles el tratamiento adecuado para la completa erradicación de su estado de portador.

2. La vacunación.

Es otra vía de prevención de la fiebre tifoidea sobre todo en países donde la enfermedad es endémica o cuando se trate de viajeros a estos países. En general en países desarrollados no esta recomendada la vacunación, ya que tampoco proporciona una protección absoluta. A partir de 1896 vienen desarrollándose diferentes tipos de vacunas que sin embargo solo han conseguido una eficacia relativa (Levine, 1989).

Las vacunas tradicionales están preparadas a partir de la cepa vacunal Ty2 inactivada por calor y fenol o por acetona. La vía de administración puede ser parenteral u oral (Ashcroft, 1964; Edwards, 1975), esta última sin efectos secundarios importantes pero de eficacia muy baja, por lo que no se recomienda su uso.

Las nuevas formulaciones están basadas en la utilización de cepas vivas atenuadas para su uso por vía oral, como la desarrollada a partir de la cepa de *Salmonella*, serotipo Typhi "Ty 21a galactosa epimerasa dependiente" sin apenas efectos secundarios y de una eficacia del 75% durante el primer año (Ferreccio, 1989; Forrest, 1991).

Otras vacunas se han desarrollado a partir de cepas auxotróficas mutantes, como la preparada a partir de una cepa "Ty 541" con delecciones en los genes *aro* A y *pur* A y que por lo tanto necesitan de

metabolitos aromáticos para su crecimiento (Edwards, 1988).

La desarrollada a partir del polisacárido capsular "Vi" (Robbins, 1984) ó vacunas preparadas para inmunizar frente a más de una infección (Tacket, 1990) son intentos prometedores en el control de la fiebre tifoidea.

E. Epidemiología.

Los países desarrollados poseen sistemas de información epidemiológica que permiten conocer la situación de las principales enfermedades humanas con bastante aproximación.

Basándose en estos datos se aprecia que, en estos países, la fiebre tifoidea ha disminuido considerablemente en los últimos años, llegando a unas tasas de 0,24-3,7 por 100.000 habitantes en EEUU y norte de Europa y de 4,3-14,5 en el sur de Europa (Edelman, 1986).

El número de casos importados suele ser muy alto, llegando en algunos países como Inglaterra a ser el 88% de los casos declarados (CDR, 1995).

La escasa información epidemiológica existente en los países en vías de desarrollo, no permite conocer la situación de la fiebre tifoidea en los mismos. Estimaciones realizadas a partir de diferentes estudios sitúan la tasa en 540 por 100.000 habitantes.

En España, según Prieto (1971), no se tuvieron datos de morbilidad hasta el año 1934 en que empiezan a declararse los primeros casos, aunque no se incluye la fiebre tifoidea entre las enfermedades de declaración obligatoria hasta el año 1945. Estos estudios muestran una disminución paulatina de la enfermedad, con altibajos, desde 1949 con una tasa de 85,4 por 100.000 habitantes hasta el año 1950 con una tasa de 66,1, fecha a partir de la cual se inicia un descenso rápido y uniforme.

En este mismo período el número de decesos fue mayor entre los hombres que entre las mujeres, invirtiéndose la tendencia a partir de 1951. Los grupos de edad en los que hubo más fallecimientos fueron 15-19 años y 20-24.

En 1978 comienza un aumento en las tasas de morbilidad con un máximo de 15,4 en 1985. Según algunos autores este incremento puede deberse, no a un aumento real en el número de casos, sino a otros factores como la incorporación de la red hospitalaria de INSALUD a la declaración obligatoria en 1982 o la falta de criterios homogéneos en la definición de caso.

A partir de este año se reinicia una disminución, llegando en 1994 a una tasa 1,72 por 100.000 habitantes (BES, 1995)

En España la mayor parte de los casos declarados de fiebre tifoidea son considerados autóctonos. Por otra parte, tal como sucede en otros países, la incidencia es más alta en los meses de verano y otoño, aunque también se observa un ligero aumento en los meses de enero y febrero (BEM, 1995).

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....

Las nuevas metodologías han mejorado tanto la rapidez en el diagnóstico de la fiebre tifoidea como la capacidad de realizar estudios epidemiológicos. El elemento clave en ambos procesos radica en la posibilidad de identificar el microorganismo y determinar que este está asociado con la aparición de la enfermedad o brote epidémico.

La identificación del microorganismo requiere el conocimiento de aquellos atributos únicos en él que le distinguen de los demás y es crítica en el caso de brotes donde se hace necesario la detección de la fuente de infección.

La determinación de las relaciones entre un conjunto de aislados nos lleva al concepto de "clon" que a efectos prácticos puede ser definido como un conjunto de microorganismos que han sido recogidos "independientemente, de diferentes fuentes, en diferentes localizaciones y quizás en diferentes épocas, pero que muestran tantas características fenotípicas y genotípicas idénticas que la explicación mas verosímil para esta identidad es la de un origen común" (Ørskov, 1983). La clonalidad no puede ser nunca totalmente asegurada, no es absoluta, pero la certeza de que diferentes cepas pertenecen a un mismo clon se incrementa con la utilización de más y mejores técnicas en su caracterización.

Los métodos tradicionales de tipificación fenotípica como fagotipificación, antibiotipificación, biotipificación ó colicinotipificación no reflejan necesariamente relaciones genéticas y por lo tanto son de dudosa utilidad en estudios de clonalidad.

Sin embargo, cuando uno de estos marcadores, utilizado aisladamente, da como resultado un fenotipo raramente encontrado puede ofrecer por si solo la suficiente evidencia de la transmisión epidemiológica.

En *Salmonella*, serotipo Typhi, el marcador fenotípico de elección es la fagotipificación que, al ser utilizado internacionalmente, permite un seguimiento de la evolución y dispersión de los distintos fagotipos no solo a lo largo del tiempo sino entre las distintas áreas geográficas. A pesar del alto poder de tipificación teórico del marcador (106 fagotipos diferentes), en cada país unos pocos fagotipos son los más frecuentemente aislados.

En España los fagotipos E1, C1, A, Ade, 46, D1, NT+, 34, I+IV y NT— constituyen más del 90% de las cepas estudiadas (Usera, 1993).

Por otra parte la potencial inestabilidad de los marcadores fenotípicos, a menudo hace necesario la utilización de otros mas estables basados en el examen genético de la bacteria. Entre estos, la determinación del contenido plasmídico, aunque ha demostrado ser en muchos casos tan específico como la fagotipificación y superior a la antibiotipificación, no siempre ofrece una discriminación suficiente. Dos cepas pueden transportar plásmidos diferentes pero de un peso molecular similar, lo que haría necesario la posterior identificación de estos por análisis de sus fragmentos de restricción y lo que es aún peor, en algunos casos como en *Salmonella*, serotipo Typhi la presencia de plásmidos es poco frecuente.

La electroforesis de isoenzimas (Reeves, 1989; Selander, 1990), utilizada con éxito en otras bacterias, en el caso de *Salmonella*, serotipo Typhi demuestra la existencia de dos únicos clones y cinco subclones, siendo el tipo 1 de dispersión mundial mientras que el tipo 2, muy minoritario, se encuentra en cepas originarias de Africa.

Por todo ello, y debido a que determinar la clonalidad de un conjunto de aislados es de un gran interés en el estudio epidemiológico de la fiebre tifoidea en España, nos planteamos en este trabajo los siguientes objetivos:

I. **Aplicación, para su utilización como marcadores epidemiológicos, de los métodos moleculares: electroforesis en campo pulsado, ribotipificación, tipificación por las secuencias de inserción IS200 y reacción en cadena de la polimerasa, sobre una selección de cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi aisladas en España.**

II. **Comparación de los resultados obtenidos con la fagotipificación, marcador epidemiológico tradicionalmente utilizado en el estudio de este serotipo.**

III: Análisis de la estructura genética de la población de *Salmonella*, serotipo Typhi y sus implicaciones en la epidemiología de la fiebre tifoidea.

IV. Elección del esquema de tipificación más adecuado para la caracterización epidemiológica de las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi.

MATERIAL Y METODOS.....

I. CEPAS DE *Salmonella*, serotipo Typhi.

La población de cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi objeto de este estudio está formado por la colección de cepas de este serotipo del Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella*, LNRS, remitidas por los diferentes laboratorios de Salud Pública del país entre los años 1979 y 1994.

De las cepas estudiadas, los resultados de fagotipificación, biotipificación, sensibilidad a antimicrobianos, presencia de plásmidos y análisis de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de ellos, fueron gentilmente cedidos por el LNRS.

La fagotipificación se había realizado usando el juego de fagos suministrado por el Laboratorio Internacional de Referencia para fagotipificación de *Salmonella* de Colindale, Londres (Guinnée, 1978).

El biotipo fue determinado siguiendo las pautas del manual de Edward y Ewing (Ewing, 1986).

La susceptibilidad a antimicrobianos se llevó a cabo por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer, 1966) y los resultados evaluados según los criterios del "Comité Nacional para la Normalización de Técnicas de Laboratorio" de EEUU (NCCLS, 1988).

Las cepas fueron consideradas multirresistentes cuando eran resistentes a 4 o más antimicrobianos. En ellas se investigó la presencia de plásmidos por el método de Birnboim y Doly (1979). Los plásmidos purificados se digirieron con la enzima *Hind*III (Pharmacia), según las recomendaciones del suministrador.

Los medios de cultivo se prepararon a partir de formulaciones deshidratadas siguiendo las instrucciones del suministrador o se elaboraron según el "Manual of Clinical Microbiology" (Nash, 1991).

Las cepas seleccionadas para la realización de esta Tesis, conservadas en leche descremada a – 80°C, se cultivaron en agar-triptona-soja "TSA" (Difco). Los subcultivos se realizaron bien en TSA (Difco) o bien en caldo de cerebro-corazón "BHI" (Difco), a partir de una colonia aislada.

Las cepas se dividieron para su estudio en 4 grupos:

1. Grupo control.

Se seleccionaron 10 cepas lo más diversas posibles, en cuanto a su origen geográfico y fagotipo. Este grupo se utilizó para la puesta a punto de los métodos utilizados (diferentes enzimas de restricción, condiciones de electroforesis, condiciones de amplificación por PCR, etc) y como una orientación del poder discriminatorio de las técnicas.

Nºcepa	Fagotipo	Provincia	Año	Origen infección
1	NT	Desconoc.	1985	Nepal
2	M1	Palencia	1990	Pakistán
3	53	Zaragoza	1980	Zaragoza
4	D2	Barcelona	1985	SE Asia
5	51	Desconoc.	1985	Argelia
6	A	Navarra	1986	Senegal
7	E1a	Barcelona	1991	India
8	A	Madrid	1991	Madrid
9	34	Madrid	1991	Madrid
10	A	Gerona	1983	Gerona

2. Muestra aleatoria.

Se seleccionó una muestra de 25 cepas, lo más representativa posible, aplicando el método estadístico a la subpoblación de cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi de los años 1990-1994.

La muestra se estratificó por año de aislamiento. La aleatoriedad se aseguró por la selección al azar de los individuos de la muestra mediante la aplicación de una tabla de números aleatorios sobre cada una de las subpoblaciones obtenidas en la estratificación.

No se consideraron en dicha estratificación otros caracteres como el fagotipo, el origen de las cepas (sangre, heces,...) o biotipo, para no obtener una subdivisión excesiva con subgrupos demasiado pequeños,

que dificultarían el posterior tratamiento estadístico de los resultados. Tampoco se consideró el factor "origen geográfico" al contar con un elevado número de provincias de las que no se disponía de cepas o estas eran muy pocas.

Nºcepa	Fagotipo	Origen	Provincia
1/90	C1	sangre	Alicante
2/90	A	descon.	Alava
3/90	D9	heces	Alicante
4/90	D1	sangre	Barcelona
5/90	C1	sangre	Zaragoza
1/91	Ade	sangre	Navarra
2/91	A	sangre	Vizcaya
3/91	Ade	descon.	Zaragoza
4/91	E1a	sangre	León
5/91	E1a	sangre	Asturias
1/92	D9	sangre	Alicante
2/92	D9	heces	Alicante
3/92	46	heces	Barcelona
4/92	46	sangre	Barcelona
5/92	E1a	heces	Zaragoza
1/93	C1	orina	Asturias
2/93	B2	sangre	Tarragona
3/93	Ade	sangre	Castellón
4/93	Ade	heces	Córdoba
5/93	E1a	sangre	Asturias
1/94	C1	heces	Gran Canaria
2/94	A	sangre	Barcelona
3/94	I+IV	sangre	Barcelona
4/94	E1a	sangre	Madrid
5/94	Ade	sangre	Barcelona

3. Cepas productoras de brotes epidémicos.

Se estudiaron 85 cepas relacionadas con 8 brotes epidémicos acaecidos durante los años 1989-1994.

Brote	N°cepas	Año	Fagotipo	Biotipo Xy-TTR	Provincia	Referencia
1	4	1989	C1	+ +	Navarra	BMS, 1990
2	6	1990	C4	+ +	Guipúzcoa	Ibarluzea, 1990
3	4	1990	E1a	+ +	Guipúzcoa	Ibarluzea, 1990
4	16	1991	34	+ +	Madrid	Usera, 1993
5	37	1989-94	46	+ +	Barcelona	Navarro, 1996*
6	4	1992	Ade	+ +	Guadalajara	BEM, 1994
7	5	1991-94	D1	+ +	Burgos	BEM, 1995
8	9	1994	I+IV	+ +	Barcelona	Usera, 1995

* enviado para su publicación

4. Cepas multirresistentes a antimicrobianos.

Se analizaron 8 cepas recibidas en el LNRS en los años 1990-91 en las que se describió por primera vez en España su carácter multirresistente.

Las cepas MR1 y MR2 pertenecían al fagotipo M1, aislado por primera vez en España aunque es frecuente en el continente asiático. Las cepas MR3 a MR8 eran del fagotipo E1a, fagotipo muy frecuente tanto en España como en el resto del mundo.

Las cepas MR1 y MR2 fueron aisladas de 2 varones residentes en la misma población, de 14 y 51 años de edad. Uno de ellos, el enfermo de 51 años, era de origen paquistaní aunque tras la encuesta epidemiológica no se pudo averiguar que hubiera viajado recientemente a su país. Los enfermos acudieron a hospitales de diferentes ciudades (León y Palencia) (Usera, 1992; 1993).

De las 6 cepas pertenecienentes al fagotipo E1a, las cepas MR7 y MR8 fueron aisladas de heces y sangre en un niño de 4 años de nacionalidad India. Tras la encuesta epidemiológica se pudo concluir que la enfermedad había sido adquirida en su país de origen (Usera, 1992).

Todas las cepas multirresistentes albergaban un plásmido de 120 Kb que presentaba el mismo patrón de bandas tras la digestión con la enzima *Hind*III.

Nº cepa	Año	Provinc.	Fagot.	Biot.	Resistencias								
				Xy-TTR	AM	CB	CL	GM	SF	TE	TM	CF	KM
MR1	1990	Palencia	M1	— +	R	R	R	S	R	R	R	R	I
MR2	1990	León	M1	— +	R	R	R	S	R	R	R	S	I
MR3	1991	Palencia	E1a	+ +	R	R	R	I	S	R	S	S	I
MR4	1991	Alicante	E1a	+ +	R	R	R	S	R	R	R	S	S
MR5	1991	Alicante	E1a	+ +	R	R	R	S	R	R	R	S	S
MR6	1991	Alicante	E1a	+ +	R	R	R	S	R	R	R	S	R
MR7	1991	Barcelona	E1a	+ +	R	R	R	S	R	R	R	S	S
MR8	1991	Barcelona	E1a	+ +	R	R	R	S	R	R	R	S	S

AM = Ampicilina, CB = Carbenicilina, CL = Cloranfenicol, GM = Gentamicina SF = Sulfametoxazol, TE = Tetraciclina, TM = Trimetoprim, CF = Cefoperazone KM = Kanamicina.

R = Resistente, S = Sensible, I = Intermedio.

II. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO.

A. Preparación de los bloques de ADN.

Debido a que las moléculas grandes de ADN son muy frágiles, y no sobrevivirían intactas a las manipulaciones normales usadas en otros procedimientos, es necesario inmovilizarlas embebidas en bloques de agarosa,

según el procedimiento descrito por Böhm (1992):

1. Un cultivo de la cepa en BHI, a 37°C, durante 4 horas y en agitación para asegurar la fase exponencial de crecimiento de las células, fue lavado y resuspendido en TE pH 8 (Tris-HCL 10mM pH 8/EDTA 1mM pH 8) hasta la densidad óptica 1.0 a 610 nm. La suspensión se volvió a centrifugar y se resuspendió en 2,5 ml de solución SE (ClNa 75mM/ EDTA 25mM pH 7,4).
2. Se mezclaron cantidades iguales de la suspensión anterior y agarosa MP (Boehringer Mannheim) al 1% en solución tampón de agarosa (Tris-HCl 10mM pH 7,4/ $MgCl_2$ 10mM/ EDTA 0,1mM pH 9,5) a 56°C. Rápidamente se dispensó en los moldes del equipo de electroforesis y se dejó enfriar.
3. Se transfirieron los bloques solidificados a un tubo de poliestireno. Se añadieron 2 ml de solución tampón de lisis (Tris-HCl 50mM pH 8/ EDTA 50mM pH 8/ Sarcosina 1%) con Proteinasa K (1mg/ml) y se dejaron toda la noche lisando a 56-60°C.
4. Los bloques se lavaron 8 veces con TE pH 7,5 a intervalos de al menos 30 minutos y se conservaron a 4°C.

B. <u>Digestión con endonucleasas de restricción</u>.

La digestión con la enzima *Xba*I (Boehringer Mannheim) se realizó de la forma convencional, siguiendo las recomendaciones del suministrador, pero sobre el ADN embebido en los bloques. Se cortó un trozo de bloque del tamaño del pocillo del gel y se colocó en un microtubo. El bloque se estabilizó con 125 μl del tampón de la enzima durante 30 minutos y después de retirar este se incubó durante toda la noche a 37°C con 125 μl de tampón al que se añadieron 15 unidades de la enzima.

Finalmente se colocó el bloque en el pocillo de un gel de agarosa previamente preparado en el soporte del equipo de electroforesis a la concentración de 1,2% de agarosa (MP agarose, Boehringer Mannheim) en TBE 0,5x (Tris-borato 45mM/EDTA 1mM pH 8) y se sellaron los pocillos con más

agarosa. Como control de peso molecular se utilizaron bloques preparados con concatémeros de λ ADN (Boehringer Mannheim).

C. Electroforesis.

Se utilizó el sistema de Bio-Rad (Chef-Dr II pulsed field electrophoresis systems) para conseguir las condiciones de electroforesis necesarias para la separación de moléculas de ADN superiores a 25 Kb. El gel fue sometido a electroforesis en TBE 0,5x durante 26 horas, a 200 V y 12°C. El rango de pulsos fue de 1 a 50 segundos con un aumento lineal de los mismos (interpolación).

Después de la electroforesis, los fragmentos de ADN se visualizaron a la luz UV con un transiluminador, previo teñido del gel por inmersión en solución de Bromuro de Etidio 0,5 μg/ml en agua destilada.

III. RIBOTIPIFICACION.

La técnica de detección de los operones de ARNr se realizó con una sonda ADNc, preparada a partir de ARNr comercial de *E.coli*, marcada con Digoxigenina siguiendo las recomendaciones de "The DIG user´s Guide" (Boehringer Mannheim). La ribotipificación consta de los siguientes pasos:

A. Extracción de ADN.

Los métodos de extracción de ADN cromosómico generalmente consisten en la lisis celular con lisozima/detergente seguido de una incubación con proteasa y una serie de extracciones con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico previamente a su precipitación con alcohol. Estos métodos eliminan las proteínas contaminantes pero no son tan efectivos en la eliminación de la gran cantidad de lipopolisacaridos que se producen en las bacterias Gram negativas y que posteriormente interfieren en la actividad de las endonucleasas de restricción.

La extracción con Bromuro de Hexadecil Trimetil Amonio, "CTAB"

(Ausubel, 1991), que forma complejos con los principales contaminantes moleculares lipopolisacáridos y proteínas residuales, resultó muy eficaz en el caso de las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi.

Se siguió un procedimiento minipreparativo. Las cepas se crecieron en TSA y se resuspendieron en 600 µl de TE con SDS 0,5% y Proteinasa K 0,1mg/ml. Esta suspensión se incubó a 37°C durante 1 hora para completar la lisis. Tras la adición de 100 µl de NaCl 5M, para aumentar la concentración de sal por encima de 0,5M y evitar la precipitación de los ácidos nucleicos, los lisados se incubaron con 80 µl de CTAB (CTAB 10% /NaCl 0,7M) a 65°C durante 20 min.

Los complejos formados fueron fácilmente emulsificables y extraibles posteriormente con cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. Después de una nueva extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 y precipitación con alcohol isopropílico el ADN se resuspendió en agua destilada.

La concentración y pureza del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% en TAE 1x (Tris-acetato 40mM/ EDTA 1mM pH 8).

B. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Aproximadamente 1-2 µg del ADN obtenido fue digerido con las endonucleasas de restricción *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I (Pharmacia), en las condiciones recomendadas por el suministrador. La digestión se realizó a 37°C durante 2 horas.

C. Electroforesis de los fragmentos de restricción

Los fragmentos resultantes de la digestión del ADN fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% en tampón TAE (Tris-acetato 040mM/ EDTA 1mM pH 8), durante toda la noche, a 30 Voltios. Se incluyó como marcador de peso molecular el fago λ digerido con *Hind*III marcado con digoxigenina. Los fragmentos de ADN se visualizaron a la luz UV con un transiluminador, tras la tinción de los geles con Bromuro de Etidio.

D. Preparación de una sonda ADNc marcada con digoxigenina

El método para la síntesis de ADNc utilizó, para catalizar la reacción, la enzima "transcriptasa inversa" (Verma, 1981).

Dado que el pH cambia con la temperatura es esencial comprobar que el pH de la mezcla de reacción es el elegido para la incubación. En presencia de altas concentraciones de deoxi-nucleótidos (dNTP) y Mg^{++} se producen muy pocos errores en la incorporación de bases (1 de cada 500) y se previene la prematura terminación de la cadena que se esté sintetizando.

Se siguió el siguiente procedimiento:

1. En un microtubo estéril mezclar 10 μl de la mezcla de oligonucleótidos 10x, 4 μl de solución tampón 5x (250 mM Tris-HCL pH 8,5/ 40mM $MgCl_2$/ 150 mM ditiotritiol DTT), 0,25 μl de ARNr (4μg/μl) y 10,75 μl de agua destilada estéril.
2. Calentar a 68° C durante 5 minutos y dejar enfriar lentamente a temperatura ambiente.
3. Añadir 2 μl de dNTP 10x marcados con digoxigenina y 3 μl de transcriptasa inversa AMV-RT. Mezclar suavemente e incubar a 42° C durante 1 hora al menos.
4. Precipitar el ADNc marcado con digoxigenina añadiendo 2 μl de LiCl 4M y 50 μl de Etanol 95% a -20° C. Mezclar suavemente y centrifugar a 15.000 g durante 15 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con 100 μl de Etanol 70%.
6. Centrifugar 4 minutos, eliminar el sobrenadante y secar a vacío durante 15 minutos. La sonda se resuspende en 20 μl de TE y se guarda a -20° C si no va a ser usada inmediatamente.

La estimación de la cantidad de ADNc marcado con digoxigenina que contiene la sonda se realizó cada vez que se sintetizaba un nuevo lote. En una membrana de nylon se fijaron 2 series de diluciones de sonda y ADN-Dig control por calor a 80°C durante 2 horas. La membrana se sometió a los mismos pasos de detección de genes (apartado G) del procedimiento general descrito posteriormente.

E. Transferencia Southern.

La transferencia del ADN desde el gel a la membrana se realizó por el procedimiento, descrito por Shoutern (1975), siguiendo el manual "Currents Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1991):

1. Despurinación del gel en HCl 0,25N. Mejora la transferencia de los fragmentos de ADN de más de 10 Kb.
2. Desnaturalización del ADN con NaOH 0,5N/NaCl 1,5M
3. Neutralización con NaCl 1,5 M pH 7,2/ Tris HCl 0,5 M pH 7,2/ EDTA 0,001 M pH 7,4.
4. Transferencia de los fragmentos de ADN desde el gel a una membrana de nylon (Boehringer Mannheim) positivamente cargada. La transferencia se realizó por capilaridad en SSC 10x (1x = NaCl 150 mM/ Citrato sódico 5 mM pH 7) durante toda la noche. Una alternativa que acorta el tiempo a 1-2 horas es la transferencia a vacío.

   Una variación de este paso, que permitía la transferencia simultánea a 2 membranas, consistió en situar el gel entre 2 membranas de nylon y este conjunto entre 4 hojas de papel Whatman. Finalmente se terminaba el "bocadillo" con unos 5-10 cm de papel absorbente a cada lado situando encima un peso de ~ 2 Kg. La transferencia se desarrollaba durante toda la noche.
5. Fijación del ADN a la membrana bien por irradiación UV ó por calor a 80° C durante 2 horas. Las membranas pueden ser utilizadas inmediatamente o pueden guardarse a 4°C para su uso posterior.

F. Prehibridación e hibridación

La prehibridación prepara las membranas para la posterior hibridación, bloqueando las zonas de la membrana que ligarían de forma no específica con la sonda. Esto evita que se produzca color de fondo que dificulta la posterior detección del ADN.

Se siguió el siguiente procedimiento:

1. Introducir la membrana en una bolsa de hibridar y añadir 30 ml de solución de prehibridar SSC 5x/ N-lauril sarcosina 0,1%/ SDS 0,02%/ "blocking reagent" 1% (Boehringer Mannheim). Sellar la bolsa procurando que no queden burbujas.
2. Incubar a 68° C 1-2 horas en horno o baño, con agitación suave.
3. Diluir 10 μl de la sonda marcada con Digoxigenina con 5 ml de solución de prehibridación y calentar a ebullición durante 10 minutos la mezcla al baño María para desnaturalizar el ADN. Enfriar rápidamente en hielo.
4. Desechar la solución de prehibridación y añadir la dilución de sonda preparada.
5. Incubar a 68° C durante toda la noche en horno o baño, con agitación suave.
6. Retirar la dilución de la sonda, que contiene sonda marcada sin utilizar, y guardar a $-20°$ C, ya que permanece estable al menos durante un año y puede ser reusada al menos 5 veces. Antes de cada hibridación la dilución debe calentarse a ebullición durante 10 minutos al baño María y enfriarse a continuación rápidamente.
   Sacar la membrana de la bolsa de hibridación y colocarla en una cubeta de lavado.
7. Lavar 2 veces, 5 minutos cada vez, en solución de lavado SSC 2x/ SDS 0,1% a temperatura ambiente.
8. Lavar 2 veces, 15 minutos cada vez, en solución de lavado SSC 0,1x/ SDS 0,1% a la temperatura de hibridación (68° C).

G. Detección de genes

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente.

1. Equilibrar la membrana durante 1 minuto en solución tampón 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,2/ 150 mM NaCl pH 7,2).

2. Bloquear la membrana sumergiéndola en solución tampón 2 (1% Blocking reagent en solución tampón 1) durante 30 minutos.
3. Diluir anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina a 1:5000 en solución tampón 1 (16 μl anti-DG-FA en 80 ml de solución tampón 1). Incubar 30 minutos.
4. Lavar 2 veces, 15 minutos cada vez, en solución tampón 1. Estos lavados eliminan los anticuerpos no fijados.
5. Equilibrar la membrana en solución tampón 3 (100 mM Tris-HCl pH 9,5/ 100 mM NaCl/ 50 mM $MgCl_2$) durante 2 minutos.
6. Mezclar 45 μl de solución de azul de nitrocloro de tetrazolium "NBT" a la concentración de 75 mg/ml en dimetil formamida al 70% y 37 μl de fosfato de 5-bromo,4-cloro,3-indolil,4-toluidina "BCIP" a la concentración de 50 mg/ml en dimetil formamida al 100% en 10 ml de solución tampón 3.
7. Dejar revelar en oscuridad. No agitar mientras se desarrolla el color.

IV. DETECCION DE SECUENCIAS DE INSERCIÓN IS200.

La detección de las secuencias IS200 se realizó por un método similar a la Ribotipificación. Se utilizó una transferencia de Southern doble, por lo que solamente se necesitó un proceso de extracción de ADN, restricción, electroforesis y transferencia de los fragmentos de restricción para obtener las 2 membranas de nylon usadas en ambas técnicas.

Los fragmentos generados por la digestión del ADN con *Hind*III y *Pst*I se hibridaron con una sonda preparada por PCR anidada con dos pares de iniciadores diseñados a partir de las secuencias publicadas (Gibert, 1991).

La prehibridación, hibridación y detección de genes se llevó a cabo como en el apartado de ribotipificación.

D. Preparación de una sonda ADN-IS200 marcada con Digoxigenina.

La reacción de PCR anidada se lleva a cabo en dos fases. Para la amplificación se utilizó una cepa tipo de *Salmonella*, serotipo Typhimurium.

1. Se amplificó por PCR un fragmento de 530 bp con los iniciadores IS200-1 e IS200-4. Cien ml de reacción contenían 100ng de ADN molde (extraído de igual forma que en el apartado III.A), 0,2μg de cada iniciador y 2,5U de Taq polimerasa. La reacción se llevó a cabo en una mezcla 10mM Tris-clorhídrico pH 8.3/ 50mM KCl/ 1,5 mM $MgCl_2$ y 200 μM de cada uno de los deoxirribonucleótidos "dNTP".

   El fragmento se sometió a electroforesis en agarosa al 1% en TAE y se visualizó en un transiluminador de luz UV posteriormente a su tinción con Bromuro de Etidio. El fragmento del tamaño esperado fue recortado y separado del gel y esta porción se sometió a 2-3 ciclos de congelación-descongelación a -70° C. Después de una breve centrifugación 5 μl del sobrenadante se utilizaron para una segunda amplificación de PCR.

2. La segunda fase se realizó con los iniciadores IS200-2 e IS200-3 complementarios a secuencias internas del fragmento anterior, obteniéndose un nuevo fragmento de 376 bp. La reacción se llevó a cabo en las condiciones descritas por el suministrador (Boehringer Mannheim) para el marcado de productos de PCR con Digoxigenina que básicamente no se diferenciaba de las condiciones generales, excepto en que la concentración final de nucleótidos añadidos fue 200 μM para dATP, dCTP y dGTP; 130 μM para dTTP y 70 μM para 11-DIG-dUTP.

   Las temperaturas y tiempos de cada una de las fases de un ciclo, el número de ciclos programados y las características de los iniciadores fueron:

Iniciador IS200 5´→3´	Tm*	Pos.	Temperatura/tiempo			ciclos
			Desn.	Apar.	Exten.	
1: ATCTTGCGGTCTGGCAACTG	63,6°	46	94°/1´	60°/1´	72°/2´	30
2: CTAACAGGCGCATACGATCTGAC	63,2°	598				
3: CCAATGGGGGACGAAAAGAG	63,9°	97	94°/1´	58°/1´	72°/2´	30
4: AGTCCTGTATCTTCGCCGTGTTC	63,9°	472				

* Tm= Temperatura de fusión del iniciador, por encima de la cual no se produce apareamiento entre este y el ADN molde

V. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA "PCR".

De forma general, las condiciones de reacción fueron como las del apartado anterior. Cien ml de reacción contenían 100ng de ADN molde, 0,2μg de cada iniciador y 2,5U de Taq polimerasa. La reacción se llevó a cabo en una mezcla 10mM Tris-clorhídrico pH 8.3/ 50mM KCl/ $MgCl_2$ y 200 μM de cada dNTP. La concentración de Mg^{++} fue en todos los casos 1,5 mM excepto en REP-PCR (2,5 mM) y en AP-PCR (4 mM).

En el método AP-PCR, la reacción se llevó a cabo con un solo iniciador por reacción. Se probaron 17 iniciadores de los que se seleccionaron los 7 descritos posteriormente por ser los que originaban un patrón de más de una banda con buena intensidad. Los iniciadores poseían diferente tamaño (de 10 a 23 pb) y diferente contenido G+C. Algunos fueron iniciadores universales (M13 directo) mientras que la mayoría fueron diseñados con otros propósitos y se utilizaron como totalmente arbitrarios.

La reacción se inició en todos los casos con un ciclo de desnaturalización a 94°C de 4 minutos y finalizó con un ciclo de extensión a 72°C de 10 minutos. Las secuencias de los iniciadores seleccionados, temperaturas de apareamiento y número de ciclos utilizados en cada caso fueron:

Iniciador 5´→3´	Temperatura/tiempo			ciclos
	Desnatur.	Apareamiento	Extensión	
REP-PCR: 1: NNNNCGNCGNCATCNGGC 2: NNCGNCTTATCNGGCCTAC	94°/1´	40°/1´	72°/8´	30
ERIC-PCR: 1R:ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC 2: AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCGC	94°/1´	52°/1´	72°/8´	30
IS200-PCR: 1: CTCTTTTCGTCCCCCATTGG 2: GAACACGGCGAAGATACAGGACT	94°/1´	59°/1´	72°/2´	30
ARNr-PCR: 1: TTGTACACACCGCCCGTCA 2: GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC	94°/1´	55°/1´	72°/2´	30
AP-PCR: 1:CGGTCACTGT 2:TGACCCCGGC 3:TTATGTAAAACGACGGCCAGT (F-M13) 4:CAGGGACTTGTTCGCACC 5:CCGTTCATCAACATAGG 6:TACATTCGAGGACCCCTAAGTG 7:CTTGTGCCGCTTCTATGTCCTGA	94°/1´	36°1´	72°/2´	40

Después de la amplificación, 10μl de reacción se sometieron a electroforesis en agarosa al 2% en TAE y los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz UV posteriormente a su tinción en Bromuro de Etidio.

En algunos casos, en los que se consideró que la digestión con enzimas de restricción de los fragmentos obtenidos podía mejorar el poder discriminatorio de la técnica, 10 μl de producto de PCR fueron digeridos con las

enzimas *Alu*I, *Hae*III, *Hpa*II y *Rsa*I en las condiciones recomendadas por el suministrador (Pharmacia). Los fragmentos resultantes, generalmente de pequeño tamaño, fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 3% en TAE.

VI. Prueba de sensibilidad a antimicrobianos.

Se realizó, en algunas de las cepas implicadas en el brote 4, por el método de Kirby-Bauer (Bauer, 1966) de inhibición de crecimiento por difusión en placa del antimicrobiano impregnado en discos.

Los antimicrobianos utilizados y la carga en μgr de los discos fueron:

Penicilinas:	Amoxicilina	25
	Ampicilina	10
	Carbenicilina	100
Monobactamicos:	Aztreonam	30
Cefalosporinas:	Cefazolina	30
	Cefoperazona	75
	Cefotaxima	30
	Cefoxitina	30
Aminoglicósidos:	Amikacina	30
	Gentamicina	10
	Kanamicina	30
Quinolonas fluoradas:	Ciprofloxacino	5
Otros:	Cloranfenicol	30
	Tetraciclina	30
	Sulfometoxazol	100
	Trimetoprim	5
	Nitrofurantoina	300

VII. Inducción de fagos lisogénicos.

Se indujeron los posibles fagos lisogénicos, por el método descrito por Saxe y Notley (1978) con Mitomicina C, en algunas de las cepas implicadas en el brote epidémico 4.

VIII. Poder de Discriminación

Se calculó el indice de Discriminación de los distintos métodos como sistema de tipificación, aplicando el "Indice de Diversidad de Simpson" (Hunter, 1988) sobre la muestra aleatoria.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} n_j(n_j-1)$$

D = indice de discriminación
N = número de cepas
s = número de tipos diferentes
n_j = número de cepas pertenecientes al tipo j

IX. Análisis estadístico de los datos.

Se asignó un tipo arbitrario a cada uno de los patrones de bandas obtenidos para ribotipificación y electroforesis en campo pulsado. Dos patrones o tipos fueron considerados idénticos si existía una concordancia absoluta en el perfil de bandas y diferentes si había una diferencia de una banda o más.

La similitud entre dos tipos fue evaluada con el programa informático MVSP (Kovach Computing Services, 85 Nant-y-Felin, Pentraeth, Anglesey LL75 8UY, Wales, Reino Unido) que realiza el análisis estadístico de multivariables. El programa MVSP creó una matriz de coeficientes de similitud de Sorensen o Dice (Römling, 1992) y generó un dendrograma, por emparejamiento de medias no ponderadas, que relacionaba los diferentes patrones según su índice de similitud (Li, 1981).

RESULTADOS.....

I GRUPO CONTROL

1. Patrones de digestión de ADN por endonucleasas.

Los diferentes tipos se definieron por presencia o ausencia de una banda de determinado peso molecular. Todas las cepas se tipificaron por los 3 métodos utilizados: electroforesis en campo pulsado, ribotipificación y tipificación por las secuencias de inserción IS200.

Para asegurar la reproducibilidad de cada técnica las cepas fueron estudiadas al menos dos veces, repitiéndose en todos los casos el patrón de bandas.

a. Tipos electroforéticos en campo pulsado "tipos-PFGE".

La electroforesis en campo pulsado de las cepas control produjo 9 patrones distintos. De 13 a 15 bandas pudieron ser analizadas claramente cuando se digirió el ADN total con la enzima *Xba*I. El alto poder discriminatorio aparente y la buena resolución de bandas determinó la selección de esta enzima para el estudio de los otros grupos (Figura 1), (Foto 1).

N°cepa	Fagotipo	Tipo PFGE/*Xba*I
1	NT	1
2	M1	2
3	53	3
4	D2	4
5	51	5
6	A	2
7	E1a	6
8	A	7
9	34	8
10	A	9

Figura 1. Representación de los tipos electroforéticos en campo pulsado obtenidos con las cepas control digeridas con la enzima *Xba*I. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular de concatémeros de λ ADN desde 48,5 Kpb (monómero) hasta más de 1000 Kpb (20-mero)

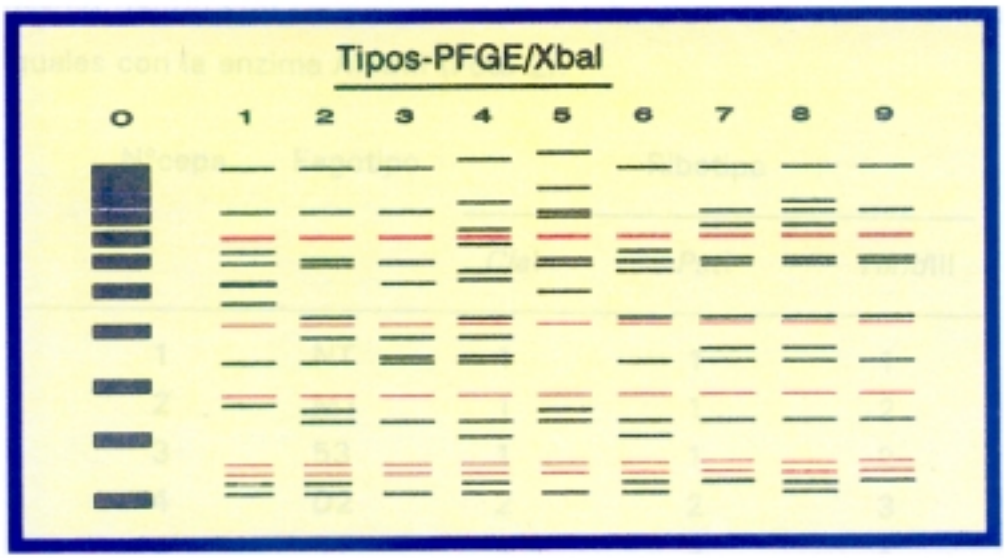
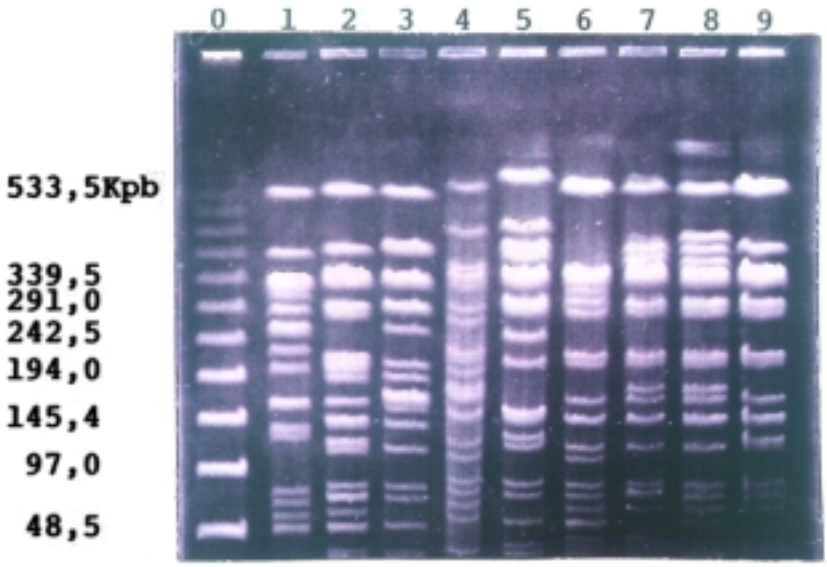


Foto 1. Tipos electroforéticos en campo pulsado del ADN de las cepas control digerido con la enzima *Xba*I.



b. Ribotipificación

Se analizaron los patrones de hibridación obtenidos con las enzimas de restricción *Cla*I, *Pst*I y *Hind*III. Se obtuvieron 7 patrones diferentes con cada una de las enzimas, con una buena resolución de bandas que oscilaban entre 6 y 7 por cepa. Tres cepas presentaban el mismo patrón con las enzimas *Cla*I y *Pst*I, pero sólo dos de ellas eran iguales con la enzima *Hind*III (Foto 2).

N°cepa	Fagotipo	Ribotipo		
		*Cla*I	*Pst*I	*Hind*III
1	NT	1	1	1
2	M1	1	1	2
3	53	1	1	2
4	D2	2	2	3
5	51	3	3	4
6	A	4	4	5
7	E1a	5	5	6
8	A	5	5	6
9	34	6	6	7
10	A	7	7	7

Foto 2. Ribotipos/*Hind*III de las cepas control de *Salmonella*, serotipo Typhi.

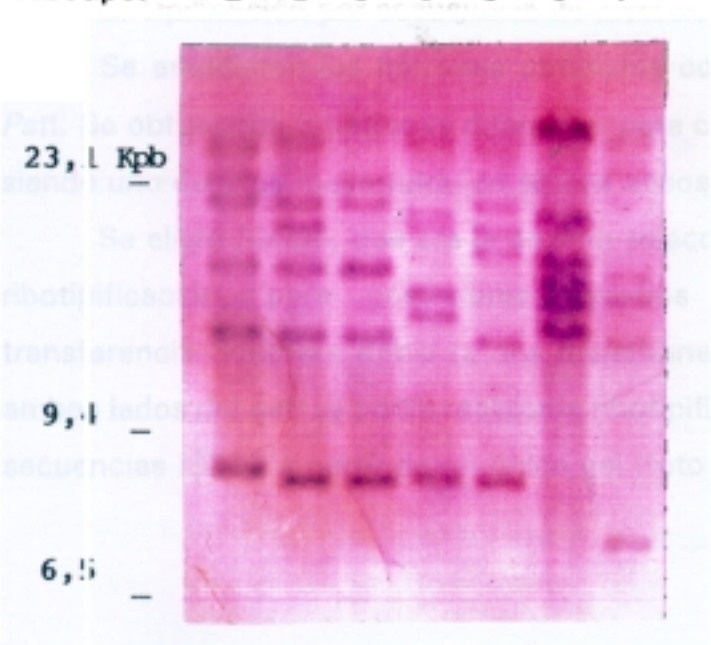
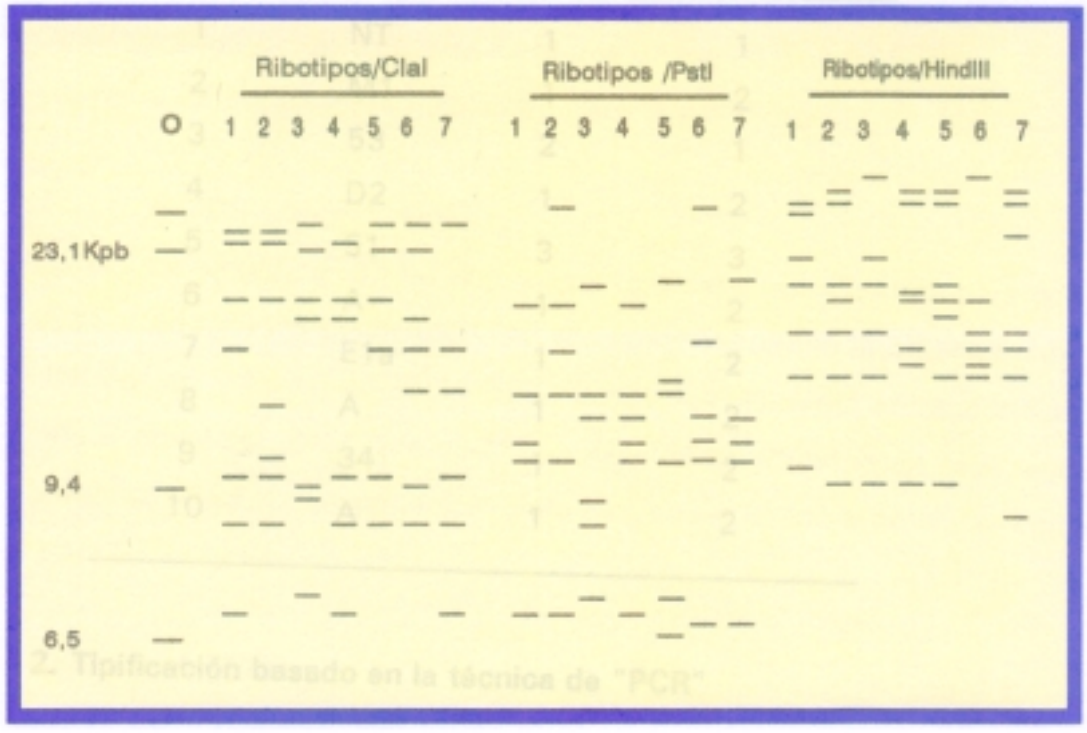


Figura 2. Representación de los ribotipos obtenidos con las 10 cepas control de *Salmonella*, serotipo Typhi digeridas con las enzimas *Cla*I, *Pst*I y *Hind*III. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.



Se seleccionó *Hind*III para el estudio de la muestra aleatoria, por su aparente mayor discriminación y por ser además de uso habitual en el laboratorio (Figura 2)

c. Tipificación por secuencias de inserción IS200

Se estudiaron los patrones obtenidos con las enzimas *Hind*III y *Pst*I. Se obtuvieron 3 patrones diferentes para cada una de las enzimas, siendo uno de ellos mayoritario en ambos casos (Figura 5, tipos 1 a 3)

Se eligió *Hind*III, que era la enzima seleccionada en la técnica de ribotipificación, para posteriores estudios porque mediante la transferencia Southern doble (a dos membranas de nylon colocadas a ambos lados del gel) se podía realizar la ribotipificación y tipificación por secuencias IS200 a partir de un único gel (foto 7).

Nºcepa	Fagotipo	Tipo IS200	
		*Hind*III	*Pst*I
1	NT	1	1
2	M1	1	2
3	53	2	1
4	D2	1	2
5	51	3	3
6	A	1	2
7	E1a	1	2
8	A	1	2
9	34	1	2
10	A	1	2

2. Tipificación basado en la técnica de "PCR"

a. REP-PCR.

No se encontraron diferencias entre las cepas del grupo control, obteniéndose en todos los casos el mismo patrón de bandas en el rango de 150 a 1500 pb.

b. ERIC-PRC.

En todas las cepas control se amplificó un único fragmento de ADN de igual tamaño (~ 300 pb), (Foto 3).

c. IS200-PCR.

En 9 de las 10 cepas control estudiadas se obtuvo un único fragmento de ADN de ~ 3000 pb, mientras que de la cepa 3 no se pudo amplificar ningún fragmento (Foto 3).

El fragmento amplificado, aunque aparentemente idéntico en todas

las cepas, fue digerido con diferentes enzimas para intentar discriminar entre ellas.

Se analizaron los patrones de restricción "RFLP-PCR" con las enzimas *Alu*I, *Hae*III, *Hpa*II y *Rsa*I que reconocen secuencias cortas. Los patrones fueron iguales para cada una de las enzimas utilizadas, con un número de bandas que oscilaban entre 2 y 5 (Foto 4).

d. PCR-ribotipificación.

La amplificación de la región intergénica que codifica para ARNr 16S y 23S de los operones ARNr dio como resultado la obtención de 2 bandas en el rango de 750 y 900 pb que posiblemente correspondían a los 2 tipos de genes que codifican para ARNt situados en esta región (Brosius, 1981), no encontrándose ninguna diferencia entre las cepas control (Foto 4).

e. AP-PCR.

Se estudiaron las cepas control 1 y 2 con 15 iniciadores de diferente número de pares de bases y diferente contenido G + C.

Las amplificaciones se llevaron a cabo con diferentes temperaturas de apareamiento: 25°C, 36°C y 40°C.

La estrategia de amplificación fue o bien en una fase con todos los ciclos iguales a baja temperatura de apareamiento, o en dos fases, una primera a baja temperatura seguida de una segunda a más alta temperatura (en función del iniciador utilizado) para favorecer la amplificación más específica de fragmentos obtenidos en la primera fase.

Se seleccionaron los 7 iniciadores descritos en el apartado de material y métodos. Estos iniciadores amplificaban un número de bandas discreto, con una buena resolución e intensidad de las mismas, los ciclos fueron todos iguales y la temperatura de apareamiento de 36 °C. Sin embargo, cuando se utilizaron con las 10 cepas control, no discriminaron entre ellas obteniéndose en todos los casos el mismo patrón.

Foto 3. A: IS200-PCR de las cepas control 1 y 2 de *Salmonella*, serotipo Typhi. B: ERIC-PCR de las cepas control 1 y 2 de *Salmonella*, serotipo Typhi. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular.

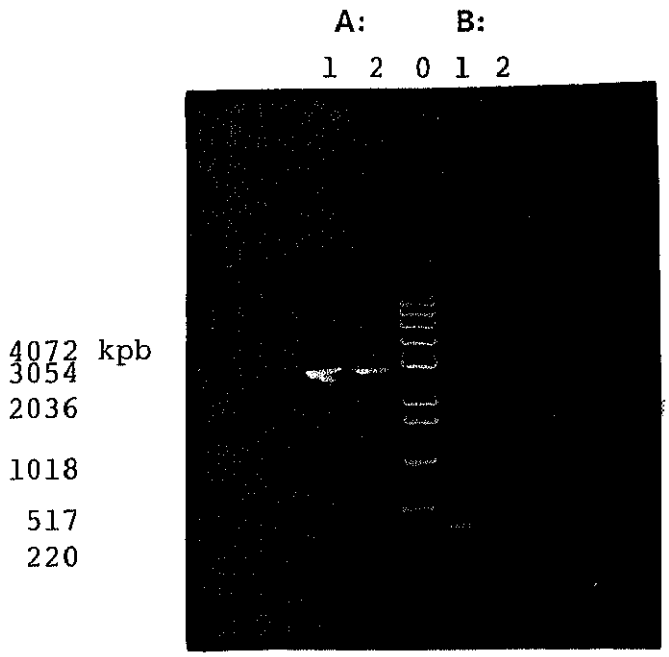
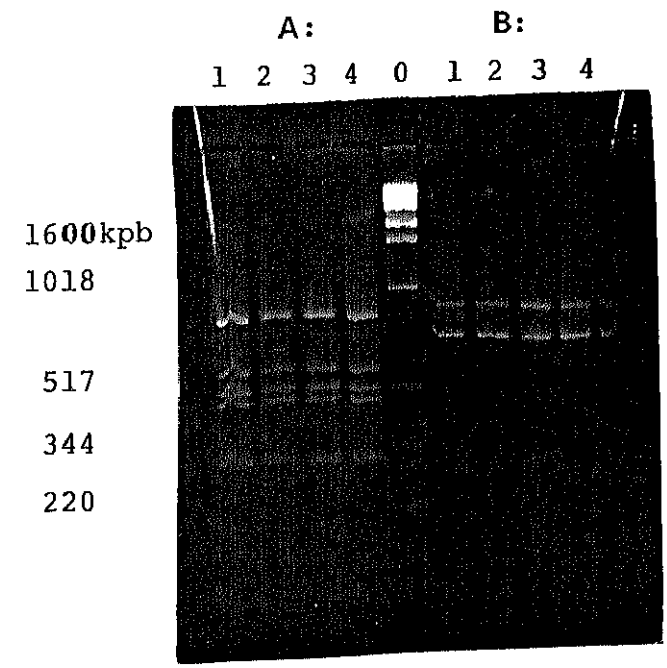


Foto 4. A: Fragmentos de restricción con la endonucleasa *Alu*I "RFLP-PCR" del ADN amplificado mediante IS200-PCR en las cepas control 1 a 4 de *Salmonella*, serotipo Typhi. B: PCR-ribotipificación de las cepas control 1 a 4 de *Salmonella*, serotipo Typhi. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular.



II. MUESTRA ALEATORIA.

1. Patrones de digestión de ADN por endonucleasas

a. Tipos electroforéticos en campo pulsado

Se distinguieron 22 tipos-PFGE diferentes entre las 25 cepas de la muestra aleatoria. Los tipos 15 y 20 fueron los únicos encontrados en más de una cepa. El índice de discriminación fue 0,986, superior al obtenido entre las mismas cepas con la fagotipificación (Tabla 2), (Foto 5, tipos 10 a 18).

Fueron analizadas de 13 a 15 bandas por cepa en un rango de 50 Kpb a 600 Kpb. Bandas de menor tamaño no se podían diferenciar fácilmente. Cinco bandas fueron comunes a todos los tipos y en total se localizaron 30 bandas diferentes (Figura 3, tipos 10 a 31).

b. Ribotipificación

Todas las cepas presentaban al menos 6 bandas de hibridación.

Se obtuvieron 16 ribotipos (patrones de hibridación diferentes) con la enzima *Hind*III en las 25 cepas aleatoriamente seleccionadas de los años 1990-94 (Tabla 2). Algunos de estos ribotipos se muestran en la foto 6.

En total se obtuvo hibridación con 18 bandas diferentes, si bien cada cepa presentaba de 6 a 7 bandas desde un tamaño de 6.500 pb hasta más de 23.000 pb. No se obtuvo ninguna banda común a todas las cepas, aunque algunas fueron más frecuentes que otras (Figura 4, tipos 6 y 8 a 23).

El ribotipo 6 coincidió con el encontrado en el grupo control. El ribotipo 9 (4 cepas), los ribotipos 6 y 20 (3 cepas por tipo) y el ribotipo 18 (2 cepas) fueron los únicos que se encontraron repetidos.

El índice de discriminación 0,956 también fue superior al de la fagotipificación para las mismas cepas.

Foto 5. Tipos-PFGE con la enzima *Xba*I en algunas de las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi de la muestra aleatoria. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular de concatémeros de λ ADN desde 48,5 Kpb (monómero) hasta más de 1000 Kpb (20-mero)

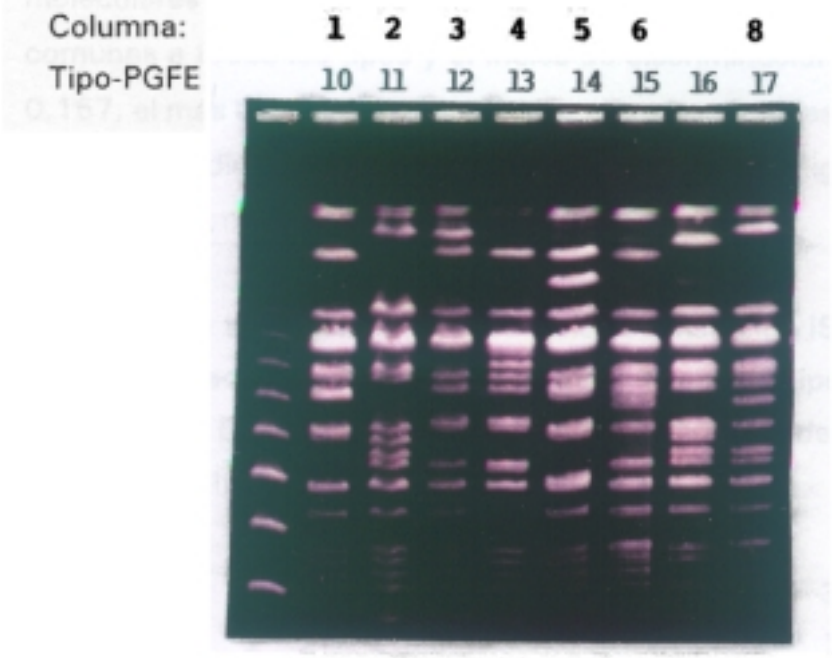
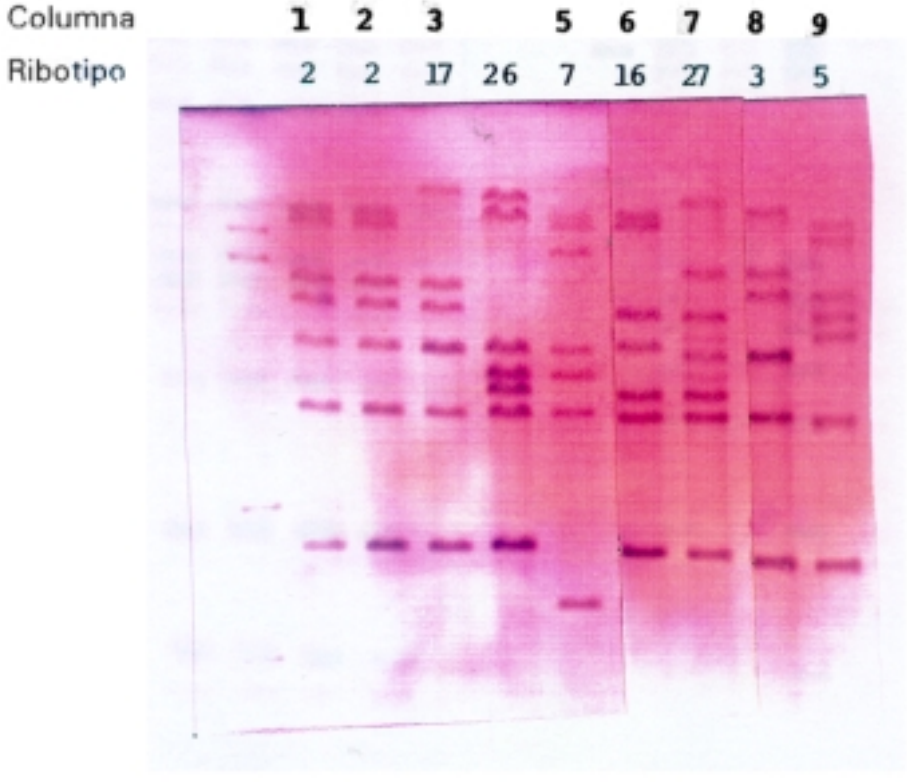


Foto 6. Ribotipos obtenidos con la enzima *Hind*III en cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.



c. Tipificación por secuencias de inserción IS200

Todas las cepas estudiadas excepto dos, que presentaron un perfil de bandas diferente a los encontrados en el grupo control, pertenecían al tipo 1. Se diferenciaron de 19 a 20 bandas por cepa con unos pesos moleculares desde 500 pb a más de 23.000 pb. Dieciséis bandas fueron comunes a todos los tipos y el indice de discriminación de Simpson fue 0,157, el más bajo de los encontrados entre las técnicas que analizan los patrones de digestión con endonucleasas (Tabla 2), (Figura 5, tipos 1, 4 y 5) (Foto 7).

Foto 7. Patrones de tipificación por secuencias de inserción IS200 en algunas de las cepas estudiadas de *Salmonella*, serotipo Typhi. A: tipos IS200/*Hind*III B: tipos IS200/*Pst*I. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III

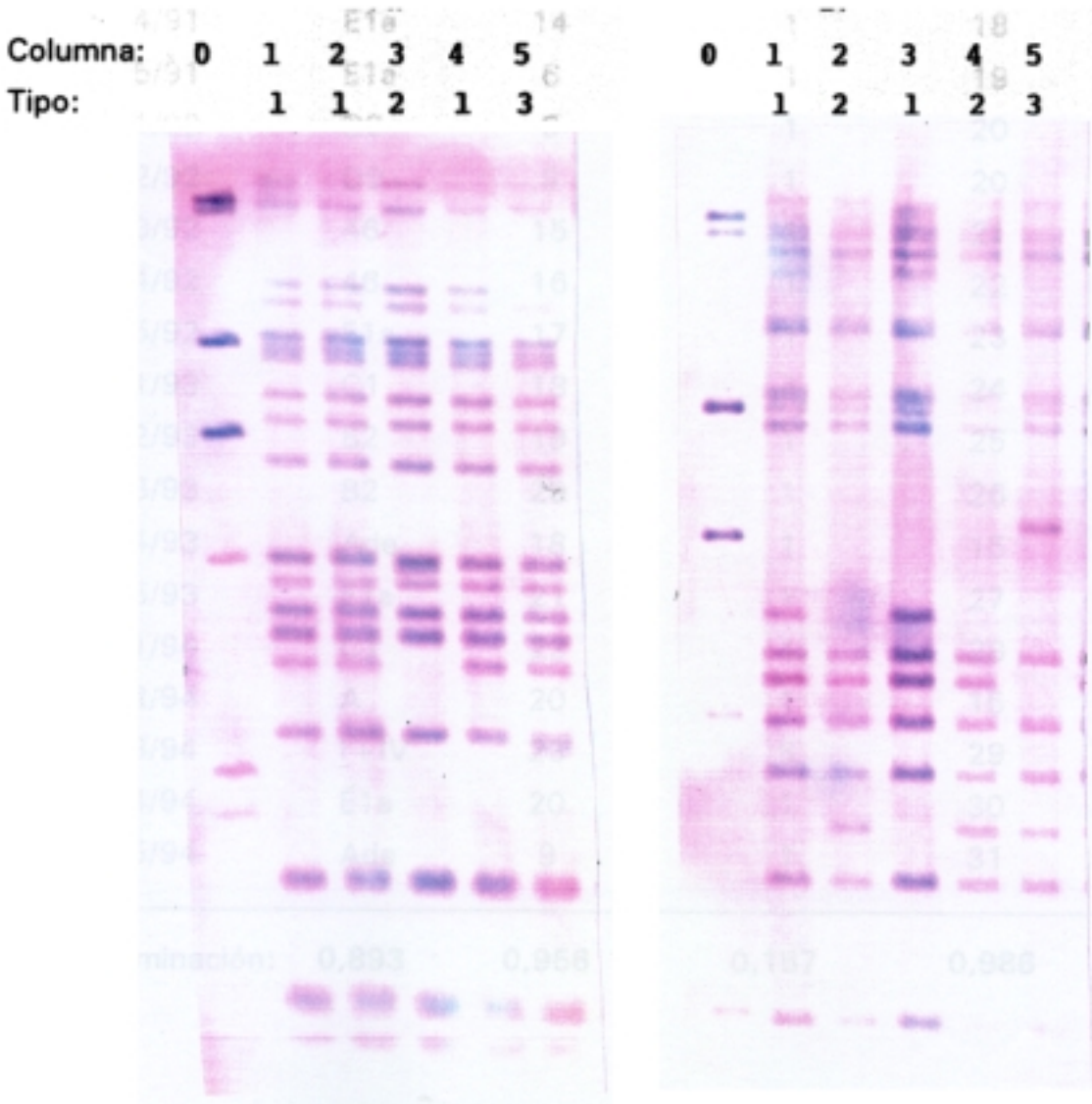


Tabla 2. Distribución de los tipos obtenidos en la muestra aleatoria con cada uno de los métodos estudiados.

N°cepa	Fagotipo	Ribotipo *Hind*III	tipo-IS200 *Hind*III	tipo-PFGE *Xba*I
1/90	C1	6	1	10
2/90	A	8	1	11
3/90	D9	9	1	12
4/90	D1	10	1	13
5/90	C1	11	1	14
1/91	Ade	6	1	15
2/91	A	12	1	16
3/91	Ade	13	1	17
4/91	E1a	14	1	18
5/91	E1a	6	1	19
1/92	D9	9	1	20
2/92	D9	9	1	20
3/92	46	15	1	21
4/92	46	16	1	22
5/92	E1a	17	1	23
1/93	C1	18	4	24
2/93	B2	19	1	25
3/93	B2	20	1	26
4/93	Ade	18	1	15
5/93	E1a	21	1	27
1/94	C1	22	1	28
2/94	A	20	1	15
3/94	I+IV	23	5	29
4/94	E1a	20	1	30
5/94	Ade	9	1	31
I. Discriminación:	**0,893**	**0,956**	**0,157**	**0,986**

Figura 3. Representación de los tipos obtenidos por electroforesis en campo pulsado con las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi de todos los grupos estudiados, digeridas con la enzima *Xba*I. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular de concatémeros de λ ADN desde 48,5 Kpb (monómero) hasta más de 1000 Kpb (20-mero).

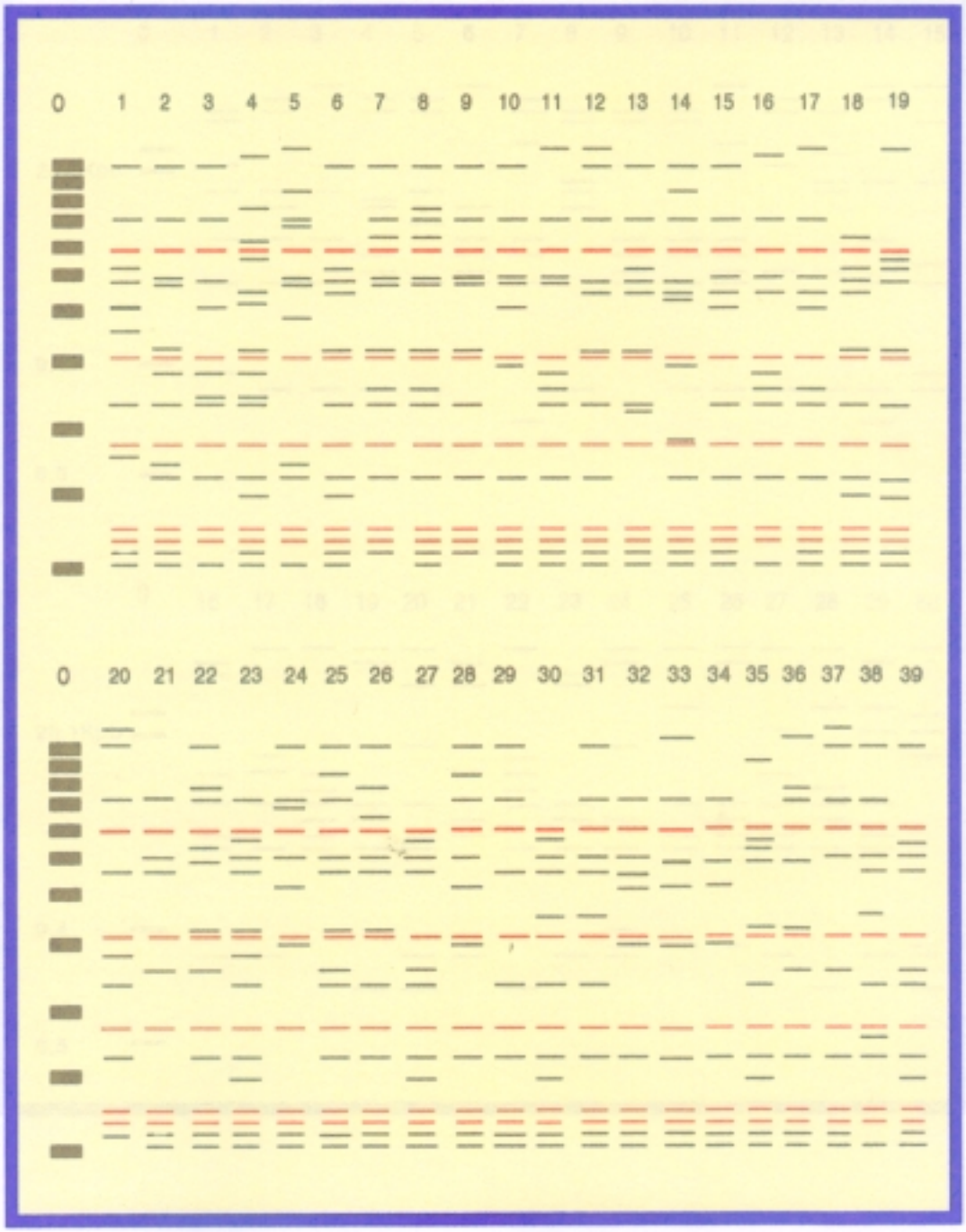


Figura 4. Representación de los ribotipos obtenidos con las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi de todos los grupos estudiados digeridas con *Hind*III. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.

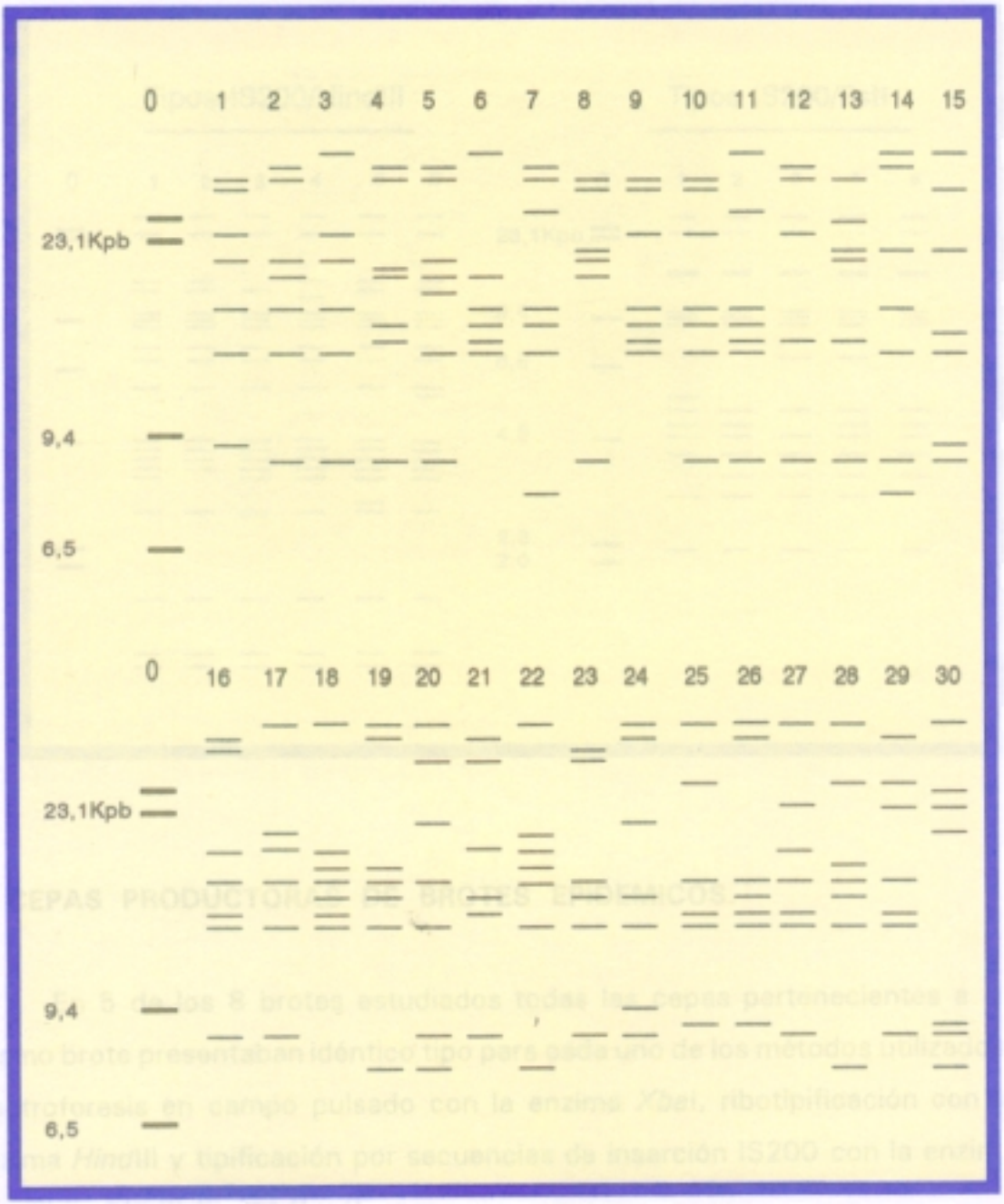
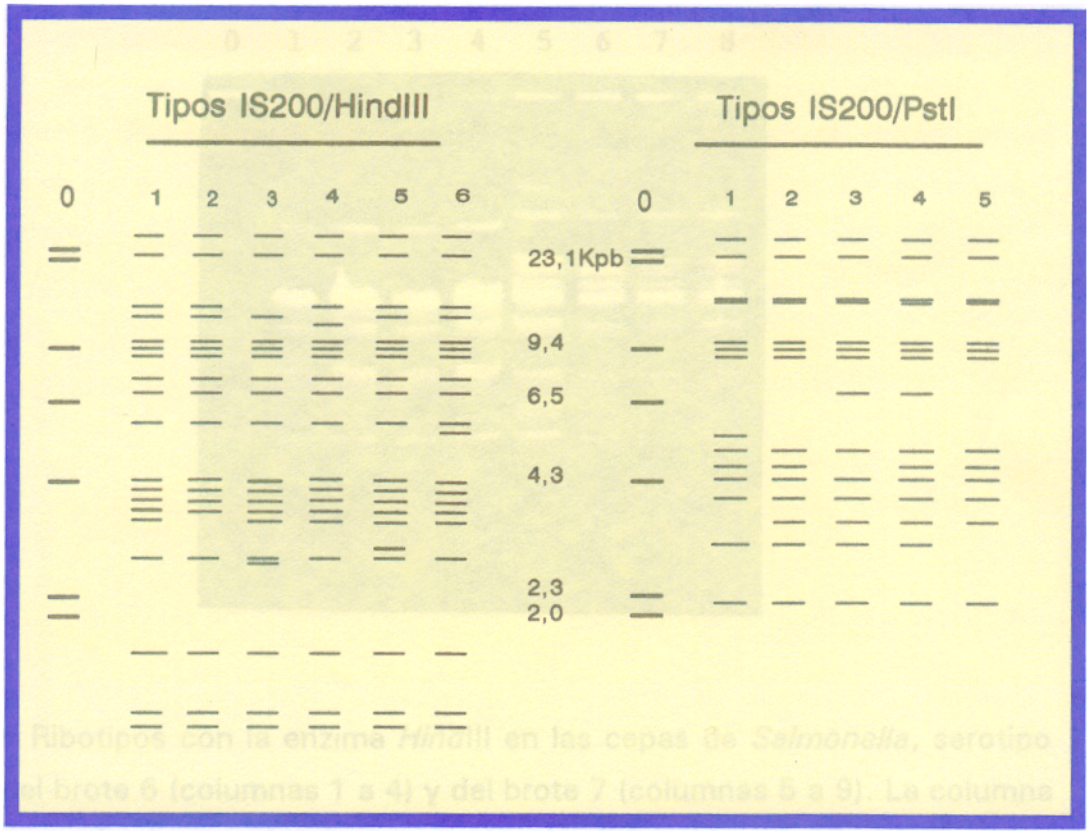


Figura 5. Tipos IS200 obtenidos con las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi de todos los grupos estudiados, digeridas con las enzimas *Hind*III y *Pst*I. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.



III CEPAS PRODUCTORAS DE BROTES EPIDEMICOS.

En 5 de los 8 brotes estudiados todas las cepas pertenecientes a un mismo brote presentaban idéntico tipo para cada uno de los métodos utilizados: electroforesis en campo pulsado con la enzima *Xba*I, ribotipificación con la enzima *Hind*III y tipificación por secuencias de inserción IS200 con la enzima *Hind*III (Tabla 3) (Fotos 8 y 9).

Foto 8. Tipos-PFGE con la enzima *Xba*I en las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi del brote 3 (columnas 1 a 4) y en una selección de cepas del brote 4 (columnas 5 a 8). La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular de concatémeros de λ ADN desde 48,5 Kpb (monómero) hasta más de 1000 Kpb (20-mero).

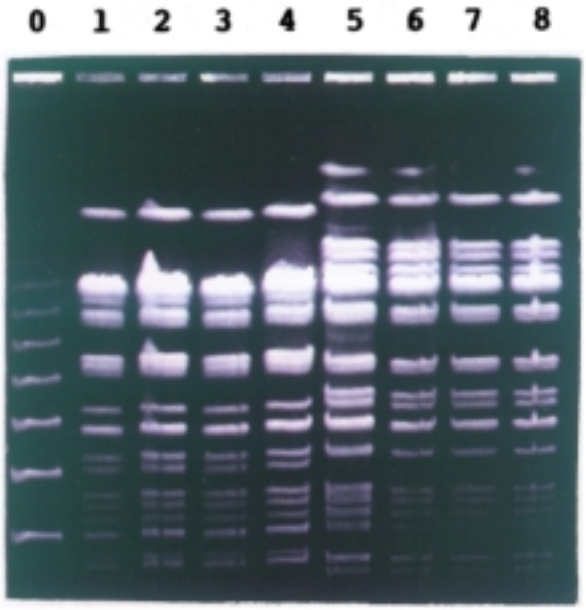
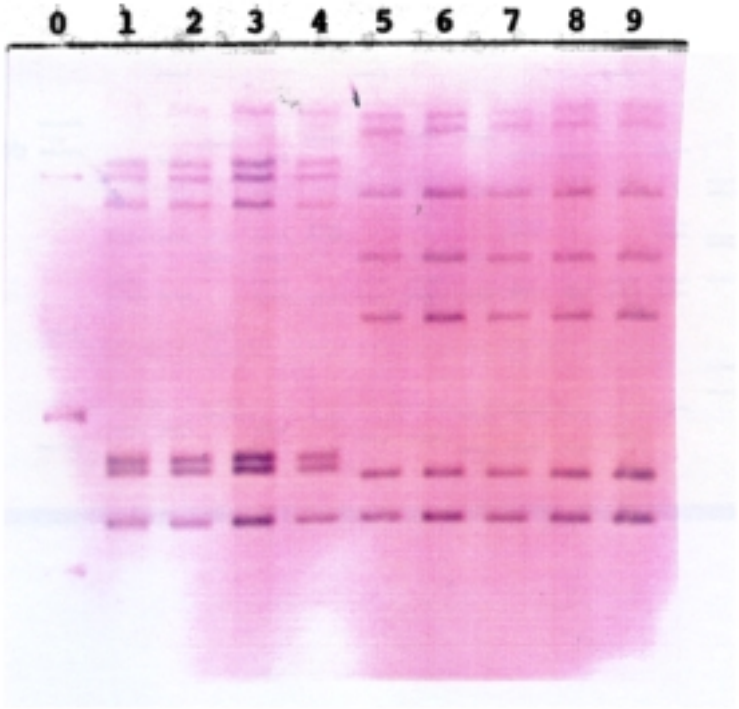


Foto 9. Ribotipos con la enzima *Hind*III en las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi del brote 6 (columnas 1 a 4) y del brote 7 (columnas 5 a 9). La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.



En los brotes número 2, 4 y 5 se obtuvieron 2 tipos diferentes por brote con alguno de los marcadores estudiados. Para analizar más ampliamente las variaciones observadas en este grupo de cepas se realizó el estudio adicional de ribotipificación con las enzimas *Cla*I y *Pst*I (Figura 6) y tipificación por secuencias de inserción IS200 con *Pst*I (Figura 5).

Figura 6. Representación de los ribotipos obtenidos con las enzimas *Cla*I y *Pst*I en las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi del grupo control, en las cepas implicadas en brotes epidémicos y en las multirresistentes. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.

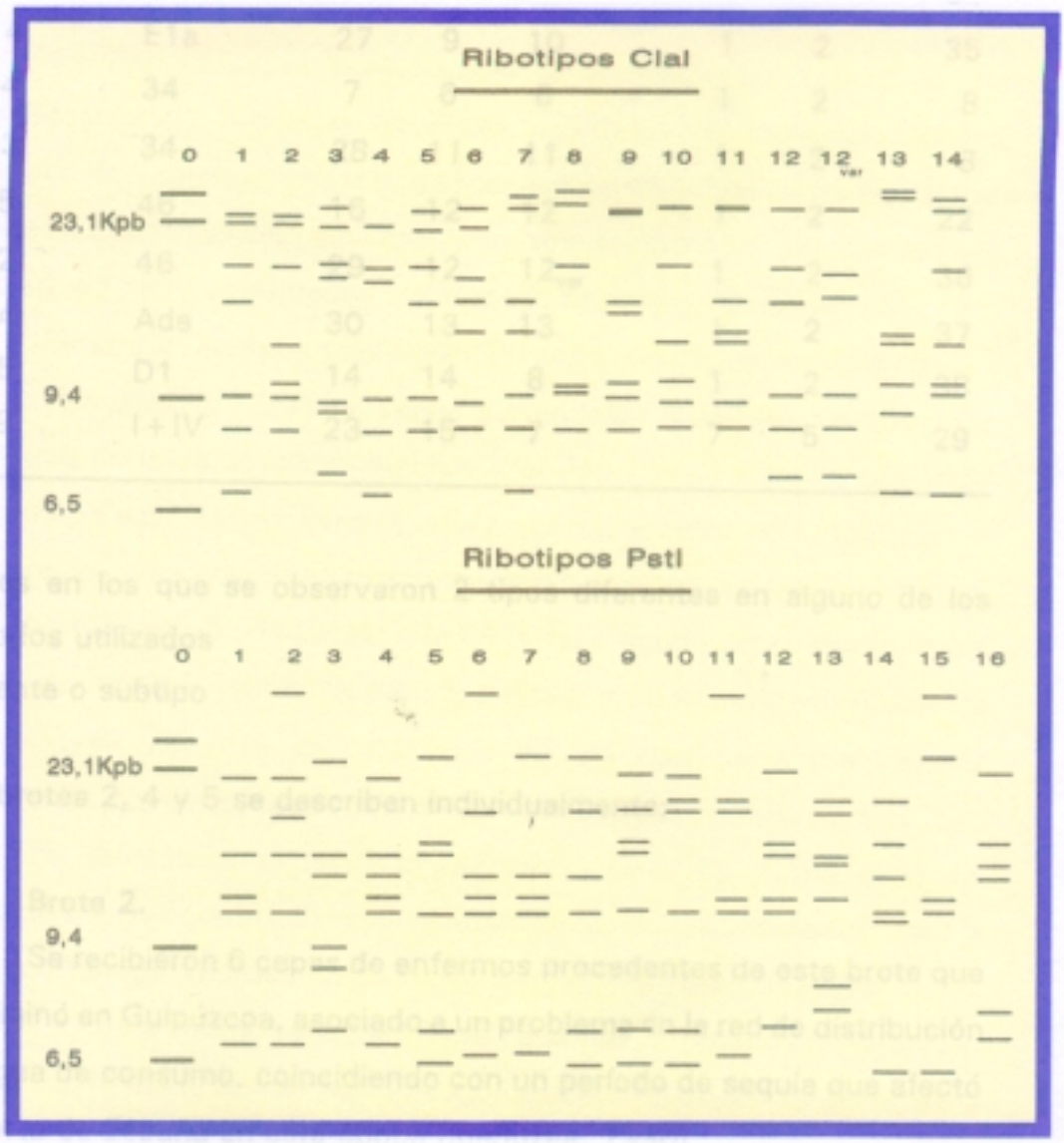


Tabla 3. Distribución de los tipos obtenidos en brotes epidémicos.

Brote	N°cepas	Fagotipo	Ribotipo			Tipo-IS200		Tipo PFGE
			*Hind*III	*Pst*I	*Cla*I	*Hind*III	*Pst*I	*Xba*I
1	4	C1	24	8	8	1	2	32
2*	5	C4	25	9	2	6	4	33
	1	C4	26	10	9	6	4	34
3	4	E1a	27	9	10	1	2	35
4*	14	34	7	6	6	1	2	8
	3	34	28	11	11	1	2	8
5*	25	46	16	12	12	1	2	22
	12	46	29	12	12_{var}	1	2	36
6	4	Ade	30	13	13	1	2	37
7	5	D1	14	14	8	1	2	38
8	9	I+IV	23	15	7	7	5	29

* Brotes en los que se observaron 2 tipos diferentes en alguno de los métodos utilizados

var Variante o subtipo

Los brotes 2, 4 y 5 se describen individualmente:

Brote 2.

Se recibieron 6 cepas de enfermos procedentes de este brote que se originó en Guipúzcoa, asociado a un problema en la red de distribución de agua de consumo, coincidiendo con un período de sequía que afectó al Norte de España en esta época (Ibarluzea, 1990).

Cinco cepas pertenecían al mismo ribotipo para cada una de las enzimas *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I. Una cepa fue diferente de las anteriores (Figura 7) (Foto 10).

Lo mismo ocurrió cuando se estudiaron estas cepas digeridas con la enzima *Xba*I por electroforesis en campo pulsado. Se obtenían los tipos 33 y 34 que se diferenciaban en una sola banda (Figura 8) (Foto 11).

Brote 4.

Ocurrió en un colegio de Madrid (Usera, 1993). La ribotipificación se efectuó en 16 cepas incluyendo la de un manipulador de alimentos (portador sano), 3 parejas de cepas aisladas de 3 enfermos con un intervalo de tiempo entre los dos aislamientos de al menos un mes y una pareja de cepas también aisladas de un solo enfermo pertenecientes a la fase aguda de la enfermedad y a una recaída respectivamente.

Mostró 2 ribotipos diferentes con cada una de las enzimas *Hind*III, *Cla*I y *Pst*I (Figura 7). Trece cepas pertenecían al mismo ribotipo para cada una de las enzimas analizadas (ribotipo 7 para *Hind*III), una cepa presentaba patrones de bandas diferentes del anterior con cada enzima (ribotipo 28 para *Hind*III). Finalmente de las dos cepas pertenecientes al enfermo que sufrió una recaída, la de la fase aguda mostraba un perfil mixto que resultó debido a un cultivo mixto y pudo ser posteriormente reaislado en colonias de cada uno de los dos tipos previamente detectados. La cepa procedente de la recaída pertenecía al ribotipo 28.

Se seleccionaron las 3 cepas del ribotipo 28 y una cepa del ribotipo 7 mayoritario, para el estudio de patrones de sensibilidad a antimicrobianos e inducción de fagos lisogénicos con Mitomicina C. Todas las cepas fueron sensibles a los 18 antimicrobianos probados. No se detectó la presencia de fagos lisogénicos por microscopía electrónica ni se obtuvo lisis al enfrentar los sobrenadantes a las propias cepas del estudio ni a una selección de cepas presumiblemente sensibles.

Sin embargo, la electroforesis en campo pulsado no distinguió entre cepas de los dos ribotipos. Todas pertenecían al mismo tipo 8 para *Xba*I (Figura 8).

Brote 5.

Se originó en un área de Barcelona durante los años 1990-94 con un goteo de casos a lo largo de estos años debido a un manipulador de alimentos ocasional que poseía una larga historia de problemas intestinales.

Inicialmente se estudiaron 27 cepas epidemiológicamente asociadas al brote, 26 de enfermos y una del manipulador. Se detectaron 2 ribotipos diferentes para *Hind*III, el ribotipo 16 (21 cepas, incluida la cepa del manipulador) y el ribotipo 29 (6 cepas). Sin embargo, cuando se analizaban los patrones obtenidos con las enzimas *Pst*I y *Cla*I o bien no se observaban diferencias entre las cepas (ribotipo 12 para *Pst*I) o aquellas eran difíciles de apreciar y se consideró que un ribotipo era una variante del otro (ribotipos 12 y 12_{var} para *Cla*I) (Figura 7).

Se estudiaron los ribotipos obtenidos con *Hind*III de 3 cepas adicionales procedentes de diferentes aislamientos del manipulador. Las 3 cepas pertenecían al ribotipo 29, diferente del de la cepa inicialmente estudiada, por lo que, en aquellos casos de los que se posería varios aislamientos de un mismo enfermo, se analizaron en paralelo todas las cepas disponibles. En total se tipificaron 7 cepas más procedentes de 6 enfermos.

En una de las parejas estudiadas y en las 4 cepas procedentes del manipulador, se encontraron los dos tipos asociados al brote (ribotipos 16 y 29 para *Hind*III).

La electroforesis en campo pulsado también fue capaz de diferenciar, en las mismas cepas, los dos tipos detectados por ribotipificación (tipos-PFGE 22 y 36 para *Xba*I) (Figura 8) (Foto 11).

Foto 10. Ribotipificación en las cepas de *Salmonella*, Typhi del brote 2. A: Ribotipos/*Hind*III (columnas 1 a 5). B: Ribotipos/*Pst*I (columnas 6 a 12). C: Ribotipos/*Cla*I (columnas 13 a 19). La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.

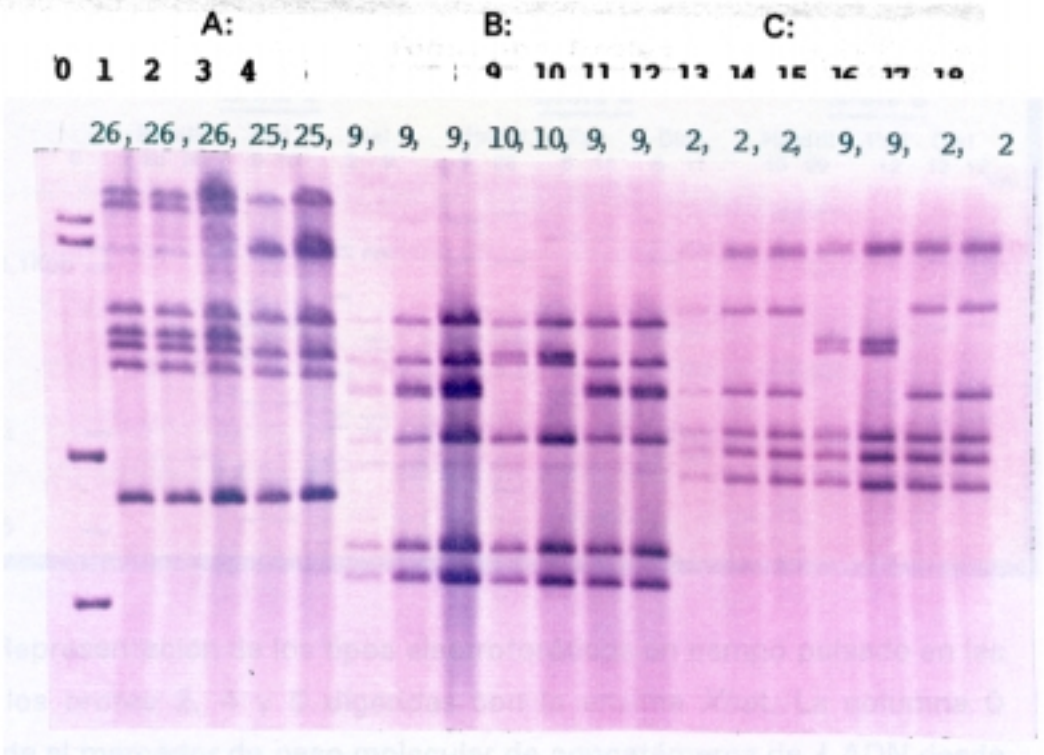


Foto 11. Tipos-PFGE con la enzima *Xba*I de cepas del brote 2 (tipos-PFGE 33 y 34, columnas 1 a 4) y del brote 5 (tipos-PFGE 22 y 36, columnas 5 a 9). La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular de concatémeros de λ ADN desde 48,5 Kpb (monómero) hasta más de 1000 Kpb (20-mero).

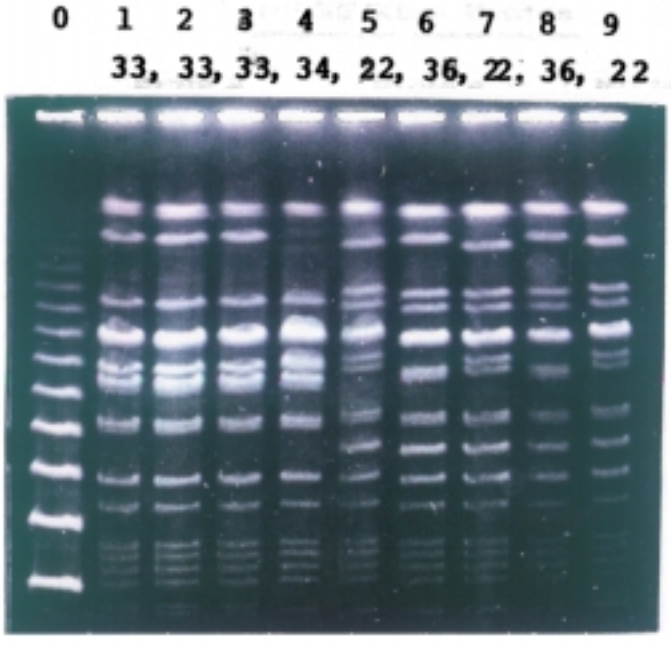


Figura 7. Representación de los ribotipos obtenidos en las cepas de los brotes 2, 4 y 5 digeridas con las enzimas *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.

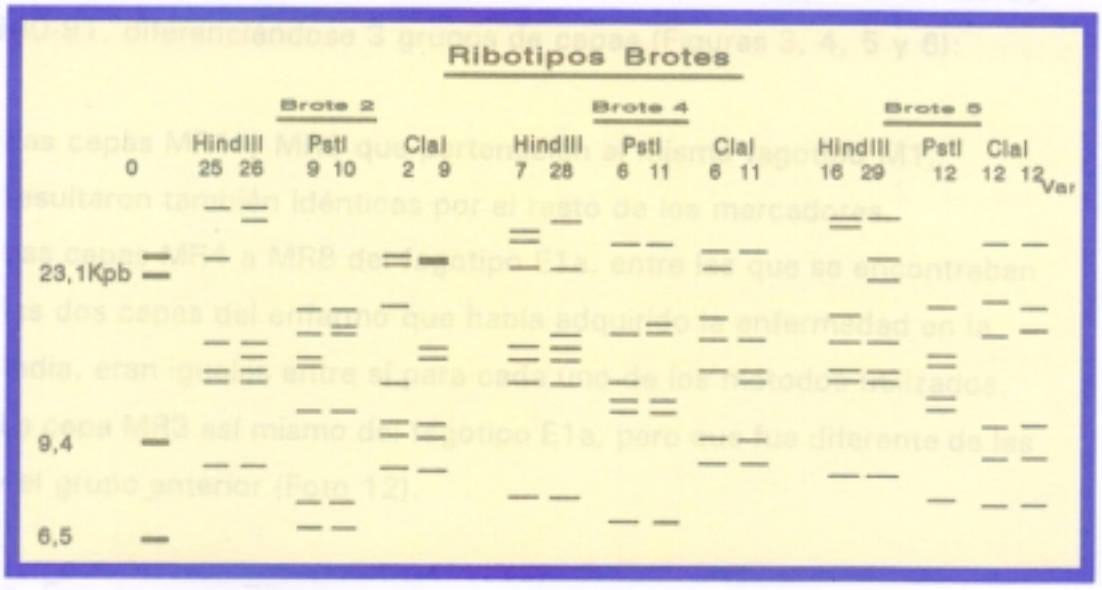
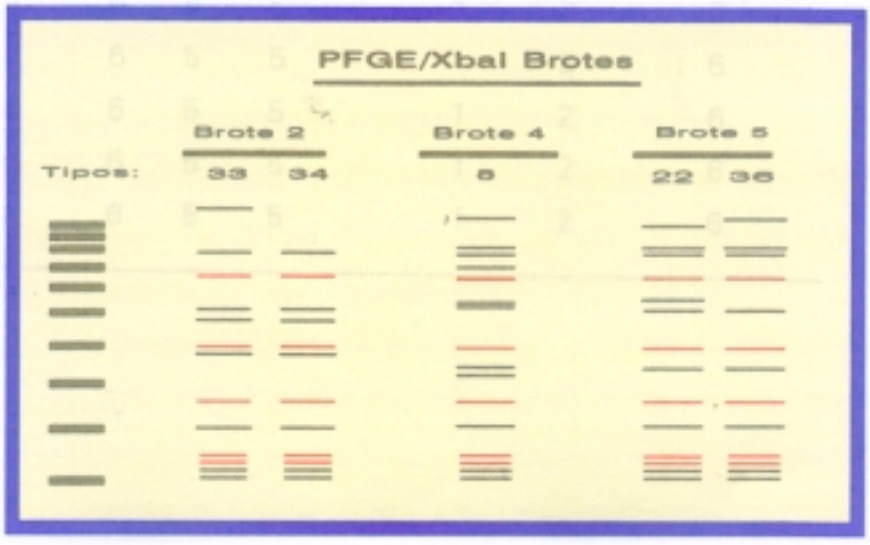


Figura 8. Representación de los tipos electroforéticos en campo pulsado en las cepas de los brotes 2, 4 y 5 digeridas con la enzima *Xba*I. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular de concatémeros de λ ADN desde 48,5 Kpb (monómero) hasta más de 1000 Kpb (20-mero).



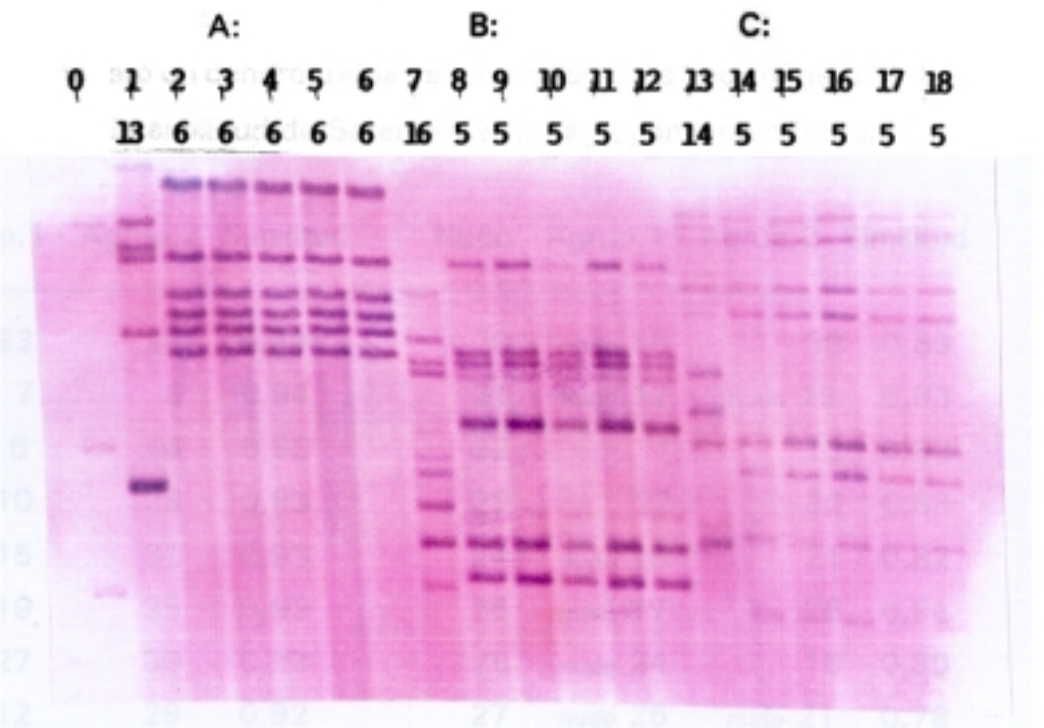
IV. CEPAS MULTIRRESISTENTES.

Se tipificaron las 8 cepas multirresistentes aisladas en España durante los años 1990-91, diferenciándose 3 grupos de cepas (Figuras 3, 4, 5 y 6):

- Las cepas MR1 y MR2 que pertenecían al mismo fagotipo M1, resultaron también idénticas por el resto de los marcadores.
- Las cepas MR4 a MR8 del fagotipo E1a, entre las que se encontraban las dos cepas del enfermo que había adquirido la enfermedad en la India, eran iguales entre sí para cada uno de los métodos utilizados.
- La cepa MR3 así mismo del fagotipo E1a, pero que fue diferente de las del grupo anterior (Foto 12).

Nºcepa	Fagot.	Ribotipos			Tipo-IS200		Tipo-PFGE
		*Hind*III	*Pst*I	*Cla*I	*Hind*III	*Pst*I	*Xba*I
MR1	M1	2	1	1	1	2	2
MR2	M1	2	1	1	1	2	2
MR3	E1a	13	16	14	1	2	39
MR4	E1a	6	5	5	1	2	6
MR5	E1a	6	5	5	1	2	6
MR6	E1a	6	5	5	1	2	6
MR7	E1a	6	5	5	1	2	6
MR8	E1a	6	5	5	1	2	6

Foto 12. Ribotipos obtenidos con las cepas multirresistentes MR3 a MR8 de *Salmonella*, serotipo Typhi del fagotipo E1a aisladas en España. A: Ribotipos/ *Hind*III (columnas 1 a 6). B: Ribotipos/*Pst*I (columnas 7 a 12). C: Ribotipos/ *Cla*I (columnas 13 a 18). La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.



V. ANALISIS DE LOS DATOS.

El análisis estadístico de la tipificación por electroforesis en campo pulsado con *Xba*I y de la ribotipificación con *Hind*III se llevó a cabo sobre el total de los tipos obtenidos en todos los grupos estudiados (grupo control, muestra aleatoria, brotes epidémicos y cepas multirresistentes).

Los resultados de ribotipificación también se analizaron con los tipos generados en las cepas del grupo control, de los brotes epidémicos y las multirresistentes, digeridos con las enzimas *Pst*I y *Cla*I.

Siguiendo la estrategia utilizada por Woods (1992), se estudiaron en estos mismos grupos los patrones "múltiples" formados para cada cepa por la suma de las bandas, en orden decreciente con respecto a su peso molecular, obtenidas con las 3 enzimas *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I conjuntamente.

No se analizaron los resultados del método de tipificación de los fragmentos de inserción IS200 por el bajo poder de discriminación obtenido con esta técnica.

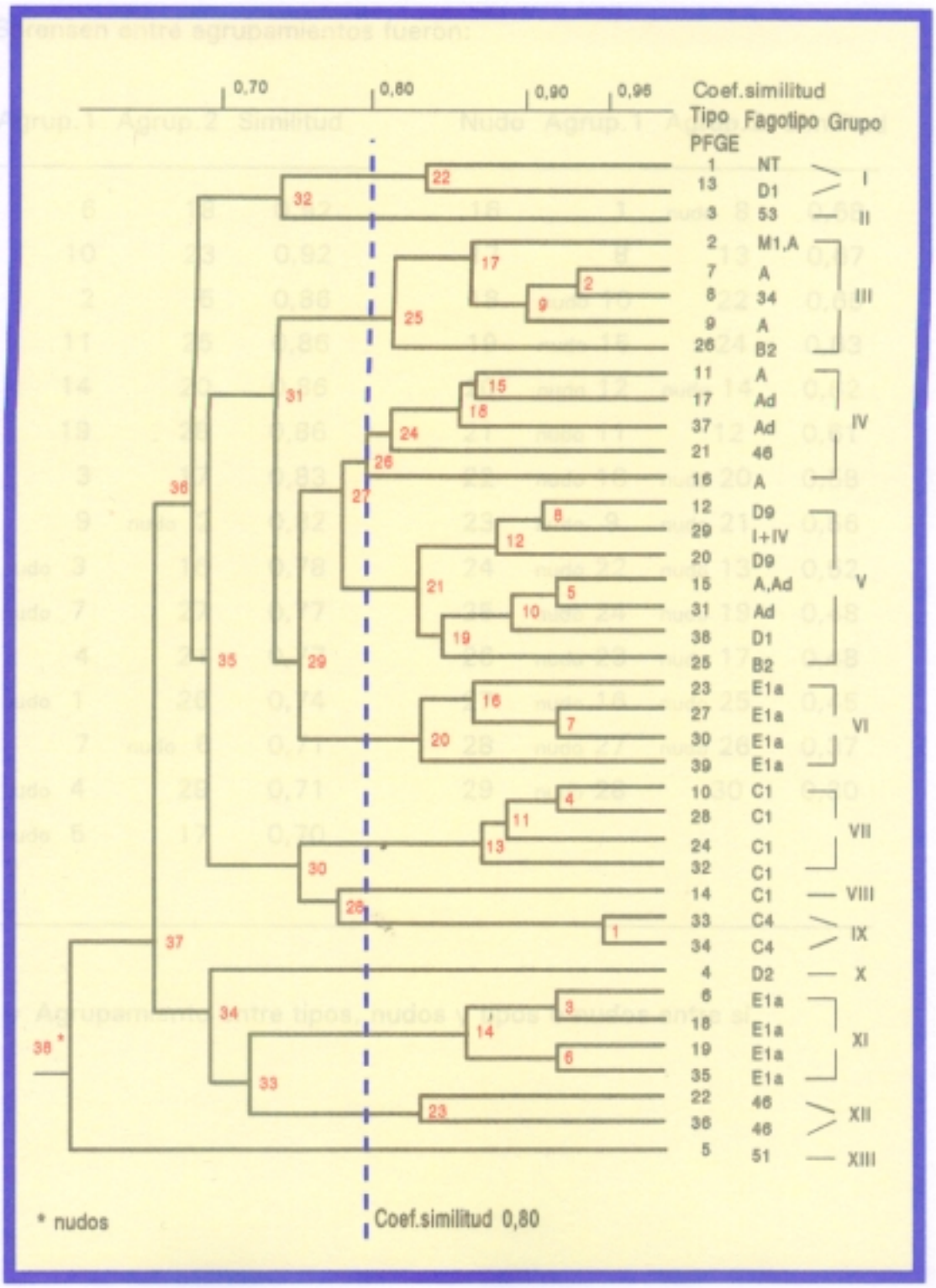
1. Electroforesis en campo pulsado.

Se generó un dendrograma para los diferentes tipos (Figura 9). Los coeficientes de similitud de Sorensen entre agrupamientos fueron:

Nudo	Agrup.1	Agrup.2	Similitud	Nudo	Agrup.1	Agrup.2	Similitud
1	33	34	0,96	20	nudo 16	39	0,83
2	7	8	0,94	21	nudo 12	nudo 19	0,83
3	nudo 6	18	0,93	22	1	13	0,83
4	10	28	0,93	23	22	36	0,83
5	15	31	0,93	24	nudo 18	21	0,82
6	19	35	0,93	25	nudo 17	26	0,81
7	27	30	0,93	26	nudo 24	16	0,80
8	12	29	0,92	27	nudo 26	nudo 21	0,78
9	nudo 2	9	0,90	28	14	nudo 1	0,78
10	nudo 5	38	0,90	29	nudo 27	nudo 20	0,76
11	nudo 4	24	0,89	30	nudo 13	nudo 28	0,75
12	nudo 8	20	0,89	31	nudo 25	nudo 29	0,74
13	nudo 11	32	0,88	32	nudo 22	3	0,74
14	nudo 3	nudo 6	0,87	33	nudo 14	nudo 23	0,72
15	11	17	0,87	34	4	nudo 33	0,69
16	23	nudo 7	0,87	35	nudo 31	nudo 30	0,69
17	2	nudo 9	0,86	36	nudo 32	nudo 35	0,68
18	nudo 15	37	0,86	37	nudo 36	nudo 34	0,66
19	nudo 10	25	0,85	38	nudo 37	5	0,59
							1

Agrup. = Agrupamiento entre tipos, nudos y tipos o nudos entre sí.

Figura 9. Dendrograma obtenido para los tipos PFGE/*Xba*I. Los grupos se definieron entre agrupamientos con un índice de similitud entre ellos igual o superior a 0,80.



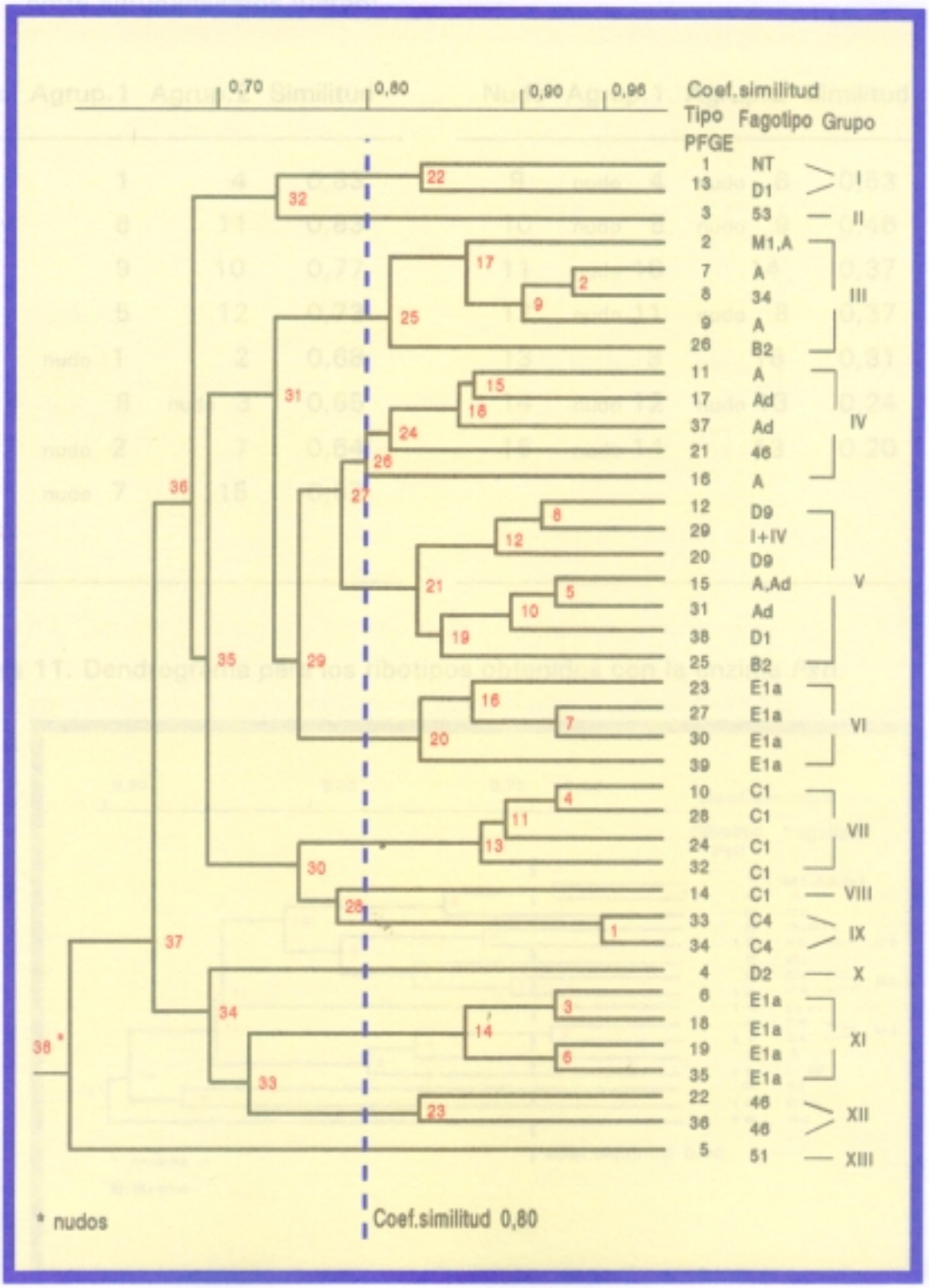
2. Ribotipificación.

Se generó un dendrograma para los diferentes ribotipos obtenidos con la enzima *Hind*III (Figura 10). Los coeficientes de similitud de Sorensen entre agrupamientos fueron:

Nudo	Agrup.1	Agrup.2	Similitud
1	6	18	0,92
2	10	23	0,92
3	2	5	0,86
4	11	25	0,86
5	14	20	0,86
6	19	28	0,86
7	3	17	0,83
8	9	nudo 2	0,82
9	nudo 3	16	0,78
10	nudo 7	27	0,77
11	4	21	0,77
12	nudo 1	26	0,74
13	7	nudo 6	0,71
14	nudo 4	29	0,71
15	nudo 5	17	0,70
16	1	nudo 8	0,68
17	8	13	0,67
18	nudo 10	22	0,65
19	nudo 15	24	0,63
20	nudo 12	nudo 14	0,62
21	nudo 11	12	0,61
22	nudo 18	nudo 20	0,58
23	nudo 9	nudo 21	0,56
24	nudo 22	nudo 13	0,52
25	nudo 24	nudo 19	0,48
26	nudo 23	nudo 17	0,48
27	nudo 16	nudo 25	0,45
28	nudo 27	nudo 26	0,37
29	nudo 28	30	0,30

Agrup. = Agrupamiento entre tipos, nudos y tipos o nudos entre sí.

Figura 10. Dendrograma obtenido para los ribotipos/*Hind*III. No se definieron grupos entre los agrupamientos obtenidos.

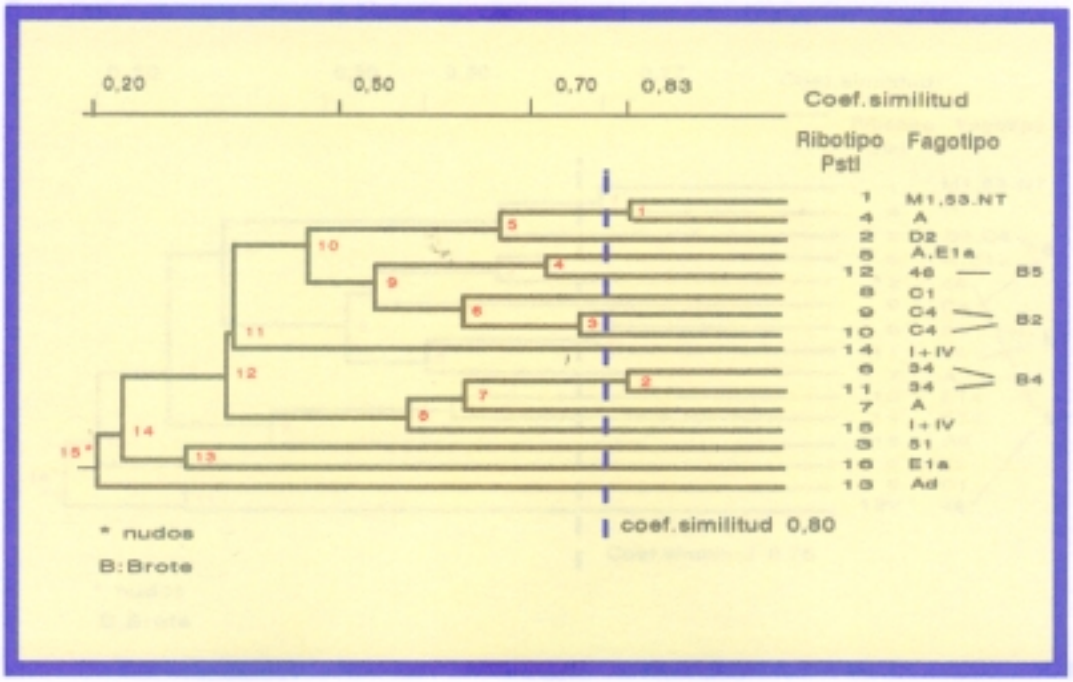


Se generó un dendrograma para los ribotipos obtenidos con la enzima *Pst*I en las cepas del grupo control, implicadas en brotes y multirresistentes (Figura 11). Los coeficientes de similitud de Sorensen entre agrupamientos fueron:

Nudo	Agrup.1	Agrup.2	Similitud
1	1	4	0,83
2	6	11	0,83
3	9	10	0,77
4	5	12	0,73
5	nudo 1	2	0,68
6	8	nudo 3	0,65
7	nudo 2	7	0,64
8	nudo 7	15	0,57

Nudo	Agrup.1	Agrup.2	Similitud
9	nudo 4	nudo 6	0,53
10	nudo 5	nudo 9	0,46
11	nudo 10	14	0,37
12	nudo 11	nudo 8	0,37
13	3	16	0,31
14	nudo 12	nudo 13	0,24
15	nudo 14	13	0,20

Figura 11. Dendrograma para los ribotipos obtenidos con la enzima *Pst*I.

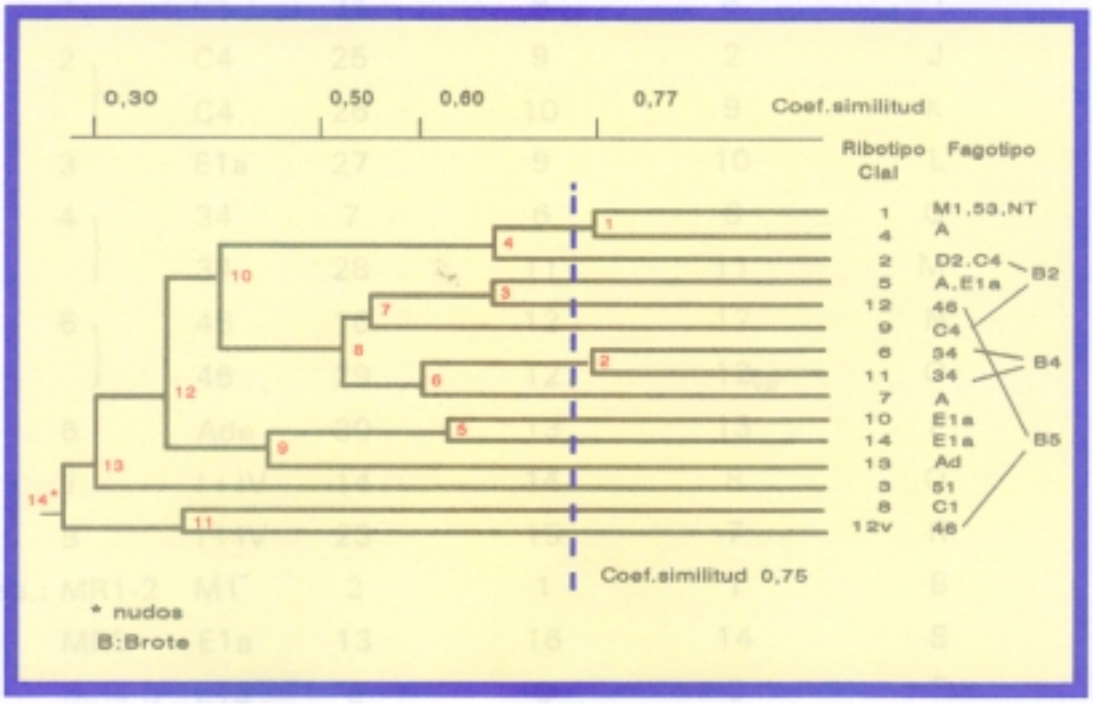


Se generó un dendrograma para los ribotipos obtenidos con la enzima *Cla*I en las cepas del grupo control, implicadas en brotes y multirresistentes (Figura 12). Los coeficientes de similitud de Sorensen entre agrupamientos fueron:

Nudo	Agrup.1	Agrup.2	Similitud
1	1	4	0,77
2	6	11	0,77
3	5	12	0,67
4	nudo 1	2	0,67
5	10	14	0,62
6	nudo 2	7	0,60
7	nudo 3	9	0,54

Nudo	Agrup.1	Agrup.2	Similitud
8	nudo 7	nudo 6	0,51
9	nudo 5	13	0,44
10	nudo 4	nudo 8	0,39
11	8	12v	0,33
12	nudo 10	nudo 9	0,32
13	nudo 12	3	0,30
14	nudo 13	nudo 11	0,27

Figura 12. Dendrograma para los ribotipos obtenidos con la enzima *Cla*I.



Se definieron, en estos mismos grupos de cepas, nuevos ribotipos "múltiples", cuyos patrones representaban al conjunto de bandas procedentes de los ribotipos individuales para *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I.

Cepa		Fagotipo	Ribotipo			
			*Hind*III	*Pst*I	*Cla*I	Múltiple
Control:	1	NT	1	1	1	A
	2	M1	2	1	1	B
	3	53	2	1	1	B
	4	D2	3	2	2	C
	5	51	4	3	3	D
	6	A	5	4	4	E
	7	E1a	6	5	5	F
	8	A	6	5	5	F
	9	34	7	6	6	G
	10	A	7	7	7	H
Brote:	1	C1	24	8	8	I
	2	C4	25	9	2	J
		C4	26	10	9	K
	3	E1a	27	9	10	L
	4	34	7	6	6	G
		34	28	11	11	M
	5	46	16	12	12	N
		46	29	12	12_{var}	O
	6	Ade	30	13	13	P
	7	I+IV	14	14	8	Q
	8	I+IV	23	15	7	R
Multirres.:	MR1-2	M1	2	1	1	B
	MR3	E1a	13	16	14	S
	MR4-8	E1a	6	5	5	F

Se generó un dendrograma para los ribotipos "múltiples" elaborados con el conjunto de bandas obtenido de la suma de los patrones con *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I (Figuras 13 y 14). Los coeficientes de similitud de Sorensen entre agrupamientos fueron:

Nudo	Agrup.1	Agrup.2	Similitud
1	A	B	0,89
2	H	R	0,85
3	F	K	0,83
4	J	L	0,81
5	nudo 1	E	0,80
6	nudo 3	nudo 4	0,78
7	I	Q	0,73
8	nudo 5	C	0,71
9	G	M	0,68
10	N	O	0,63
11	nudo 9	nudo 2	0,61
12	nudo 11	nudo 10	0,57
13	nudo 6	nudo 7	0,55
14	nudo 8	nudo 12	0,52
15	nudo 14	nudo 13	0,47
16	P	S	0,46
17	nudo 15	D	0,45
18	nudo 17	nudo 16	0,37

Figura 13. Dendrograma para los ribotipos "múltiples" compuestos por el conjunto de bandas de bandas *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I.

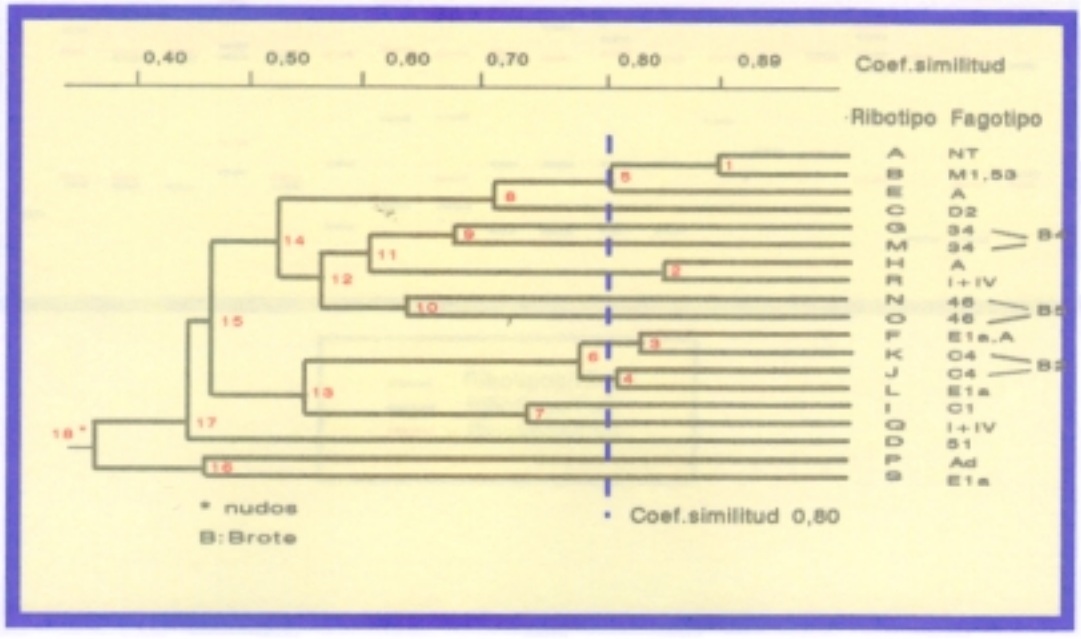
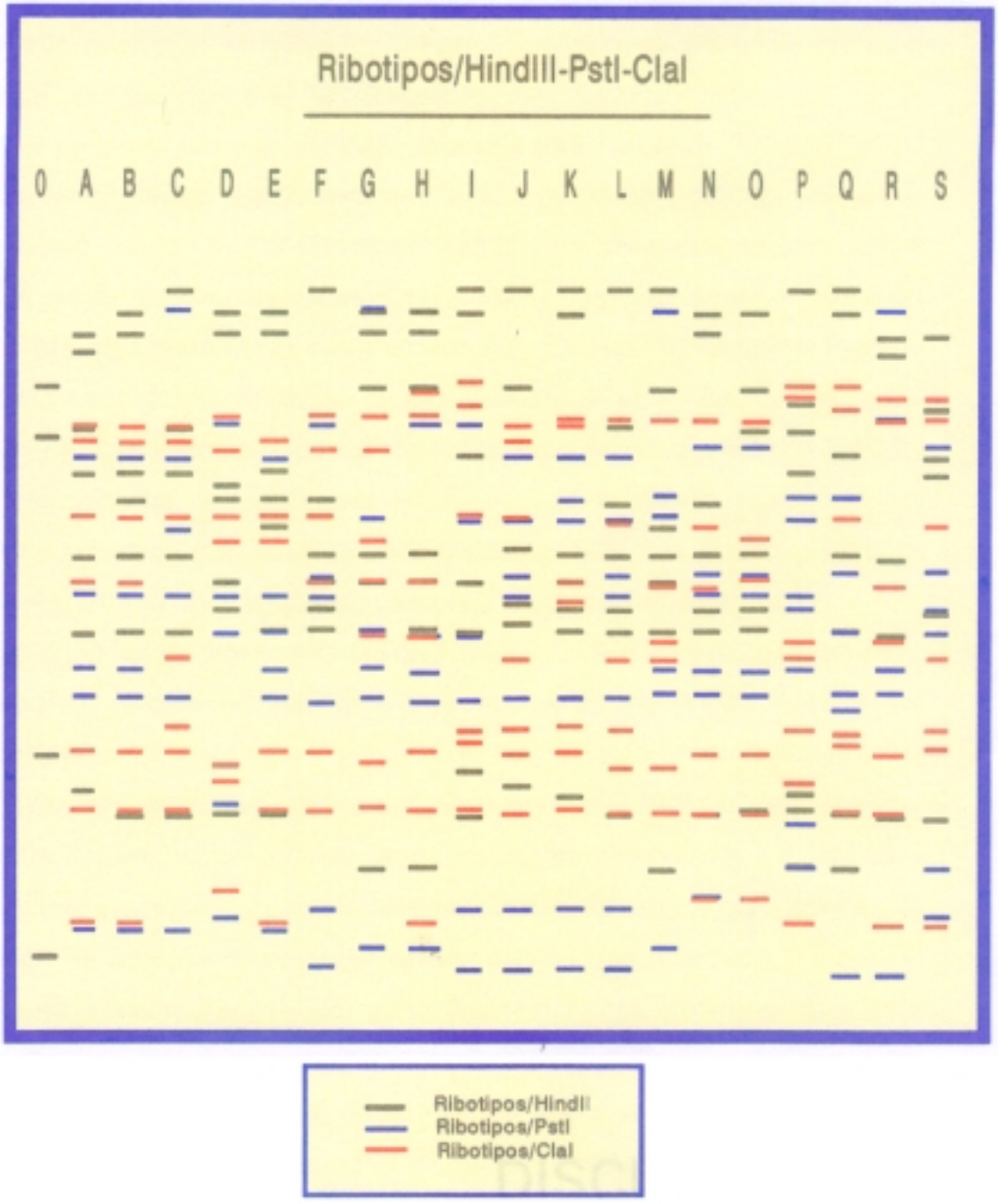


Figura 14. Representación de los ribotipos "múltiples" obtenidos con el conjunto de bandas procedentes de los ribotipos para *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I. La columna 0 corresponde al marcador de peso molecular λ digerido con *Hind*III.



DISCUSION.....

El método más usado en la demostración de asociaciones epidemiológicas entre aislados de *Salmonella*, serotipo Typhi ha sido durante años la fagotipificación (Edelman, 1986). Sin embargo este método tiene ciertas limitaciones, como en el caso de fagotipos muy comunes o cuando en una cepa, por adquisición de un plásmido o fago lisogénico, se producen cambios en su patrón de lisis (Borecka, 1973).

Otras técnicas como la electroforesis en campo pulsado (Thong, 1994), ribotipificación (Altwegg, 1989; Heneine, 1991), hibridación con una sonda del fragmento de inserción IS200 (Threlfall, 1993) y las derivadas de la reacción en cadena de la polimerasa (Versalovic, 1991), se han desarrollado más recientemente para discriminar entre aislados de *Salmonella*, serotipo Typhi.

En este estudio se aplicaron dichas técnicas a una selección de cepas recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* de España "LNRS" procedentes de diferentes años, de casos esporádicos o brotes epidémicos, sensibles a antimicrobianos o multirresistentes y los resultados, cuando fue oportuno, se compararon con la tradicional fagotipificación.

Siguiendo las recomendaciones de Tenover (1995) para la interpretación de los patrones de digestión de ADN, se utilizaron los siguientes términos en esta discusión:

- **Cepas relacionadas epidemiológicamente.** Cepas aisladas de enfermos, ambiente, etc, durante un período discreto de tiempo o de un área bien definida, como parte de una investigación epidemiológica que sugiere que todos los aislamientos pueden derivar de una fuente común.
- **Cepas relacionadas genéticamente (clones).** Cepas "indistinguibles" una de la otra por una variedad de pruebas genéticas o que son tan parecidas, "estrechamente relacionadas", que presumiblemente derivan de una cepa parental común por un único cambio genético. La evidencia de la clonalidad siempre es considerada relativa mientras no existan otras pruebas en contra.
- **Cepas posiblemente relacionadas.** Cepas cuyas diferencias pueden ser debidas a dos cambios genéticos independientes y por consiguiente su

relación epidemiológica es menos evidente que en el caso anterior.

- **Cepas no relacionadas.** Cuando las diferencias genéticas entre las cepas son superiores al 50%, lo que solo podría explicarse por 3 o más cambios genéticos independientes.

I ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO.

Las 25 cepas seleccionadas de forma aleatoria de entre las recibidas en el LNRS durante los años 1990-1995 pertenecientes a 9 fagotipos se dividieron en 22 tipos-PFGE, mostrando un **poder discriminatorio superior al de la fagotipificación** (índices de discriminación de 0,986 y 0,893 respectivamente).

La asociación entre fagotipos y tipos-PFGE aumentó considerablemente la discriminación entre las cepas estudiadas. Solo dos tipos se encontraron en más de una cepa, los tipos 15 y 20. El tipo 20 apareció en 2 cepas pertenecientes al fagotipo D9, que resultaron procedentes de la misma ciudad, habían sido aisladas en el mismo período de tiempo y, muy probablemente, estaban epidemiológicamente relacionadas. El tipo 15 se obtuvo en 3 cepas de los fagotipos A degradado y A sin aparente relación epidemiológica entre ellas.

Cuando se consideraron de forma conjunta todas las cepas estudiadas, éstas se diferenciaron en 39 tipos y el análisis de las relaciones genéticas entre estos produjo **13 grupos** considerando que el coeficiente de similitud "CS" entre dos grupos fuera menor de 0,80 (Nair, 1994). Con este criterio se originaba una buena correlación entre fagotipos y tipos-PFGE entre las cepas de este estudio (Figura 9).

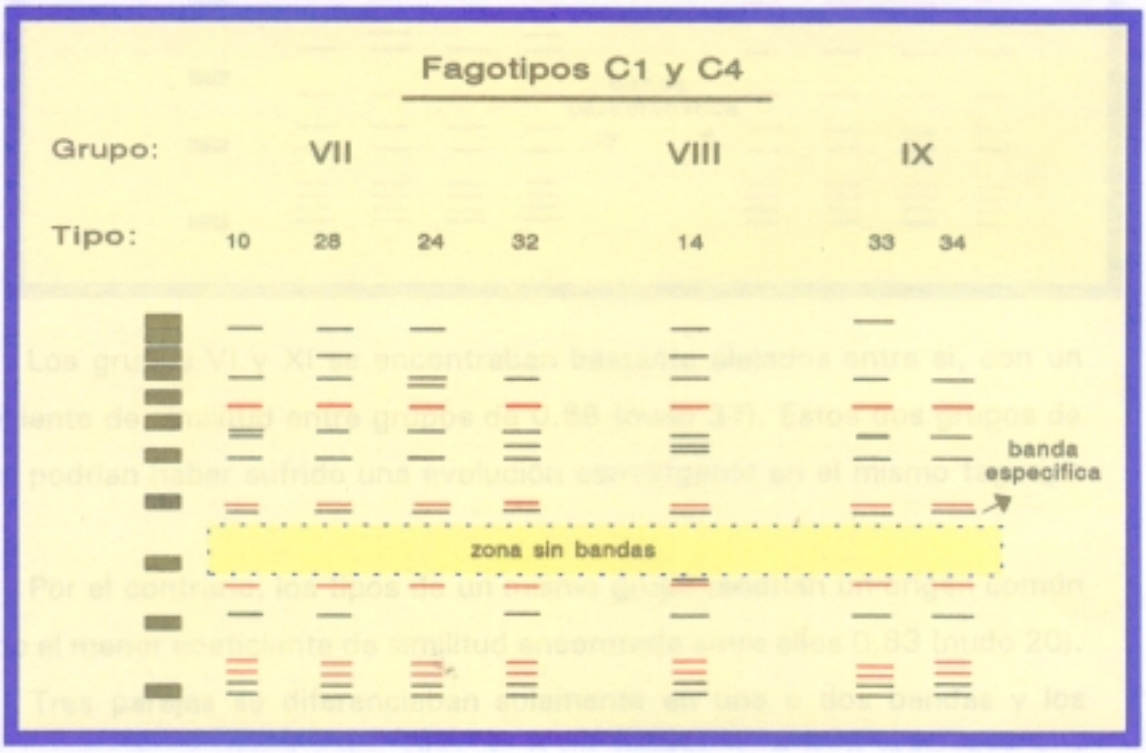
El menor coeficiente de similitud entre tipos fue 0,59, lo que fundamenta la clonalidad de este serotipo, si bien no parece ser tan estrictamente clonal como en el estudio de Selander (1990) que establecía la existencia de dos únicos clones, uno de ellos predominante y de distribución mundial, y un coeficiente de similitud entre ellos superior a 0,80.

El mayor interés del análisis se obtuvo tanto de la división en grupos como de la comparación entre los patrones obtenidos de cepas procedentes de

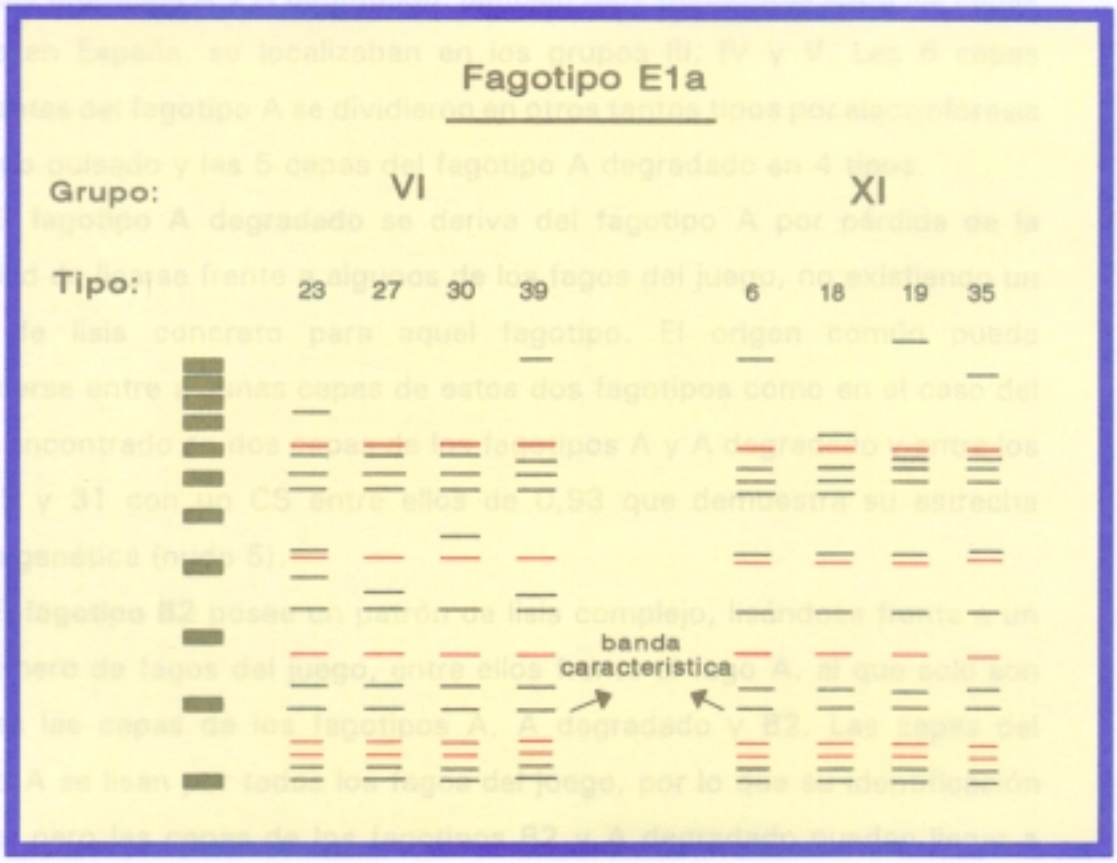
un mismo fagotipo o de fagotipos relacionados, para tratar de establecer las posibles relaciones genéticas y/o epidemiológicas entre ellas.

Así, entre los tipos-PFGE procedentes de algunos fagotipos se observó la presencia y/o ausencia de bandas características como en el caso de los tipos procedentes de los **fagotipos C1 y C4** con ausencia de bandas en la región de 150 Kpb y la presencia de una banda específica de estos fagotipos de algo menos de 200 Kpb.

Los tipos pertenecientes a estos dos fagotipos se localizaban en grupos próximos (grupos VII, VIII y IX), con un CS entre grupos igual o superior a 0,75 (nudo 30), lo que podría indicar un origen común de estos grupos a partir del cual sufrieron una evolución divergente en los fagotipos C1 y C4.



Uno de los fagotipos más frecuentes en España, el **fagotipo E1a**, pudo ser dividido por electroforesis en campo pulsado en 8 tipos y estos en 2 grupos (grupos VI y XI). De las 14-15 bandas analizadas por tipo 11 fueron comunes y una, de un peso molecular aproximado de 100 Kpb, se encontraba solamente entre las cepas de este fagotipo y en una cepa del fagotipo D2 (tipo 4).



Los grupos VI y XI se encontraban bastante alejados entre si, con un coeficiente de similitud entre grupos de 0,66 (nudo 37). Estos dos grupos de cepas podrían haber sufrido una evolución convergente en el mismo fagotipo E1a.

Por el contrario, los tipos de un mismo grupo tendrían un origen común siendo el menor coeficiente de similitud encontrado entre ellos 0,83 (nudo 20).

Tres parejas se diferenciaban solamente en una o dos bandas y los coeficientes de similitud entre ellas de 0,93 (nudos 3, 6 y 7) indicaban que genéticamente podían considerarse "estrechamente relacionados". Sin embargo, en los tres casos se desconocía la relación epidemiológica entre cepas, procedían de diferentes CCAA y fueron aisladas en años diferentes.

La cepa control 7, una de las seleccionadas para la puesta a punto de las técnicas utilizadas en este trabajo, era en realidad la cepa multirresistente MR7, de ahí la coincidencia en los tipos.

Los fagotipos A y A degradado, también muy frecuentes entre las cepas aisladas en España, se localizaban en los grupos III, IV y V. Las 6 cepas procedentes del fagotipo A se dividieron en otros tantos tipos por electroforesis en campo pulsado y las 5 cepas del fagotipo A degradado en 4 tipos.

El fagotipo A degradado se deriva del fagotipo A por pérdida de la capacidad de lisarse frente a algunos de los fagos del juego, no existiendo un patrón de lisis concreto para aquel fagotipo. El origen común puede establecerse entre algunas cepas de estos dos fagotipos como en el caso del tipo 15 encontrado en dos cepas de los fagotipos A y A degradado y entre los tipos 15 y 31 con un CS entre ellos de 0,93 que demuestra su estrecha relación genética (nudo 5).

El fagotipo B2 posee un patrón de lisis complejo, lisándose frente a un gran número de fagos del juego, entre ellos frente al fago A, al que solo son sensibles las cepas de los fagotipos A, A degradado y B2. Las cepas del fagotipo A se lisan por todos los fagos del juego, por lo que su identificación es clara, pero las cepas de los fagotipos B2 y A degradado pueden llegar a confundirse cuando los patrones de lisis no se ajustan claramente al esquema del fagotipo B2 pero son muy próximos.

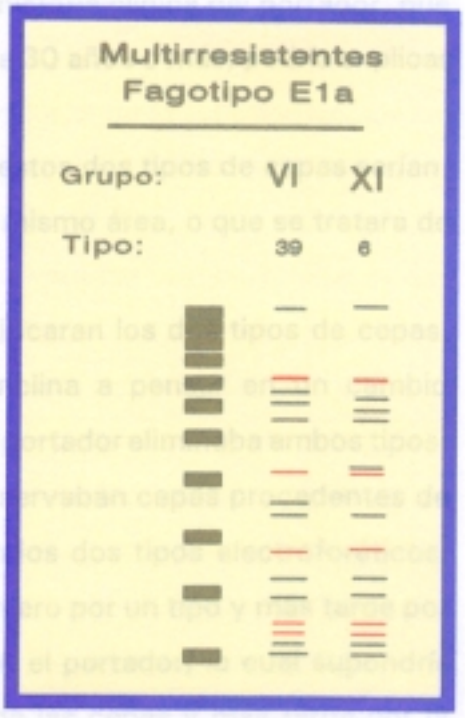
En los grupos III y IV se encontraban incluidos tipos electroforéticos de los fagotipos A, A degradado y B2 y el menor coeficiente de similitud entre tipos fue 0,81 (nudo 25). Esto indicaría un origen común para los tres fagotipos que a partir del fagotipo A, en algunos casos habrían evolucionado hacia el fagotipo B2 y en otros a diferentes variedades de patrones de lisis no reconocidos y englobados actualmente bajo el nombre de fagotipo A degradado.

Las 8 cepas multirresistentes aparecidas en España, pertenecientes a los fagotipos M1 y E1a, se localizaron en los grupos III, VI y XI por electroforesis en campo pulsado con 7 bandas diferentes entre las cepas del fagotipo M1 (tipo 2) y fagotipo E1 (tipos 6 y 39). Ambos grupos podían ser considerados como "no relacionados".

Las dos cepas del fagotipo M1, tipificado por primera vez en España, que habían sido aisladas de dos enfermos del mismo pueblo, pertenecían al mismo

tipo-PFGE 2, lo que confirmaba la sospecha de su origen común.

Se consideró la posible relación entre la cepa MR3 (tipo 39) y el grupo de cepas MR4-MR8 (tipo 6) que, aún perteneciendo al mismo fagotipo E1a presentaban diferencias de sensibilidad frente a dos antimicrobianos.



El coeficiente de similitud entre los grupos VI y XI, donde se localizaban los tipos 39 y 6 respectivamente, fue 0,66 (nudo 37) y se encontraron 6 diferencias entre ambos patrones de bandas, lo que solo podría ser explicado por dos cambios genéticos independientes. La relación epidemiológica entre ambos grupos sería solo "posible".

Por lo tanto, los determinantes de resistencia en estos 3 grupos de cepas multirresistentes, o bien habrían sido adquiridos independientemente por cada una de las líneas filogenéticas o bien una de ellas se los habría transferido a las otras posteriormente a su separación evolutiva.

Por último en el estudio de los **brotes epidémicos** se observa que en la mayoría de ellos, todas las cepas procedentes de un mismo brote eran "indistinguibles", y su relación epidemiológica quedaba claramente establecida.

Sin embargo, el **brote 2** presentaba 2 tipos ligeramente distintos (tipos 33 y 34), pues se diferenciaban en una única banda, lo que podía ser explicado como un cambio genético puntual, habiéndose descrito anteriormente cambios de este tipo en el caso de brotes (Thong, 1994). La relación epidemiológica existente entre las cepas y el CS de 0,96 (nudo 1) nos llevó a considerar estas cepas como "estrechamente relacionadas".

De igual manera se obtuvieron 2 tipos entre las cepas del **brote 5**. Ambos

patrones se diferenciaban en 2 bandas (CS 0,83) lo que, como en el caso anterior, podía deberse a un cambio genético puntual. La duración de este brote, que transcurrió a lo largo de 6 años y la historia clínica del portador, que sugiere la posibilidad de que lo fuera desde hacía 30 años o más, podría explicar un cambio genético de este tipo.

Otras explicaciones para la aparición de estos dos tipos de cepas serían, o la declaración simultánea de dos brotes en el mismo área, o que se tratara de un brote mixto producido por dos cepas.

El hecho de que en el portador se identificaran los dos tipos de cepas, con un alto grado de similitud entre ellos, inclina a pensar en un cambio genético puntual como consecuencia del cual el portador eliminaba ambos tipos.

De uno de los enfermos, del que se conservaban cepas procedentes de más de un aislamiento, también se obtuvieron los dos tipos electroforéticos. Esto indicaba que o bien el brote se produjo primero por un tipo y más tarde por el otro (una vez ocurrido el cambio genético en el portador) lo cual supondría una reinfección del enfermo primero por una de las cepas y más tarde por la otra o se trataba de un brote mixto.

La distribución en el tiempo de los dos tipos de cepas no apoya la hipótesis de la reinfección, ya que ambos tipos han sido identificados a lo largo de los 6 años, siendo lo más probable que se tratara de un brote mixto y que el portador excretara simultáneamente los dos tipos de cepas.

En los otros casos se obtuvieron patrones de uno solo de los tipos por enfermo, posiblemente debido a la práctica general de los laboratorios de realizar el reaislamiento para subcultivos a partir de una única colonia; ésta, obviamente, pertenecería solo a uno de los tipos.

Por todo lo anterior, la explicación más probable en este caso sería la de una única cepa en origen que, por el largo período de tiempo que se mantuvo en el portador, sufrió un cambio genético puntual y en el momento en que se detecta el brote, este está producido por dos cepas "estrechamente relacionadas".

II RIBOTIPIFICACION.

El **poder discriminatorio** de la técnica de ribotipificación con la enzima *Hind*III fue **0,956** también muy elevado y, como ya ha sido descrito por otros autores (Altwegg, 1989; Nastasi, 1991), superior al de la fagotipificación.

Los 30 ribotipos obtenidos con todas las cepas estudiadas se relacionaron según el Coeficiente de Similitud de Sorensen o Dice y se dividieron en 22 grupos con el mismo criterio expuesto anteriormente de que el CS entre dos grupos fuera inferior a 0,80.

Al igual que con la electroforesis en campo pulsado, la asociación de ribotipos y fagotipos aumentó la discriminación entre las cepas. Los **fagotipos E1a, C1, A y A degradado**, tan frecuentes entre las cepas españolas, se subdividían en ribotipos diferentes y viceversa, un mismo ribotipo era identificado en cepas de varios fagotipos.

En el caso de las dos cepas del **fagotipo D9**, que pertenecían al mismo tipo por electroforesis en campo pulsado, también hubo coincidencia entre fagotipificación y ribotipificación, ambas cepas eran indistinguibles por los 3 marcadores analizados. Esto corroboraba el supuesto anterior de que, aunque no se tenía constancia de ello, estas dos cepas estaban "epidemiológicamente relacionadas".

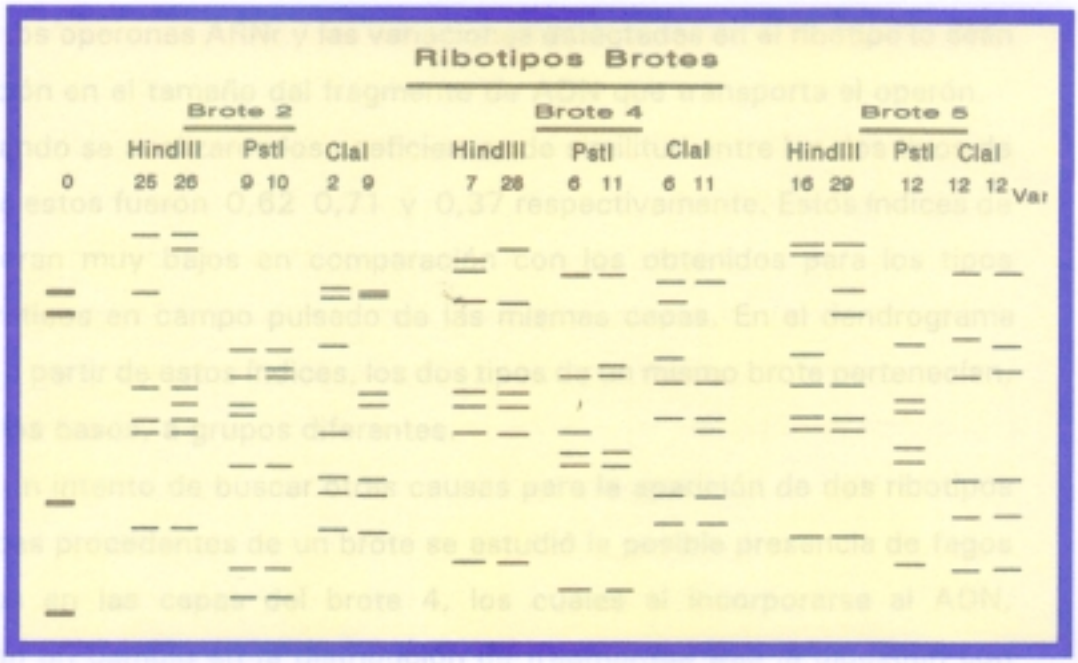
Otras dos cepas coincidían en fagotipo (E1a) y ribotipo (6 para *Hind*III), lo que podría hacernos pensar que estaban relacionadas, sin embargo eran muy diferentes por electroforesis en campo pulsado (tipos 6 y 19) lo cual no permitía sacar conclusiones de la relación epidemiológica entre ellas a pesar de que se aislaron en el mismo año.

Cuando se estudiaron las **cepas multirresistentes** se confirmaron los mismos grupos que por electroforesis en campo pulsado. Las 2 cepas del fagotipo M1 pertenecían al mismo ribotipo 2 para *Hind*III y entre las del fagotipo E1a la cepa MR3 fue claramente diferente del grupo de cepas MR4-MR8 , haciéndose patente la existencia de 3 grupos distintos de cepas multirresistentes.

Como consecuencia de estos resultados tan esperanzadores en la diferenciación de cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi se estudiaron los ribotipos de 86 cepas procedentes de **8 brotes epidémicos**. En 5 de ellos todas las cepas pertenecientes a un mismo brote eran "indistinguibles" por ribotipificación y la relación genética corroboraba la relación epidemiológica entre ellas.

Sin embargo, en los brotes 2, 4 y 5 se identificaron 2 ribotipos distintos por brote. En los brotes 2 y 5 ya se habían descrito variaciones entre cepas por electroforesis en campo pulsado, existiendo una correlación entre los resultados de ambas técnicas.

Cambios de este tipo han sido descritos previamente por otros autores en otras especies (Woods, 1992) y en *Salmonella*, serotipo Typhi (Nastasi, 1991). La diferencia de ribotipo, fue reproducible, estable y en nuestro caso, se detectaba con las 3 enzimas utilizadas *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I en los brotes 2 y 4 mientras que en el brote 5 solo se obtenían dos ribotipos claramente diferentes con la enzima *Hind*III.



La modificación del ribotipo podía deberse a un cambio genético en alguno de los operones ARNr, los cuales se encuentran en el genoma en múltiples copias (Davies, 1972; Jinks-Robertson, 1987). Esta presencia múltiple, entre otras funciones, aseguraría la viabilidad de la bacteria en el caso de un cambio genético en uno o más de dichos operones. Por lo tanto parecería que una mutación de este tipo podría resultar completamente recesiva para la bacteria, no ocasionando obligatoriamente cambios en el fenotipo. Woods (1992) propone como una de las posibles explicaciones para la aparición de dos ribotipos diferentes, en dos aislados de *Neisseria meningitidis* procedentes de un mismo enfermo, la existencia de inversiones entre los operones *rrn*D y *rrn*E. Inversiones de este tipo han sido demostradas en *E.coli* (Hill, 1981).

Aunque la frecuencia de este u otro tipo de modificaciones genéticas y su significación fisiológica es desconocida, parece poco probable que pueda ser tan frecuente como en el presente estudio, pues se detectó en 3 de los 8 brotes estudiados lo que estaría en contradicción con la supuesta estabilidad de los operones ARNr.

Probablemente el cambio genético aconteció en algún punto del ADN externo a los operones ARNr y las variaciones detectadas en el ribotipo lo sean por variación en el tamaño del fragmento de ADN que transporta el operón.

Cuando se analizaron los coeficientes de similitud entre los dos tipos de cada brote estos fueron 0,62 0,71 y 0,37 respectivamente. Estos índices de similitud eran muy bajos en comparación con los obtenidos para los tipos electroforéticos en campo pulsado de las mismas cepas. En el dendrograma generado a partir de estos índices, los dos tipos de un mismo brote pertenecían, en todos los casos, a grupos diferentes.

En un intento de buscar otras causas para la aparición de dos ribotipos en las cepas procedentes de un brote se estudió la posible presencia de fagos lisogénicos en las cepas del brote 4, los cuales al incorporarse al ADN, producirían un cambio en la distribución de fragmentos tras la digestión con endonucleasas. No se detectó la presencia de fagos lisogénicos.

La suposición de que la adquisición de algún gen de resistencia a

antimicrobianos podía originar una redistribución de fragmentos de ADN tras la digestión con endonucleasas y por tanto conducir a un ribotipo diferente al de la cepa sensible nos llevó a determinar la sensibilidad frente un panel de antimicrobianos en ambos tipos de cepas. Los 2 tipos resultaron sensibles a los 18 antimicrobianos examinados, si bien la determinación de la concentración mínima inhibitoria "CMI" en cada uno de ellos podría haber ofrecido más información que la obtenida por el método utilizado de difusión en disco.

En el estudio del brote 5 se encontraron cepas de los dos ribotipos en el portador y en uno de los enfermos, mientras que, como solo se disponía de una cepa por enfermo en la mayoría de los otros casos, esta obviamente pertenecía a uno u otro de los dos tipos. Un CS de 0,37 entre ambos ribotipos y 4 diferencias entre los patrones de bandas nos haría pensar en cepas "no relacionadas", sin embargo la relación epidemiológica entre las cepas de este brote, fuera cual fuese su ribotipo, estaba bien acreditada (Xercavins, 1966).

También en uno de los enfermos del brote 4, del que se disponía de 2 cepas, se identificaron los dos ribotipos asociados al brote coexistiendo en el tiempo. El coeficiente de similitud entre ambos tipos fue 0,71 y al igual que en el caso anterior se identificaron 4 diferencias entre los patrones de bandas.

En conclusión, la aparición de ribotipos diferentes en el transcurso de un brote epidémico puede no deberse a la adquisición de fagos lisogénicos o genes de resistencia por parte de la bacteria sino que más probablemente se debe a un cambio genético de otro tipo, que no necesariamente tiene que producirse en el interior del operón ARNr y que probablemente se ve favorecido por la existencia de portadores en *Salmonella*, serotipo Typhi que lo son durante largos períodos de tiempo, incluso varios años. Esta situación ocasionaría la aparición de brotes mixtos aunque por cepas genéticamente relacionadas que derivarían de una misma cepa parental.

Por otra parte y debido a que en esta técnica se analizan un pequeño número de bandas, los coeficientes de similitud de Sorensen pueden verse muy alterados, pudiendo llegar a ser muy bajos, cuando se producen variaciones como las descritas aquí entre las cepas procedentes de un brote epidémico, y

aparecer como "no relacionadas" y situadas en grupos muy distantes en el dendrograma generado a partir de estos coeficientes cepas que pueden tener un origen común.

Se analizó la influencia sobre el coeficiente de similitud de los ribotipos obtenidos con *Pst*I y *Cla*I, en aquellas cepas en las que se disponía de ellos, y siguiendo el procedimiento de Woods (1992) se elaboraron y estudiaron nuevos ribotipos "múltiples" compuestos por la suma de las bandas generadas con *Hind*III, *Pst*I y *Cla*I.

Con la enzima *Pst*I los coeficientes de similitud entre los 2 tipos de cada uno de los 3 brotes mixtos fueron claramente superiores a los obtenidos con *Hind*III. Los 2 ribotipos de un mismo brote presentaban en todos los casos un CS superior a 0,75 e incluso en el caso del brote 2 todas las cepas estudiadas pertenecían al mismo ribotipo (ribotipo 12 para *Pst*I).

Sin embargo, con la enzima *Cla*I los resultados del análisis de ribotipos entre las cepas de los brotes mixtos fueron aun peores que los obtenidos con *Hind*III, excepto en el caso de los dos tipos del brote 4 en el que los resultados con ambas enzimas fueron similares.

Brote	Rib/*Hind*III	CS	Rib/*Pst*I	CS	Rib/*Cla*I	CS	Rib/Múltiple	CS
2	25 / 26	0,62	9 / 10	0,77	2 / 9	0,39	K / J	0,78
4	7 / 28	0,71	6 / 11	0,83	6 / 11	0,77	G / M	0,68
5	16 / 29	0,37	12 / 12	1	12 / 12v	0,27	N / O	0,63

Finalmente, el coeficiente de similitud obtenido entre los 2 ribotipos "múltiples" de cada uno de los brotes mixtos, fue superior al obtenido con *Hind*III en el brote 2, similar en el brote 4 y claramente mejor en el brote 5.

Por lo tanto, un análisis cuidadoso de los resultados de la ribotipificación cuando se estudia un brote epidémico producido por *Salmonella*, serotipo Typhi permitirá establecer relaciones entre cepas siempre que sus ribotipos sean "indistinguibles" pero nos debe hacer sospechar que "algunas diferencias" en los patrones de bandas pueden ser debidas a cambios genéticos puntuales y no a que nos encontremos ante cepas "no relacionadas".

Estas diferencias podrán evaluarse mejor si se estudian los ribotipos generados con *Pst*I, aunque el poder discriminatorio sea menor que con *Hind*III, o si se realiza el estudio de ribotipos "múltiples" generados por los patrones de bandas obtenidos con más de una enzima.

Sin embargo en el estudio de casos esporádicos, cuando no se conozca una relación epidemiológica previa, y donde el estudio de ribotipos "múltiples" complicaría y encarecería mucho la técnica, parece difícil que se pueda encontrar con la ribotipificación una posible asociación genética o "clonalidad" entre cepas, lo que es de gran importancia en la detección de brotes y debe de ser una de las características de un buen marcador epidemiológico.

III TIPIFICACION POR SECUENCIAS DE INSERCION IS200.

Esta técnica que ha sido utilizada con éxito en algunos serotipos de *Salmonella*, tanto en la discriminación primaria del serotipo como en la subtipificación de fagotipos mayoritarios (Baquar, 1994), resulta poco discriminatoria entre las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi , si bien se ha utilizado en la diferenciación de cepas sensibles y resistentes de este serotipo (Threlfall, 1993).

Entre las cepas españolas del estudio, la tipificación por secuencias de inserción IS200 originó un número muy pequeño de tipos diferentes (índice de discriminación de Simpson de 0,157) e incluso no fue capaz de diferenciar entre las cepas sensibles, mayoritariamente del tipo 1 para *Hind*III y las multirresistentes, que también pertenecían al tipo 1.

Estos resultados invalidan este método de tipificación para su utilización como marcador epidemiológico complementario en este serotipo, ya que por otra parte es costoso y consume gran cantidad de tiempo a pesar de la modificación propuesta de transferencia doble de Southern, que permite obtener dos membranas a partir de un único gel para su utilización en ribotipificación y tipificación por IS200.

IV TIPIFICACION BASADA EN LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La gran cantidad de aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa "PCR" aparecidas en los últimos años y entre ellas las encaminadas a su utilización como método de tipificación llevaron a la aplicación de esta técnica en las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi objeto de este estudio.

Desafortunadamente, ninguna de las posibles estrategias de tipificación por PCR resultó discriminatoria entre las cepas control. Este grupo de cepas, que se habían elegido por su variedad en cuanto a origen, año de aislamiento, fagotipo, área geográfica, etc y que habían sido tan heterogéneas con los métodos de tipificación anteriores, resultaron "indistinguibles" cuando se amplificaron diferentes fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR.

Las técnicas REP-PCR y ERIC-PCR, basadas en la presencia de secuencias repetitivas en el cromosoma de una gran variedad de microorganismos, han sido utilizadas con éxito como marcadores epidemiológicos en diversas especies (Woods, 1992; Georghiou, 1995). Sin embargo, la discriminación entre las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi fue nula, todas las cepas control presentaron el mismo patrón de bandas en el caso de REP-PCR y una única banda con ERIC-PCR. La aplicación de esta técnica quizás pueda utilizarse en la diferenciación de serotipos dentro de *Salmonella* (Versalovic, 1991) pero parece incapaz de diferenciar entre aislados del serotipo Typhi.

Basándonos en el mismo principio de la técnica anterior, se pensó en la posibilidad de amplificar los fragmentos de ADN existentes entre dos

secuencias IS200 consecutivas **IS200-PCR**, secuencias que se encuentran en un número relativamente alto entre las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi (de 19 a 20 bandas por cepa, hibridaban con una sonda específica de dicha secuencia).

La técnica **IS200-PCR** originó en 9 de las 10 cepas estudiadas un único fragmento de ~ 3000 pb. El análisis de restricción de este fragmento con las 4 enzimas utilizadas originó a su vez patrones de bandas iguales en las 9 cepas estudiadas.

Aunque está descrito que se puede amplificar un fragmento de ADN de hasta 10^4 pb con *Taq* ADN polimerasa (Jeffreys, 1988), en la practica no se suelen amplificar fragmentos de más de 4000 pb. Esta limitación de la técnica impediría la amplificación de secuencias entre dos IS200 que se encontraran a más distancia de 4000 pb o en el mejor de los casos de 10^4 pb.

De acuerdo con nuestros resultados en las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi solo 2 secuencias IS200 se encontraron a una distancia susceptible de originar un fragmento de amplificación por PCR, fragmento que tras el análisis de restricción resultó ser homogéneo.

Recientemente se han descrito nuevas polimerasas (Ponce, 1992; Wayne, 1994) capaces de amplificar fragmentos de ADN desde 5 Kpb hasta más de 40 Kpb, que aumentarían las posibilidades de amplificación en los casos anteriores y por tanto las posibilidades de discriminación de la técnica, directa o posteriormente a la digestión con endonucleasas de los fragmentos amplificados.

Se estudió la aplicación de PCR basada en el análisis de los fragmentos obtenidos tras la amplificación, en el operón ARNr, de la región intergénica 16S-23S. Esta técnica denominada **PCR-ribotipificación** había detectado cambios en dicha región capaces de diferenciar entre aislados de una misma especie tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Kostman, 1995). En nuestro estudio, la amplificación de esta región dio como resultado la obtención de un mismo patrón de 2 bandas de idéntico tamaño en las 10 cepas control.

En cada uno de los operones ARNr de *Escherichia coli* se ha descrito el espacio entre las regiones que codifican para 16S y 23S ARNr. Dicha región contiene los genes para, o bien el $ARNt^{Glu2}$ o bien los $ARNt^{Ile1}$ y $ARNt^{Ala1B}$ (Brosius, 1981; Harvey, 1988). Suponiendo una estructura similar en el caso de *Salmonella*, serotipo Typhi, las dos bandas obtenidas a partir de las 10 cepas control corresponderían a los dos tipos de regiones intergénicas 16S-23S descritas, sin que se detecte heterogeneidad entre ellas.

Finalmente se utilizó la estrategia de amplificación al azar usando iniciadores arbitrarios AP-PCR. La reacción se llevó a cabo a bajas temperaturas de apareamiento y concentraciones de Mg^{++} superiores a las habituales para facilitar unos requerimientos de complementariedad no muy exigentes entre iniciadores y ADN molde. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente para la tipificación intra especies (Gomez-Lus, 1993; Struelens, 1993).

En nuestro estudio, ninguno de los 7 iniciadores seleccionados fueron capaces de discriminar entre las cepas control. Esta técnica de tipificación se basa en la utilización de un iniciador de secuencia arbitraria que sea "casualmente" capaz de aparearse con las dos cadenas de ADN de una zona del cromosoma que sea "casualmente" heterogénea y de esta forma se produzca la amplificación de fragmentos de distinto tamaño, bien directa o posteriormente a su digestión con endonucleasas.

El hallazgo de uno de estos iniciadores no siempre se consigue, como ocurrió en este estudio por lo que sería necesario seguir diseñando y probando secuencias de iniciación nuevas, con dianas en otros puntos del cromosoma, junto con la utilización de las nuevas polimerasas que al amplificar segmentos mayores aumentarían las posibilidades de la técnica.

CONCLUSIONES.....

1. La **electroforesis en campo pulsado** de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *Xba*I en cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi, fue un excelente marcador epidemiológico en el estudio de las cepas de este serotipo procedentes de casos esporádicos, con un alto poder de discriminación.
2. La elevada frecuencia con que el enfermo de fiebre tifoidea se convierte en portador, estado en el que suele permanecer durante un largo período de tiempo, parece que favorece la aparición de variaciones genéticas puntuales que pudieron ser detectadas por electroforesis en campo pulsado cuando se estudiaron **brotes epidémicos**; si bien estas variaciones no se diferenciaron en ningún caso en más de 2 bandas y las cepas pudieron ser consideradas como "genéticamente relacionadas".
3. El poder discriminatorio de la **ribotipificación** en cepas procedentes de casos esporádicos, de *Salmonella*, serotipo Typhi digeridas con la enzima *Hind*III, también fue muy elevado. Sin embargo, las variaciones observadas entre las cepas de algunos brotes epidémicos fueron superiores a las identificadas por electroforesis en campo pulsado. Los patrones de cepas "epidemiológicamente relacionadas" se diferenciaron en más de 3 bandas y los coeficientes de similitud fueron inferiores en algunos casos a 0,50 por lo que esta técnica resultaba poco eficaz en la detección de brotes producidos por *Salmonella*, serotipo Typhi.
4. Los coeficientes de similitud entre tipos de un mismo brote epidémico, aumentaron cuando se evaluaron los ribotipos obtenidos con la enzima *Pst*I y los ribotipos "múltiples" obtenidos por la conjunción de bandas procedentes de la ribotipificación de una cepa con diferentes enzimas de restricción.
5. Las **cepas multirresistentes** del fagotipo E1a, aparecidas en España en el año 1991, no procedían de una misma cepa parental. Tras el análisis de los tipos obtenidos por electroforesis en campo pulsado y ribotipificación se separaron en 2 grupos o "clones" distintos.

6. La tipificación de las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi por las secuencias de inserción IS200 originó una escasa discriminación entre los aislados de este serotipo. Un tipo fue mayoritario entre las cepas procedentes de casos esporádicos y de brotes, tanto si eran sensibles o multirresistentes, por lo que no se recomienda su utilización como marcador epidemiológico en este serotipo.
7. No se obtuvo discriminación entre aislados de *Salmonella*, serotipo Typhi con ninguna de las aplicaciones utilizadas de la reacción en cadena de la polimerasa. Todas las cepas estudiadas fueron homogéneas para cada una de las estrategias de amplificación: REP-PCR, ERIC-PCR, IS200-PCR, PCR-ribotipificación y AP-PCR. Sin embargo, deberían considerarse futuras posibilidades de AP-PCR con la utilización de nuevos iniciadores o de nuevas polimerasas que permiten la amplificación de fragmentos mayores de ADN y la generación de patrones más estables.
8. Del análisis de los tipos electroforéticos en campo pulsado con la enzima *Xba*I en las cepas de este estudio se deduce que la población de cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi aisladas en España es básicamente "clonal" aunque no tan estrictamente clonal como se había establecido anteriormente para cepas de otros países. El menor coeficiente de similitud entre tipos fue 0,59 y este sería mayor si no se hubieran incluido los tipos procedentes de cepas importadas como es el caso de los tipos 1, 2, 4, 5 y 6.
9. Del examen de los grupos definidos por electroforesis en campo pulsado puede pensarse que algunos de ellos habrían sufrido una evolución convergente en el mismo fagotipo como en el fagotipo E1a, mientras que en la mayoría de los casos un grupo electroforético habría evolucionado divergiendo en varios fagotipos como ocurre con los fagotipos A, A degradado y B2.
10. Finalmente, la mejor estrategia en el estudio epidemiológico de las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi, sería:

- La utilización como marcador epidemiológico de elección de la fagotipificación con el juego de fagos internacional, universalmente reconocido, que posee un buen poder de discriminación, es rápida y de bajo costo. Si embargo, el juego de fagos sólo está disponible para los laboratorios de referencia y requiere un entrenamiento específico para la interpretación correcta de los resultados.

- La técnica de electroforesis en campo pulsado tras la digestión de las cepas con la enzima *Xba*I, sería el marcador epidemiológico complementario de la fagotipificación en el caso de los laboratorios de referencia y el marcador epidemiológico de elección en los laboratorios de microbiología. Esta técnica necesita de un equipo específico, es costosa, consume gran cantidad de tiempo y los resultados obtenidos deben de ser cuidadosamente evaluados cuando se estudian brotes epidémicos o en la detección de estos. Sin embargo, está disponible para todos los laboratorios y puede aplicarse con ligeras variaciones a una gran cantidad de microorganismos.

- Aplicar la técnica de ribotipificación en el estudio de las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi únicamente si no se dispone de otro marcador epidemiológico para este serotipo y, en este caso, estudiar los ribotipos obtenidos con la enzima *Pst*I o los ribotipos "múltiples" elaborados por la conjunción de los patrones de bandas obtenidos con más de una enzima.

- No se debe utilizar las técnicas de tipificación por secuencias de inserción IS200 con las enzimas *Hind*III o *Pst*I ni las diversas aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa descritas en este trabajo ya que no tuvieron ninguna utilidad en la discriminación de las cepas de *Salmonella*, serotipo Typhi.

BIBLIOGRAFIA.....

Altwegg, M., Hickman-Brenner, F.W., Farmer III, J.J. (1989). Ribosomal RNA gene restrict ion patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. J Infect Dis 160:145-149.

Annad, A.C., Kataria, V.K., Singh, W., Chatterjee, S.K. (1990). Epidemic multireistant typhoid fever in eastern India. Lancet 335:352.

Anderson, E.S., Smith, H.R. (1972). Chloramphenicol resistance in the typhoid bacillus. Brit Med J 3:329-331.

Ashcroft, M.T., Morrison-Ritchie, J., Nicholson, C.C. (1964). Controlled field trial in British Guyana school-clindren of heat-killed-phenolized and acetone-killed lyophilized typhoid vaccines. Am J Hyg 79:196-206.

Asperilla, M.O., Smego, R.A., Scott L.K. (1990). Quinilone antibiotics in the treatment of salmonella infections. Rev Infect Dis 12:873-889.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1991). Currents Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. supp 13, Unit 2.4.1-2.4.5.

Baquar, N., Threlfall, E.J., Rowe, B. Stanley, J. (1994). Phage type 193 of *Salmonella typhimurium* contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles. FEMS Microbiol Let 115:291-296.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 45:493-496.

BEM. (1995). Estudio microbiológico de *Salmonella*, serotipo Typhi, año 1993 (editorial). Bol Epidemiol Microbiol. Ministerio de Sanidad y Consumo 2:213-214.

BES. (1995). Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria (EDO) y sistema de información microbiológica (SIM). España. Año 1994. Bol Epidemiol Semanal. Ministerio de Sanidad y Consumo. 3:2.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acid Res 7:1513-1523.

Böhm H., Karch, H. (1992). DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 30:2169-2172.

Borecka, J., Pucekova, G., Bolchova, S. (1973). To the quetion of stability of *Salmonella typhi* phage types. J Hig Epidemiol Microbiol Inmunol 17:202-207.

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., Noller, H.F. (1981). Gene organization and primary structure af a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J Mol Biol 148:107-127.

Caetano-Anollés, G. (1993). Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. PCR Meth Applic 3:85-94.

CDR. (1995). Notification of infections diseases. Comm Dis Rep. PHLS. London. p. 295.

Craigie, J. and Yen, C.H. (1938,a). The demostration of types de *B. typhosus* by means of preparations of Type II Vi-phage. 1. Can J Pub Health 29:448-463.

Craigie, J. and Yen, C.H. (1938,b). The demostration of types de *B. typhosus* by means of preparations of Type II Vi-phage. 2. Can J Pub Health 29:484-496.

Craigie, J. and Felix, A. (1947). Typing of typhoid bacilli with Vi bacteriophage. Lancet i:823-827.

Davies, J., and Nomura, M. (1972). The genetics of bacterial ribosomes. Ann Rev Genet 6:203-234.

Dupont, H.L., Hornick, R.B., Snyder, M.J., Libonati, J.P. Woodward, T.E. (1971). Inmunity in typhoid fever: Evaluation of live streptomycin-dependent vaccine. Antimicrob Agents Chemother 236-239.

Edelman, R. and Levine, M.M. (1986). Summary of an international workshop on typhoid fever. Rev Infec Dis 8:329-349.

Edwards, E.A., Johnson, D.P., Pierce, W.C. (1975). Reactions and serologic responses to monovalent acetone-inactivated typhoid vacune. Bull WHO p.52-75.

Edwards, M.F., Stocker, B.A.D. (1988). Construction of del *aro*A *pur*A strains of *Salmonella typhi*. J Bacteriol 170: 3991-3995.

Ewing, W.H. (1986). The genus *Salmonella*. *In* Edwards and Ewing´s identification of *Enterobacteriaceae* 4th ed. p.27-72. Elsevier Science Publishing, New York.

Ferreccio, C., Levine, M.M., Rodriguez, H., Contreras, R. (1989). Chilean typhoid committee. Comparative efficacy of two, three, or four doses of TY21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsules: a field trial in an endemic area. J Infect Dis 159:766-769.

Forrest, B.D., LaBrooy, J.T., Beyer, L., Dearlove, C.E., Shearman, J.C. (1991). The human humoral immune response to *Salmonella typhi* Ty21a. J Infect Dis 163:336-345.

Germanier, R. (1984). Typhoid Fever. Bacterial vaccines. pp.130-137. Academic Press. New York.

Georghiou, P.R., Hamill, R.J., Wright, C.E., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D.A., Lupski, J.R. (1995). Molecular epidemiology of infectious due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital-associated strains by molecular techniques. Cli Infect Dis 20:84-94.

Gibert, L., Carroll, K., Hillyard, D., Barbé, J., Casadesúa, J. (1991). IS200 is not a member of the IS600 family of insertion sequences. Nucl Acids Res 19:1343.

Goldstein, F.W., Chumpiaz, J.C., Guevara, J.M., Papadopoulou, B., Acar, J.F., Vieu, J.F. (1986). Plasmid mediated resistance to multiple antibiotics in *Salmonella typhi*. J Infect Dis 153:261-266.

Gomez-Lus, P., Fields, B.S., Benson, R.F., Martin, W.T., O´Connor, S.P., Black, C.M. (1993). Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup 1. J Clin Microbiol 31:1940-1942.

Gotuzzo, E., Morris, J.G. Jr., Benavente, L., Word, P., Levine, O., Black, R.E. and Levine, M.M. (1987). Association between specific plasmids and relapse in typhoid fever. J Clin Microbiol 25:1779-1781.

Grimont, F. and Grimont, P.A.D. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potencial taxonomic tools. Ann Inst Pasteur, Microbiol 137B:165-175.

Guineé, P.A.M. and Van Leeuwen W.J. (1978). Phage typing of *Salmonella*. *In*: Methods in Microbiology Vol 11.Bergan, T., Norris, J.R. (eds) pp.175-191. Academic Press, London.

Guineé, P.A.M., Jansen, W.H., Maas, H.M.E., Le Minor, L., Beaud, R. (1981). An *unusual H antigen* (z_{66}) *in strains of Salmonella typhi*. Ann Inst Pasteur, Microbiol 132A: 331-334.

Gulati, S., Marwaha, R.K., Prakash, D., Ayyagari, A., Singhi, S., Kumar, L., Singhi, P., Walia, B.N. (1992). Multi-drug-resistant *Salmonella typhi* a need for therapeutic reappraisal. Ann Trop Paediatr 12:137-141.

Hall, P.A. and Lemoine, N.R. (1991). Koch's postulates revisited. J Pathol 164:283-284.

Harvey, S., Hill, C.W., Squires, C., Squires, C.L. (1988). Loss of the spacer loop sequence the *rrnB* operon in the *Escherichia coli* K-12 subline that bears the *relA1* mutation. J Bacteriol 170:1235-1238.

Heneine, W., Matar, G., Reeves, M., Swaminathan, B. (1991). Molecular characterization of *Salmonella typhi* isolates from patiens with severe and mild typhoid fever. Eur J epidemiol 7:192-193.

Herzog, C.H., Geddes, A.M. (1982). Chloramphenicol in the treatment of enteric fever. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 76:848-849

Hill, C.W., Harnish, B.W. (1981). Inversions between ribosomal RNA genes of *Escherichia coli* Proc Natl Acad Sci USA 78:7069-7072.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Facultatively anaerobic gram-negative rods. *In*: Bergey's Manual of determinative bacteriology 9th ed. Willians and Wilkins (eds.) pp.175-289. Baltimore. USA.

Hook, E.W. (1990). *Salmonella* species (including Typhoid Fever). *In*: Principles and Practice of Infectious Diseases, 3rd ed. Mandell, G.L., Douglas,R.G. and Bennett, J.E. (eds.) pp.1707-1709. NY: Churchill-Livingstone.

Hunter, P.R., Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson´s index of diversity. J Clin Microbiol 26:2465-2466.

Ibarluzea, J., Cerdán, R., Dorronsoro, M., Larrañaga, M. y Martinez, E. (1990). Brote de fiebre tifoidea asociado a problema en la red de distribución de agua de consumo, Vol 8. *En*: Jesus Ibarluzea y Maribel Larrañaga (eds.) pp.125-143. Serie de documentos de Salud Pública. Servicio Vasco de Salud, Vitoria.

Iino, T., Kutsukake, K. (1983). Flagellar phase variation in *Salmonella*: a model system regulated by flip-flop DNA inversions. *In*: Nucleic acid research. Future developments. K. Mizobuchi, I. Watanabe, and J.D. Watson (eds.) pp.395-406. Academic Press, Inc. New York.

Jacob, A.E., Shapiro, J.A., Yamamoto, L., Smith, D.I., Cohen, S.N. and Berg, D.I. (1977). Appendix B: bacterial plasmids. *In*: DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes (eds.) pp.607-710. Bukhari, A.I., Shapiro, J.A. and Adhya, S.L. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Jeffreys, A.J., Wilson, V., Neuman, R., Keyte, J. (1988) Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: Towards DNA fingerprinting of single cells. Nucleic Acids Res 16:10953-10971.

Jinks-Robertson, S., Nomura, M. (1987). Ribosomes and tRNA. *In*: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasaniik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (eds.) pp.1358-1385. American Society For Microbiology, Washington, D.C.

Karmaker, S., Biswas, D., Shaikh, N.M., Chatterjee, S.K., Kataria, V.K. and Kumar, R. (1991). Role of a large plasmid of *Salmonella typhi* encoding multiple drug resistance. J Med Microbiol 34: 149-151.

Kauffmann, F. (1936). Ueber die diphasische natur der Typhusbacillen. Z Hyg 119:103-118.

Kostman, J.R., Edlin, T.D., Lipuma, J.J., Stull, T.L. (1992). Molecular epidemiology of *Pseudomona cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. J Clin Microbiol 30: 2084-2087.

Kostman, J.R., Alden, M.B., Mair, M., Edlind, T.D., LiPuma, J.J., Stull, T.L. (1995). A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. J Infect Dis 171:204-208.

Lam, S., Roth, J.R. (1983). IS200: a *Salmonella*-specific insertion sequence. Cell 34:951-960.

Le Minor, L., Veron M., Popoff, M.Y. (1982). Taxonomie des *Salmonella*. Ann Microbiol (Inst. Pasteur) 133 B:223-243 and 245-254.

Le Minor, L., Popoff M.Y., Laurent, B., Hermant, D. (1986). Individualisation d'une septième sous-espèce de *Salmonella*: *S.cholerasuis* subs *Indica* subsp nov. Ann Inst Pasteur/Microbiol 137 B:211-217.

Le Minor, L., Popoff, M.Y. (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp nov. nom. rev. as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int J Sys Bact 357 (4):465-468.

Le Minor, L. (1988). Typing of *Salmonella* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 7:214-218.

Levine, M.M., Hone, D.M. (1989). Typhoid fever. *In*: Vaccines and Inmunotherapy. Cryz S.J. (ed.) pp.59-72. Pergamon Press. New York.

Levine, M.M. (1990). Enteric Infections. *In*: Modern vaccines. Moxon E.R. (ed.) pp.91-99. Edward Arnol. London.

Li, W.H. (1981). Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. Proc Natl Acad Sci USA 78:1085-1089

Lüderitz, O.W., Staub, A. M., Nikido, H. (1971). Isolation and chemical and inmunological characterization of bacterial lipopolysacharides. *In*: Microbial Toxins Vol 4. Wınbaun, G, Kadisand, S. and Ajl, S. (eds.) pp.145-224. Academic Press. New York.

Luk, J.M.C., Kongmuang, U., Reeves, P.R., Lindberg, A.A. (1993). Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A,B,C_2, and D). J Clin Microbiol 31:2118-2123.

Luk, J.M.C. (1994). A PCR enzyme immunoassay for detection of *Salmonella typhi*. Biotechniques 17:1038-1042.

Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J Bact 174:4525-4529.

MacFaddin, J.F. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed Medica Panamericana S.A. Buenos Aires.

MacFaddin, J.F. (1985). Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria Vol I. Williams and Wilkins (eds.). Baltimore.

Maher, K.O., Morris, G., Gotuzzo, E. Ferreccio, C., Ward, L.R., Benavente, L., Black, R.E., Rowe, B. and Levine, M.M. (1986). Molecular techniques in the study of *Salmonella typhi* in epidemiologic studies in endemic areas: comparison with VI phage typing. Am J Trop Med Hyg 35:831-835.

Mäkelä, P.H., Stocker, B.A.D. (1984). Genetics of lipopolysaccharide *In*: Handbook of endotoxin, vol. 1. E.T. Rietschel (ed.) pp.59-137. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

Mayer, L.W. (1988). Use of plsmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreack and in tracing the transmission of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 1:228-243.

Murray, B.E., Levine, M.M., Cordano, A.M., D'Ottone, K., Jayanetra, P., Kopecko, D., Pan-Urae, R. and Prenzel, I. (1985). Survey of plasmids in *Salmonella typhi* in Chile and Thailand. J Infec Dis 151:551-555.

Nair, S., Poh, C.L., Lim, Y.S., Tay, L., Goh, K.T. (1994). Genome fingerprintig of *Salmonella typhi* by pulsed-field gel electrophoresis for subtyping common phage types. Epidemiol Infect 113:391-402.

Nash, P. and Krenz, M.M. (1991). Culture media. *In*: Manual of Clinical Microbiology. Ballows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J. (eds.) pp. 1226-1288. American Society for Microbiology. Washington D.C.

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

Navarro, F., Llovet, T. Echeita, M.A., Coll, P., Aladueña, A., Usera, M.A., Prats, G. (1996). Comparison of phage typing, rRna gene and IS200 probes and pulsed-field gel electrophoresis in characterizing *Salmonella* serotype Typhi isolates. Enviado para su publicación a Epidemiol and Infect.

NCCLS. (1990). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard MT-A2. National committee for clinical laboratory Standards. Vilanova, P.A.

Nicolle, P. (1985). Les methods de lysotypie. Arch Inst Pasteur Tunis 62:5-22.

Nomura, M., Morgan, E.A., Jaskunas, S.R. (1977). Genetics of bacterial ribosomes. Ann Rev Genet 11:297-347.

Olarte, J., Galindo, E. (1973). *Salmonella typhi* resistant to chloramphenicol, ampicillin, and other antimicrobial agents strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. Antimicrob Agents Chemother 22:336-338.

Ørskov, F., Ørskov, I. (1983). From the National Institutes of Health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy and evolution of the enterobacteriaceae and other bacteria. J Infect Dis 148:346-357.

Pape, J.W., Gerdes, H., Oriol, L., Johnson WD. (1986). Typhoid fever: successful therapy with cefoperazone. J Infect Dis 153:272-276.

Pignato, S., Giammanco, G., Grimont, F and Grimont, P.A.D. (1992). Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Wien by rRNA gene restriction patterns. Res Microbiol 143:703-709.

Phipps, M., Pang, T., Koh, C.L., Puthucheary, S. (1991). Plasmid incidence rate and conjugative chloramphenicol and tetracycline resistance plasmids in Malaysian isolates of *Salmonella typhi*. Microbiol Inmunol 35:157-161.

Ponce, M.R., Micol, J.L. (1992). PCR amplification of long PCR. Nucleic Acids Res 20:623.

Popoff, M.Y., Le Minor, L. (1992). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars 6th revision. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Inst Pasteur. Paris, France.

Prieto, A. (1971). Fiebre tifoidea y Saneamiento en España. Tomo I. Ministerio de Gobernación. Dirección General de sanidad (ed.). Madrid.

Reeves, M.W., Evin, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D., Farmer III, J.J. (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by moltilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. J Clin Microbiol 27:313-320.

Robbins, J.D., Robbins, J.B. (1984). Reexamination of the prospective role of the capsular polysacharide Vi antigen of *Salmonella typhi* live oral vaccine strain Ty21a. Infect Immun 57: 3863-3868.

Römling, U., Grothues D., Heuer T., Tümmler B. (1992). Physical genome analysis of bacteria. Electrophoresis 13:626-631.

Ross, B.C., Dwyer, B. (1993). Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 31:329-334.

Rowe, B. and Threlfall, E.J. (1984). Drug resistance in gram-negative aerobic bacilli. Brit Med Bull 40:68-76.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual 2nd edn. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.A. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988a). Primer-directed enzymatic emplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Saxe, M.J., Notley, C.M. (1978). Experience with the typing of coagulase-negative staphylococci and micrococci. Zbl Bakt I Abt Orig 241:46-59.

Schwartz, D.C. and Cantor C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37:67-75.

Selander, R.K., Musser, J.M., Caugant, D.A., Gilmour, M.N. and Whittam, T.S. (1987). Population genetics of pathogenic bacteria. Microb Path 3:1-7.

Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H.,Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A. and Musser, J.M. (1990). Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fever. Infect Immun 58:2262-2275.

Shipp, C.R., Rowe, B. (1980). A mechanised microtechnique for *Salmonella* serotyping. J Clin Path 33:595-597.

Silverman, M., Zieg, J., Hilmen, M., Simon, M. (1979). Phase variation in *Salmonella*: Genetic analysis of a recombinational switch. Proc Natl Acad Sci 76:391-395.

Soe, G.B., Overturf, G.D. (1987). Treatment of typhoid fever and other systemic salmonelloses with cefotaxime, ceftriaxone, cefoperazone and other newer cephalosporins. Rev Infect Dis 9:719-736.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503-517.

Stanley, J., Goldsworthy, M., Threlfall, E.J. (1992a). Molecular phylogenetic typing of pandemic isolates of *Salmonella enteritidis*. FEMS Microbiol Lett 90:153-160.

Stanley, J., Chowdry, N., Powell, N., Threlfall, E.J. (1992b). Chromosomal genotypes (evolutionary lines) of *Salmonella berta*. FEMS Microbiol Lett 95:247-252.

Stanley, J., Burness, A., Powell, N., Chowdry, N., Jones, O. (1992c). The insertion sequence IS200 fingerprinting chromosoma genotypes and epidemiological relationships in *Salmonella heidelberg*. J Gen Microbiol 138:2329-2336.

Stanley, J., Baquar, N. and Threlfall, E.J. (1993). Genotypes and phylogenetic relationships of *Salmonella typhimurium* are defined by molecular fingerprinting of IS200 and 16S rrn loci. J Gen Microbiol 139:1133-1140.

Struelens, M.J., Bax, R., Deplano, A., Quint, W.G.V., Van Belkum, A. (1993) Concordant clonal delineation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting. J Cli Microbiol 31:1964-1970.

Stull, T.L., LiPuma J.J. (1988). A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 157:280-286.

Szu, S.C., Stone, A.L., Robbins, J.D., Schneerson, R., Robbins, J.B. (1987). Preparation and characterization of conjugates of the Vi capsular polysacharide and carrier proteins. J Exp Med 166: 1510-1524.

Tacket, C.O., Forrest, B., Morona, R., Attridge, S.R., LaBrooy, J., Tall, B.D., Reymann, M., Rowley, D., Levine M.M. (1990). Safety, immunogenicity, and efficacy againts cholera challenge in humans of a typhoid-cholera hibrid vaccine derived from *Salmonella typhi* Ty21a. Infect Immun 58:1620-1627.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33:2233-2239.

Thong, K.L., Cheong, Y.M., Puthucheary, S., Koh, C.L., Pang, T. (1994). Epidemiologic analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 32:1135-1141.

Threlfall, E.J., Torre, E., Ward, L.R., Dávalos-Perez, A., Rowe, B., Gibert, I. (1994). Insertion sequence IS200 fingerprinting of *Salmonella typhi*: an assesment of epidemiological applicability. Epidemiol Infect 112:253-261.

Toucas, M., Vieu, J.F. (1978). Étude des modifications du lysotype consécutives à l'adquisition in vitro de plasmides de résistance. Ann Microbiol (Institut Pasteur) 129B: 37-48.

Usera, M.A., Aladueña, A., Jaime, M.L., Raya, C., Fuster, C., Planes, A. y Bartolomé, R.M. 1992. Estudio de cepas multirresistentes de *Salmonella typhi* en España. Enf Infec Microbiol Clin 10:539-542.

Usera, M.A., Aladueña A., Echeita, M.A., Amor, E., Gomez-Garcés, J.L., Ibañez, C., Mendez, I., Sanz, J.C., Lopez-Brea, M. (1993 a). Investigation of an outbreak of *Salmonella typhi* in a public school in Madrid. Eur J Epidemiol 9:251-254.

Usera, M.A. (1993 b). *Salmonella typhi* in Spain: epidemiological markers and antimicrobial susceptibility (1979-1991) *In*: Biology of *Salmonella*. F.Cabello, C. Hormaeche, P. Mastroeni, and L. Bonina (eds.) pp.15-24. Plenum Press, New York.

Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A., Alvarez, J., Carreño, C., Orcau, A. y Planas, C. (1995). Investigación de un brote de fiebre tifoidea de origen hídrico ocurrido en Cataluña en 1994. Enferm Infecc Microbiol Clin 13:450-454.

Verger, G., Gurguí, M. (1988). Infecciones por salmonelas Vol I. *In* Doyma (ed) p.128-139. Enfermedades Infecciosas. Barcelona.

Verma, I.M. (1981). Reverse transcriptasa. *In*: The enzymes, Vol. 14A. Boyer, P.D. (ed.) pp.87-104. Academic Press. New York.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 19: 6823-6831.

Vieu, J.F. (1983). Aspects epidemiologiques actuels de la fievre typhoide en France (1982-1983). Bull Ass Anct Ele Inst Pasteur 98:31-34.

Vieu, J.F., Binette, H., Leherissey, M. (1986). Absence de l'antigen H:z_{66} chez 2355 souches de *Salmoneela typhi*. Ann Microbiol Inst Pasteur 132 A:331-334.

Wallace, M., Yousif A.A. (1990). Spread of multiresistant *Salmonella typhi*. Lancet 336:1065-1066.

Wayne, M.B. (1994). PCR amplification of up to 35-Kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. Proc Natl Acad 91:2216-2220.

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

White, P.B. (1926). Further studies of the *Salmonella* group. Great Britain Medical research Council Special Report: No. 103. London: HMSO.

Woods, C.R. Jnr, Versalovic, J., Koeutil, T., Lupski, J.R. (1992). Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprinting generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30:2921-2929.

Woods, T.C., Helsel, L., Swaminathan, B., Bibb, W.F., Pinner, R.W., Gellin, B.G., Collin, S.F., Waterman, S.H., Reeves, M.W., Brenner, D.J., Broome, C.V. (1992). Characterization of *Neisseria meningitidis* serodroup C by multilocus enzyme electrophoresis and ribosomal DNA restriction profiles (ribotyping). J Clin Microbiol 30:132-137.

Xercavins, M., Llovet, T., Navarro, F., Morera, M.A., More, J., Bella, F., Freixas, N., Simó, M., Coll, P., Garau, J., Prats, G. (1996). Epidemiology of typhoid fever in Terrassa (Spain): An unusually prolonged outbreak. Enviado para su publicación a: J Infect Dis.