

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Facultad de Medicina

NUEVO MARCADOR EPIDEMIOLOGICO EN

Salmonella enterica subespecie I

serotipo Enteritidis.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

EN MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PUBLICA POR:

María Rosa Alonso Melero.

Madrid, 1994.

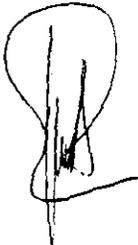
ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA EN EL SERVICIO DE BACTERIOLOGIA
DEL CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA, VIROLOGIA E INMUNOLOGIA
SANITARIAS DEL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, MAJADAHONDA,
MADRID. BAJO LA DIRECCION DEL DR. D. JUAN ANTONIO SAEZ NIETO.

Majadahonda, 29 de Abril de 1994.



María Rosa Alonso Melero

V° B° El Director



Dr. Juan Antonio Saez Nieto
Jefe de Servicio de
Bacteriología

V° B° El Tutor

Dr. Manuel Dominguez Carmona
Catedrático emérito de Medicina
Preventiva y Salud Pública

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. JUAN ANTONIO SAEZ NIETO, Jefe del Servicio de Bacteriología del C.N.M.V.I.S. y D. MANUEL DOMINGUEZ CARMONA, Catedrático Emérito del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública e Historia de la Ciencia de la Facultad de Medicina de la U.C.M.,

CERTIFICAN: Que la Licenciada M^a ROSA ALONSO MELERO ha realizado bajo nuestra dirección, un trabajo de Investigación titulado "Nuevo marcador epidemiológico en Salmonella enterica subespecie I serotipo Enteritidis", el cual presenta para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía, Programa de Medicina Preventiva y Salud Pública.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente Certificado.

V.º B.º
EL TUTOR (2)



Fdo.: M. Domínguez C.

(fecha y firma)

D.N.I.: 1.341.949

El Director de la Tesis



Fdo.: J.A. Saez Nieto

(fecha y firma)

D.N.I.:

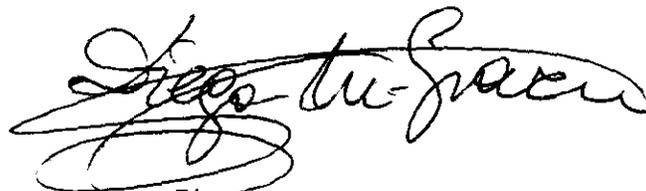
INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Reunida la Comisión de Doctorado del Departamento de MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PUBLICA E HISTORIA DE LA CIENCIA, y una vez examinados los contenidos y metodología del trabajo de investigación realizado por D^a M^a ROSA ALONSO MELERO, para la obtención del Grado de Doctor, se acepta su "admisión a trámite"

Fecha reunión
Consejo Departamento

12 de septiembre de 1994

El Director del Departamento



Fdo.:

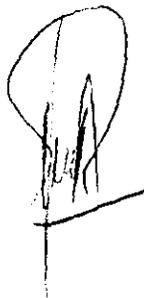
(fecha y firma)

JUAN ANTONIO SAEZ NIETO, Jefe del servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto de Salud "Carlos III"

CERTIFICA que:

El presente trabajo, realizado por MARIA ROSA ALONSO MELERO para optar al grado de DOCTOR EN MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PUBLICA titulado: "Nuevo Marcador Epidemiológico en Salmonella enterica subespecie I serotipo Enteritidis", ha sido realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Enterobacterias del Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (C.N.M.V.I.S.) del Instituto de Salud "Carlos III" y considera que está preparado para su presentación.

Y para que conste, extiende el presente certificado en Madrid a 3 de Mayo de Mil novecientos noventa y cuatro.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. Saez Nieto', written over a horizontal line.

A Carlos a Raquel y a Laura

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Juan Antonio Sáez Nieto por su apoyo, estímulo y dirección en el trabajo.

Al Profesor Doctor Don Manuel Dominguez Carmona por sus enseñanzas a lo largo de toda mi formación profesional y en especial por su colaboración y facilidades para el desarrollo de esta tesis.

A todos los profesores del departamento de Salud Publica e Historia de la Ciencia por la valiosa docencia recibida que me animo a profundizar en el camino de la Epidemiologia.

Al Doctor Miguel Angel Usera Gonzalez por haberme iniciado en el interés por el estudio epidemiológico de las bacterias y por su instrucción y asesoramiento a lo largo de esta tesis.

A María Aurora Echeita Sarrionandia por su colaboración diaria en el trabajo.

A todas mis compañeras del Laboratorio de Referencia de Salmonella por los años de trabajo compartidos.

A mi familia y muy especialmente a mis padres y a mi marido, que me han apoyado siempre, por su ayuda incondicional.

A todos ellos muchas gracias.

I N D I C E

	Página
<u>INTRODUCCION</u>	1
<u>1 LA ENFERMEDAD: SALMONELOSIS.</u>	2
1.1 <u>Historia.</u>	2
1.2 <u>Aspectos clínicos.</u>	4
1.3 <u>Patogénesis.</u>	5
1.4 <u>Diagnóstico.</u>	7
1.4.1 <u>Diagnóstico clínico.</u>	7
1.4.2 <u>Diagnóstico bacteriológico.</u>	7
1.4.3 <u>Diagnóstico diferencial.</u>	8
1.5 <u>Tratamiento y control.</u>	9
1.5.1 <u>Tratamiento sintomático.</u>	9
1.5.2 <u>Tratamiento preventivo.</u>	12
1.6 <u>Complicaciones clínicas y su tratamiento.</u>	15
<u>2 EPIDEMIOLOGIA DE LA SALMONELOSIS.</u>	18
2.1 <u>Aspectos epidemiológicos: morbilidad, mortalidad y estado de portador.</u>	18
2.2 <u>Fuentes de infección y mecanismos de transmisión.</u>	19
2.3 <u>Situación epidemiológica mundial de la salmonelosis.</u>	23
2.4 <u>Situación epidemiológica de la salmonelosis en España.</u>	26
<u>3 EL MICROORGANISMO: SALMONELLA ENTERICA SEROTIPO</u>	

<u>ENTERITIDIS.</u>	32
3.1 <u>Posición taxonómica y nomenclatura.</u>	32
3.2 <u>Características generales y bioquímicas.</u>	35
3.3 <u>Aislamiento e identificación.</u>	37
3.4 <u>Estructura antigénica.</u>	39
3.5 <u>Marcadores epidemiológicos.</u>	43
3.5.1 <u>Serotipia.</u>	44
3.5.2 <u>Resistencia a antimicrobianos.</u>	46
3.5.3 <u>Marcadores moleculares.</u>	47
3.5.3.1 Plasmidotipia.	47
3.5.3.2 Patrones de endonucleasas de restricción.	49
3.5.3.3 Ribotipia.	49
3.5.4 <u>Patrones electroforéticos de isoenzimas.</u>	50
3.5.5 <u>Fagotipia.</u>	50
3.5.5.1 Bacteriófagos.	50
3.5.5.2 Ciclo del bacteriófago y del huésped.	52
3.5.5.3 Esquemas de Fagotipia.	53
3.5.5.4 Técnicas de Fagotipia.	54
<u>OBJETIVOS</u>	60
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	63
1 <u>MUESTRAS DE AGUA.</u>	64
1.1 <u>Origen de las muestras de agua.</u>	64
1.2 <u>Selección de las muestras de agua.</u>	65

2	<u>CEPAS DE SALMONELLA SEROTIPO ENTERITIDIS.</u>	67
2.1	<u>Procedencia y origen de las cepas.</u>	67
2.2	<u>Distribución de las cepas en grupos.</u>	67
2.3	<u>Crecimiento y conservación de las cepas.</u>	75
3	<u>IDENTIFICACION.</u>	75
3.1	<u>Pruebas bioquímicas convencionales.</u>	75
3.1.1	<u>Medios diferenciales combinados.</u>	75
3.1.2	<u>Medios diferenciales</u>	
	<u>individuales.</u>	78
3.1.2.1	Fermentación de azúcares.	78
3.1.2.2	Actividad enzimática (Ureasa y Fenil Alanina deaminasa).	78
3.1.2.3	Utilización de compuestos químicos como única fuente de carbono.	79
3.1.2.4	Decarboxilación de aminoácidos.	80
3.2	<u>Panel comercial de identificación.</u>	80
4	<u>SEROTIPIA.</u>	82
4.1	<u>Producción de sueros.</u>	82
4.1.1	<u>Suero anti O:9.</u>	82
4.1.2	<u>Suero anti HC.</u>	83
4.1.3	<u>Suero anti H:m.</u>	83
4.2	<u>Aglutinación.</u>	84
4.2.1	<u>Aglutinación en microcápsula.</u>	84
4.2.2	<u>Aglutinación en porta.</u>	85

5	<u>FAGOTIPIA.</u>	85
5.1	<u>Aislamiento de bacteriófagos.</u>	85
5.1.1	<u>Aislamiento e identificación de bacteriófagos salvajes.</u>	86
5.1.2	<u>Aislamiento e identificación de bacteriófagos lisogénicos.</u>	87
5.2	<u>Purificación de los bacteriófagos.</u>	88
5.3	<u>Determinación del RTD de los bacteriófagos.</u>	90
5.4	<u>Propagación del bacteriófago.</u>	91
5.5	<u>Técnica de la fagotipia.</u>	92
5.6	<u>Lectura de los resultados.</u>	92
5.7	<u>Interpretación de los resultados.</u>	94
5.8	<u>Juego de bacteriófagos alternativos.</u>	94
5.9	<u>Juego de bacteriófagos autóctono para Salmonella serotipo Enteritidis.</u>	95
6	<u>ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.</u>	96
	<u>RESULTADOS</u>	108
1	<u>BACTERIOFAGOS DE PROCEDENCIA SALVAJE.</u>	109
1.1	<u>Aislamiento de bacteriófagos salvajes.</u>	109
1.1.1	<u>Cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.</u>	109
1.1.2	<u>Muestras de agua.</u>	109
1.1.3	<u>Aislamiento de bacteriófagos salvajes.</u>	109
1.2	<u>Selección de los bacteriófagos salvajes aislados.</u>	110

1.2.1	<u>Primera selección.</u>	110
1.2.1.1	Cepas de <u>Salmonella</u> serotipo Enteritidis.	110
1.2.1.2	Criterios de selección.	111
1.2.1.3	Fagotipia Grupo Primero y Tercero, subgrupo B.	121
1.2.2	<u>Segunda selección.</u>	122
1.2.2.1	Cepas de <u>Salmonella</u> serotipo Enteritidis.	122
1.2.2.2	Criterios de selección.	122
1.2.3	<u>Tercera selección.</u>	123
1.2.3.1	Cepas de <u>Salmonella</u> serotipo Enteritidis.	124
1.2.3.2	Criterios de selección.	124
1.2.4	<u>Cuarta selección.</u>	128
1.2.4.1	Cepas de <u>Salmonella</u> serotipo Enteritidis.	128
1.2.4.2	Criterios de selección.	128
1.2.5	<u>Selección final de bacteriófagos</u> <u>de procedencia salvaje.</u>	129
2	<u>BACTERIOFAGOS LISOGENICOS.</u>	130
2.1	<u>Inducción de bacteriófagos lisogénicos.</u>	130
2.1.1	<u>Cepas de Salmonella serotipo</u> <u>Enteritidis.</u>	130
2.1.2	<u>Bacteriófagos lisogénicos</u> <u>inducidos.</u>	131
2.1.3	<u>Primera selección de</u> <u>bacteriófagos lisogénicos.</u>	134

2.1.3.1	Cepas de <u>Salmonella</u> serotipo Enteritidis.	134
2.1.3.2	Criterios de selección.	134
2.1.4	<u>Segunda selección de</u> <u>bacteriófagos inducidos:</u>	137
2.1.4.1	Cepas de <u>Salmonella</u> serotipo Enteritidis.	137
2.1.4.2	Criterios de selección.	137
3	<u>BACTERIOFAGOS DE JUEGOS ALTERNATIVOS.</u>	138
3.1	<u>Cepas de Salmonella serotipo</u> <u>Enteritidis.</u>	138
3.2	<u>Selección de bacteriófagos de juegos</u> <u>alternativos.</u>	138
4	<u>SELECCION DE BACTERIOFAGOS DEL JUEGO AUTOCTONO.</u>	140
5	<u>JUEGO DE BACTERIOFAGOS SELECCIONADO.</u>	143
6	<u>ESQUEMA DE FAGOTIPIA.</u>	145
7	<u>APLICACION DEL ESQUEMA DE FAGOTIPIA A BROTES.</u>	147
	 <u>DISCUSION</u>	149
1	<u>FAGOTIPIA COMO MARCADOR EPIDEMIOLOGICO</u> <u>COMPLEMENTARIO.</u>	150
2	<u>BACTERIOFAGOS ADAPTADOS.</u>	151
3	<u>VALORACION DEL PODER DE DISCRIMINACION DEL</u> <u>NUEVO ESQUEMA DE FAGOTIPIA.</u>	152
4	<u>TIPADO DE BROTES CON EL NUEVO ESQUEMA DE</u> <u>FAGOTIPIA.</u>	154
5	<u>VALORACION COMPARATIVA DE LOS BACTERIOFAGOS QUE</u> <u>COMPONEN EL NUEVO ESQUEMA DE FAGOTIPIA.</u>	154

6	<u>VALORACION COMPARATIVA DE LOS FAGOTIPOS QUE COMPONEN EL NUEVO ESQUEMA DE FAGOTIPIA.</u>	156
7	<u>VALORACION COMPARATIVA ENTRE LOS BACTERIOFAGOS DEL JUEGO DE FAGOTIPIA AUTOCTONO ANTERIOR Y EL NUEVO.</u>	157
8	<u>VALORACION COMPARATIVA ENTRE LOS FAGOTIPOS DEL ESQUEMA AUTOCTONO ANTERIOR Y EL NUEVO.</u>	159
	<u>CONCLUSIONES</u>	162
	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	166
	<u>FOTOGRAFIAS</u>	190

INTRODUCCION

1 LA ENFERMEDAD: SALMONELOSIS.

1.1 Historia.

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa causada por gérmenes del género Salmonella, que engloba a 7 subespecies con más de 2300 serotipos. Los diversos gérmenes del género Salmonella son fundamentalmente parásitos intestinales de los animales y del hombre (1).

El cuadro clínico más importante producido por salmonelas es la fiebre tifoidea (Salmonella serotipo Typhi). Esta entidad clínica fue individualizada antes de la era bacteriológica por los signos clínicos y las lesiones ulcerosas que producía en el intestino. El aislamiento de su agente causal fue realizado por primera vez por Petit y Serres en 1813. No fue hasta 1829 cuando Louis la describió detalladamente por primera vez (2). En 1880 Karl Eberth descubrió el bacilo tifoideo o bacilo de Eberth-Gaffky en los ganglios mesentéricos y en el bazo de enfermos fallecidos por fiebre tifoidea (3). Graffky lo aisló poco después en cultivo puro. En 1886 Widal y Grumbaum encontraron que los sueros de los enfermos con fiebre tifoidea aglutinaban los cultivos típicos (descubriendo el serodiagnóstico, que fue más tarde aplicado a numerosas enfermedades infecciosas) (1,2).

Posteriormente se vio que algunos enfermos con síndrome tifoideo tenían un suero que no era capaz de aglutinar

cultivos de bacilos tíficos. A esta serie de cuadros morbosos, de curso clínico bacteriémico semejante a la fiebre tifoidea, aunque atenuados, se les denominó "fiebres paratifoideas". Los serotipos implicados en estos cuadros son el grupo de los bacilos paratíficos denominados Salmonella serotipo Paratyphi A, Salmonella serotipo Paratyphi B, Salmonella serotipo Paratyphi C y Salmonella serotipo Sendai.

El estudio de la estructura antigénica de todas estas bacterias sentó las bases para su clasificación serológica, ampliamente desarrollada por Kauffman (4).

Por todo esto, la fiebre tifoidea ha constituido un modelo en el estudio de las enfermedades infecciosas y, más concretamente, del resto de las salmonelosis (5).

Paralelamente a los estudios sobre el agente causal de fiebres tifoideas y paratifoideas, se fueron aislando otras salmonelas productoras de diferentes patologías (5).

En 1885, Salmon y Smith aislaron Salmonella serotipo Choleraesuis, en casos de cólera porcino. Garterer, en 1888, en un paciente que falleció en el curso de un brote epidémico de intoxicación alimentaria, logró cultivar un nuevo serotipo hasta entonces desconocido, Salmonella serotipo Enteritidis. En 1892, Loffter aisló Salmonella serotipo Typhimurium (también gran productor de gastroenteritis de origen alimentario) a partir de ratones que presentaban un cuadro

tífico (5).

Posteriormente han ido apareciendo nuevos serotipos de Salmonella hasta llegar en la actualidad a una cifra superior a 2.300.

1.2 Aspectos clínicos.

La salmonelosis es un proceso infeccioso que cursa fundamentalmente con una gastroenteritis, exceptuando la salmonelosis producida por Salmonella serotipo Typhi, ya que este serotipo es el responsable de la fiebre tifoidea, enfermedad con entidad clínica propia, totalmente diferente al resto de las salmonelosis.

Las gastroenteritis producidas por Salmonella presentan un cuadro clínico que aparece generalmente tras una toxiinfección alimentaria.

Las salmonelosis no suelen cursar con bacteriemia ni septicemia. Se manifiestan por un cuadro tóxico intestinal local, con deshidratación coleriforme y coprocultivos positivos.

Su periodo de incubación es de 8 a 48 horas. El comienzo del cuadro clínico es agudo, con violentos fenómenos gástricos e intestinales (dolores cólicos), vómitos, fiebre,

en algunas ocasiones infarto de bazo e ictericia (34).

En los casos de curso coleriforme hay diarreas profusas, con heces en "agua de arroz", provocando una gran astenia.

Cuando el colon está muy afectado se observan cuadros cólicos violentos y evacuaciones disenteriformes con moco, sangre y pus (6).

En personas inmunodeprimidas puede producirse ocasionalmente una sepsis tras la gastroenteritis, apareciendo hemocultivos positivos (17).

El pronóstico es bueno, salvo en los casos graves por la facilidad de colapso debido a la deshidratación e hipopotasemia, pero generalmente estos son poco frecuentes.

En los cuadros habituales el curso suele durar varios días, pero el enfermo se repone sin riesgo de secuelas (20).

1.3 Patogénesis.

El agente causal, como ya se ha dicho anteriormente, es el microorganismo del género Salmonella. La dosis infectante generalmente es muy alta, normalmente superior a 10^5 ufc, dependiendo de las características del germen y del huésped (6,7).

El reservorio de estos microorganismos lo constituyen animales enfermos y el hombre.

Las salmonelas penetran por vía oral al ingerir alimentos contaminados. Se multiplican ampliamente en las partes altas del intestino delgado, invadiendo posteriormente el intestino grueso, ciego y apéndice, sobre todo en los recodos del colon, donde proliferan abundantemente (7).

En el intestino pueden sufrir una inhibición, ejercida por la flora. Esta inhibición depende en gran parte de la capacidad que tiene la flora saprofita de bajar el pH intestinal. Si baja el pH, aumenta el efecto inhibidor (8).

Las salmonellas se adhieren a la pared del intestino y, si no son eliminadas por el peristaltismo intestinal, producen una enterotoxina que es la responsable de la alteración de la mucosa intestinal, facilitando el paso del germen hasta los enterocitos de la lamina propia. Allí se produce una reacción inflamatoria a expensas de leucocitos polimorfonucleares que impiden su paso a sangre (salvo en el caso del serotipo Typhi que siempre suele invadir el torrente circulatorio). La bacteriemia aparece en rarísimas ocasiones, estando condicionada por la situación inmunológica del paciente (9,10).

1.4 Diagnóstico.

1.4.1 Diagnóstico clínico.

El diagnóstico de una gastroenteritis producida por Salmonella (a excepción del serotipo Typhi) se hace fundamentalmente por clínica, observando la sintomatología del enfermo.

Se complementa con una anamnesis al paciente ya que, por el escaso periodo de incubación de la enfermedad, es fácil, en la mayoría de los casos, relacionar el comienzo de la sintomatología con la ingestión de alimentos contaminados (6).

1.4.2 Diagnóstico bacteriológico.

La confirmación del diagnóstico se hace por un examen directo de las heces del enfermo (11). El aislamiento del germen en las heces es posible durante el periodo que dura el proceso gastroentérico (periodo agudo de la enfermedad) (12).

En casos graves o de enfermos inmunodeprimidos también se puede aislar este microorganismo en sangre (13).

Además de aislar el germen en la persona enferma, es muy importante aislarlo del alimento contaminado origen de la

enfermedad, sobre todo en brotes comunitarios, para localizar la fuente de infección que en muchos casos puede ser un manipulador de alimentos portador asintomático. También se puede aislar de muestras ambientales (14,15,16).

1.4.3 Diagnóstico diferencial

Se debe hacer con todo aquello que ocasione gastroenteritis producidas por alimentos.

Para un estudio de toxiinfecciones alimentarias se pueden distinguir dos grandes grupos:

- Origen químico no bacteriano: alimentos de origen vegetal (setas, cornezuelo de centeno, alfatoxinas, semillas del género Lathyrus) y alimentos de origen animal (pescados, mariscos y carnes).

- Origen bacteriano: enterotoxina estafilocócica, toxina botulínica, Salmonella, Clostridium welchii, Vibrio parahemolyticus, Shigella, Vibrio cholerae y otras.

Generalmente, el diagnóstico diferencial suele ser fácil atendiendo al cuadro clínico, período de incubación, duración del proceso, etc. En todo caso es aconsejable la realización

de coprocultivo para la confirmación diagnóstica (11).

1.5 Tratamiento y control.

Las gastroenteritis por Salmonella (a excepción del serotipo Typhi) no suelen cursar, en nuestro medio, con procesos muy graves de diarreas con deshidratación, por lo que, en la mayoría de los casos, no se necesita un tratamiento medicamentoso (antibioterapia) sino un tratamiento sintomático y unas medidas higiénico-sanitarias preventivas (18).

1.5.1 Tratamiento sintomático.

Se basa, fundamentalmente, en una dieta astringente. Normalmente, siguiendo esta pauta, en 2-4 días suele remitir el cuadro por completo sin necesidad de otro tipo de terapia coadyudante (19).

El primer día de aparición del cuadro de gastroenteritis se recomienda la ingestión de líquidos con un aporte salino y glucosado (por encima de dos litros al día), incorporando a partir del segundo día alimentos con poder astringente. Si el cuadro diarreico va remitiendo se pueden ir incorporando a la dieta, en días sucesivos, el resto de los alimentos.

En casos en los que el cuadro confiera mayor gravedad y el enfermo pudiera sufrir una deshidratación, se procederá a un tratamiento de rehidratación oral e incluso, si los vómitos lo impidieran, se pasaría a una terapia intravenosa.

En 1982-1983 la OMS propuso las pautas para la rehidratación oral:

a) Rehidratación oral con bicarbonato.

- ClNa: 3,5 gr/l.
- Bicarbonato sódico o carbonato ácido de sodio:
2,5 gr/l.
- ClK: 1,5 gr/l.
- Glucosa anhidra: 20,0 gr/l.

b) Rehidratación oral con citrato:

- ClNa: 3,5 gr/l.
- Citrato trisódico deshidratado: 2,9 gr/l.
- ClK: 1,5 gr/l.
- Glucosa anhidra: 20,0 gr/l.

El tratamiento con antibióticos se reserva esencialmente para los casos muy graves que no ceden en los primeros días con dieta astringente hidroelectrolítica, para evitar posibles complicaciones debidas al mal estado general del paciente (17).

Existe mucha controversia sobre el tratamiento con

antibióticos en las gastroenteritis por Salmonella. La mayoría de los autores opinan que con un buen tratamiento higiénico dietético el cuadro remite sin riesgo de complicaciones para el paciente, evitándole así un posible estado de portador (21).

En los casos de infecciones extraintestinales por Salmonella o con riesgo de diseminación y complicaciones, se necesita un tratamiento antibiótico correcto. Existen muchos trabajos sobre susceptibilidad a los antibióticos de salmonelas entéricas no typhi (22). El tratamiento de elección siempre había sido la ampicilina, pero la creciente aparición de resistencias a este antibiótico excluye su uso en nuestro medio como antibiótico de elección (23,24,25). Las causas del aumento de resistencia de Salmonella a distintos antibióticos, fundamentalmente la ampicilina, se asocian al uso de antibióticos en animales para promoción del crecimiento y en humanos a su uso masivo e indiscriminado (26,27). Prescindiendo de la ampicilina, otro antibiótico de gran uso es el cloranfenicol. Sin embargo, los problemas de toxicidad graves que tiene este antibiótico han hecho que su uso se restrinja a los casos de complicaciones graves.

Actualmente el tratamiento de elección son las cefalosporinas de tercera generación, el cotrimazol y las quinolonas, porque no prolongan el estado de portador fecal ni favorecen la aparición de cepas resistentes (28).

1.5.2 Tratamiento preventivo.

La salmonelosis en animales y en el hombre no puede ser enteramente erradicada, pero sí se puede reducir el número de afectados cumpliendo una serie de normas básicas de higiene. Un buen ejemplo de ello lo constituye Dinamarca, donde se lleva controlando la enfermedad desde hace casi 30 años (31,32).

El tratamiento preventivo se basa fundamentalmente en tres líneas a seguir:

- A) Erradicar la contaminación de animales.
- B) Descontaminación de alimentos y control de desechos.
- C) Educación higiénico-sanitaria a los manipuladores de alimentos y consumidores.

A) Erradicar la contaminación de animales:

A.1.- La descontaminación de piensos es uno de los puntos más importantes para la prevención de la salmonelosis, ya que la mayoría de los animales infectados suelen estarlo por ingerir piensos contaminados, aunque también puede producirse la contaminación en posteriores manipulaciones (mataderos, cocinas, ...). Los piensos se contaminan muy fácilmente

con las salmonelas que se encuentran en el medio ambiente, por lo que hay que tener mucho cuidado con su empaquetamiento, distribución, transporte y almacenaje. La destrucción de las salmonelas en piensos se realiza mediante una dosis de 3-35% de ácido propiónico. El problema está en que no todos los animales toleran el ácido propiónico a esa concentración (29).

A.2.- Adición de antimicrobianos en los alimentos para animales y tratamiento de los huevos de consumo humano con gentamicina. El inconveniente es que aparecen a posteriori resistencias a estos antimicrobianos tanto en animales como en el hombre (29).

A.3.- Inmunización frente a salmonelas. Desarrollo de un factor antiadhesivo que proteja a los alimentos para animales y, posiblemente, frente a los estados de portador crónico (31).

B) Descontaminación de alimentos y desechos:

Se están considerando varias opciones que, hasta ahora, están dando buenos resultados pero no destruyen a las salmonelas en su totalidad. Estas son: radiación ionizante, vapor, ácido acético, cloración de aguas y pasteurización (30). Los alimentos animales no son la única fuente de salmonelosis para el hombre. También lo son los vegetales cuando se riegan con aguas residuales.

El agua también es un hábitat ideal para la Salmonella.

Es necesario también controlar y establecer unas medidas higiénicas en hospitales, restaurantes, cocinas, comedores, mataderos, etc., ya que muchos de los alimentos contaminados se infectan en estos lugares por las malas condiciones higiénicas existentes.

Una manera de prever también la contaminación de animales, alimentos y aguas es mediante un adecuado manejo de los desechos, ya que son fácilmente contaminados por las salmonelas del medio ambiente (31,32).

Uno de los aspectos más importantes a seguir con el alimento es el control de la temperatura de conservación.

C) Educación de los manipuladores de alimentos y consumidores:

Tanto los consumidores como las personas que trabajan con alimentos deben ser informados de las medidas higiénicas que deben seguir y motivados para que las sigan (33).

Es necesario conseguir que las prácticas higiénicas se conviertan en una costumbre. Esto resulta difícil en

el caso de las amas de casa porque su control resulta imposible. Por ello hay que realizar una buena educación sanitaria con una adecuada coordinación entre profesores y expertos en comunicación y educación (30,31).

Las industrias pueden colaborar también reseñando en las etiquetas de los productos alimentarios normas higiénicas para la manipulación, cocinado y almacenaje de los alimentos, haciendo hincapié en que el ama de casa lea y siga las instrucciones de la etiqueta (32,33).

1.6 Complicaciones clínicas y su tratamiento.

Habitualmente, una salmonelosis (no tyfica) cursa con un cuadro clínico diarreico de mayor o menor intensidad, con un cierto grado de afectación general, pero sin mayores consecuencias para el enfermo. Sin embargo, siempre es conveniente señalar que, en determinadas circunstancias como son la edad del enfermo, estados de inmunodepresión o grandes epidemias de salmonelosis, pueden producirse complicaciones sistémicas graves (7).

A continuación se señalan algunas de las complicaciones que pueden surgir, cuya importancia se debe no tanto a su frecuencia como a su gravedad:

- Abscesos cerebrales: Suelen aparecer en niños (35,36) y, generalmente, tras una infección de estructuras vecinas (otitis, mastoiditis, sinusitis, etc.) (37) o tras una meningitis por Salmonella (38,39). Normalmente el germen aislado es de los grupos B, C, D. Su tratamiento fundamentalmente es con cefalosporinas de tercera generación, con o sin aminoglucósidos (39). Generalmente, los abscesos y empiemas causados por Salmonella suelen aparecer antes del primer año de vida (40,41,42).

- Bacteriemia: Complicación producida generalmente desde un foco de gastroenteritis. Se suele dar en niños menores de tres meses (43,44). La Salmonella causante de estos procesos es, generalmente, Salmonella serotipo Enteritidis (45,46,47,48). Para prevenir esta complicación se recomienda a niños menores de 6 meses que sufran un proceso de salmonelosis tratarlos con terapia antibacteriana, ya que esto hace que descienda la incidencia de bacteriemia (49,50).

- Otras localizaciones: Hay algún caso descrito de abscesos renales (51,52,53,54). Suelen provenir de un foco gastroentérico. Suele suceder en niños con enfermedades concomitantes en vías urinarias. Los tratamientos de elección en estos casos son:

ampicilina, cloranfenicol, trimetropin-sulfometoxazol, nitrofurantoina y cefalosporinas de tercera generación (55,56,57). La conveniencia de uno u otro antibiótico radica en la duración del tratamiento, en base a la situación y edad del paciente, y en la localización de la enfermedad (58).

- Invasión transplacentaria: Se ha descrito algún caso de una infección transplacentaria por un foco gastroentérico de la madre (59).

2 EPIDEMIOLOGIA DE LA SALMONELOSIS.

2.1 Aspectos epidemiológicos: morbilidad, mortalidad y estado de portador.

La salmonelosis (no Tyfica) es un proceso infeccioso que cursa con una elevada morbilidad (76). Se ha podido demostrar que Salmonella es el agente responsable de la mayoría de las toxiinfecciones alimentarias en los países desarrollados. Así, en un estudio realizado en Francia e Inglaterra se observó que, de 59 brotes producidos por intoxicación alimentaria cogidos al azar entre 1931 y 1981, 32 fueron causados por Salmonella sp y que, de 7.800 casos (brotes y casos aislados) seleccionados de igual manera, 7.718 fueron producidos por este microorganismo (60).

El numero de intoxicaciones alimentarias se ve además incrementado, sobre todo, en los meses de verano, por las óptimas condiciones climatológicas para el desarrollo y crecimiento del germen, siendo en estos meses elevadísima la tasa de morbilidad (76).

Las gastroenteritis por Salmonella (a excepción del serotipo Typhi), como ya se indicó en el apartado de aspectos clínicos, son procesos que no suelen revestir gravedad, por lo que la tasa de mortalidad es baja (76). El proceso suele remitir en pocos días sin dejar secuelas.

Existe un estado de portador en este tipo de enfermedad que reviste mayor importancia cuando el sujeto en cuestión es manipulador de alimentos. Es difícil prevenir y sobre todo controlar los posibles portadores, ya que gran parte de ellos son portadores crónicos y asintomáticos. En la práctica resulta imposible realizar de forma sistemática un cultivo de heces de todos los manipuladores de alimentos. Además se ha demostrado, tras muchos estudios con manipuladores de alimentos, que coprocultivos negativos no indican en un alto porcentaje de casos que el manipulador no sea portador de la enfermedad, pudiendo en un momento determinado ocasionar una contaminación de los alimentos si sus medidas higiénicas no son las adecuadas y, consecuentemente, provocar brote epidémico (152).

2.2 Fuentes de infección y mecanismos de transmisión.

Las fuentes de infección en las salmonelosis son generalmente alimentos contaminados . El origen de la enfermedad es fácil de encontrar por regla general, ya que el período de incubación de estas gastroenteritis es corto y su relación con el alimento causante es inmediata (11).

La distribución del microorganismo por alimentos no está bien determinada. La gran diversidad de alimentos contaminados por Salmonella viene dada más por la fácil identificación de este germen en los alimentos que por la

composición propia del alimento (70,72).

Son muchos los serotipos de Salmonella que se ven implicados en toxiinfecciones alimentarias. Su distribución por alimentos varía según los países (70,71).

Se ha podido demostrar que las condiciones medioambientales son esenciales en la contaminación del alimento. Muchos de los productos que se consumen vienen infectados por gérmenes potencialmente patógenos. Si las condiciones no son favorables el riesgo de contaminación del alimento es escaso, pero si su crecimiento se ve favorecido por unas condiciones medioambientales propicias pueden ocasionar una importante toxiinfección alimentaria.

Generalmente las fuentes de infección son:

A) Reservorio animal (alimento para animales contaminado → infección del animal → alimento → hombre).

Los animales más frecuentemente infectados son aves, cerdos y ganado. Dentro de las aves los pollos son los más susceptibles a la contaminación por salmonellas, debido fundamentalmente a su producción masiva. Hay dos serotipos que producen enfermedad específica en estos animales: Gallinarum y Pullorum (61,62).

Los patos y pavos suelen infectarse por

Salmonella serotipo Enteritidis y Salmonella serotipo Typhimurium (63).

Otras aves en general pueden ser contaminadas por este microorganismo, pudiendo infectar al hombre no sólo por su consumo sino también por la contaminación de otros animales o alimentos con sus excretas (66).

Los huevos pueden ser contaminados durante su formación por una infección del ave, mediante el paso del microorganismo a través de los poros de la cáscara (contaminación transovárica) (61).

Otros animales que pueden infectarse con salmonelas, aunque en una proporción mucho menor que en el caso de las aves, son los cerdos y el ganado en general. En el caso del ganado vacuno es Salmonella serotipo Dublin la más frecuentemente aislada. En el caso de ovejas y cabras el serotipo más frecuente es Abortusovis (produce aborto en ovejas) (65). Salmonella serotipo Enteritidis, Typhimurium, Dublin, Oranienburg y Java producen graves trastornos en corderos (65).

Los animales domésticos pueden verse contaminados, infectando posteriormente al hombre por sus excretas. Los serotipos más frecuentemente implicados son: Salmonella serotipo Enteritidis y Typhimurium (64).

Los artrópodos y pulgas son unos transmisores ideales de la enfermedad, ya que transportan las

salmonelas en sus patas o en la saliva. Asimismo se aíslan salmonelas de animales de sangre fría (tortugas y lagartos) fundamentalmente de las subespecies IIIa y IIIb (67).

B) Infección de los alimentos (60).

Los alimentos pueden estar contaminados por alguna de las siguientes causas:

- El animal del cual deriva el alimento está infectado.
- El animal o el alimento estaba en contacto con animales infectados.
- Contaminación del alimento en su tratamiento y elaboración.

C) Reservorio humano (60).

El portador de la enfermedad puede contaminar alimentos, agua de mar, aguas recreativas, residuales, etc.

Los alimentos más frecuentemente infectados son: huevos, leche y carne (69,73,74,75).

La contaminación de los alimentos puede ser intrínseca (infección del animal del que proceden) o extrínseca (contaminación en su manipulación) (68).

2.3 Situación epidemiológica mundial de la salmonelosis.

Las enfermedades diarreicas en general son la mayor causa de morbi-mortalidad en los países en vías de desarrollo. En los países desarrollados, aunque la mortalidad es escasa la morbilidad es alta (76).

La importancia de las gastroenteritis por Salmonella (no Typhi) en los países en vías de desarrollo es relativamente menor con respecto a otros gérmenes causantes de diarreas, más por el aspecto benigno de su clínica que por el número de afectados. En los países desarrollados Salmonella es la principal causa de gastroenteritis, siendo su principal fuente de infección, como ya se ha mencionado anteriormente, los alimentos contaminados (77).

Existen datos muy dispares acerca del número de casos de salmonelosis declarados en un determinado año entre unos países y otros. Generalmente, el número de casos declarados no corresponde con el número real, dependiendo, en su mayor parte, de la información sanitaria de cada país. Paradójicamente, países con mejores condiciones higiénico-sanitarias declaran mayor número de casos de salmonelosis que países con medidas más deficitarias. Ello se debe, fundamentalmente, a la información epidemiológica y control sanitario existente. Otras veces es debido a que en determinados países los casos de diarreas por Salmonella no tienen importancia, aunque sean un número elevado, con

respecto a diarreas más graves causadas por otros gérmenes más patógenos (vg. cólera).

Un ejemplo de todo esto aparece plasmado en un trabajo realizado en Inglaterra en 1986, que recoge el número de casos declarados en distintos países (78):

India:	1.210	Suecia:	4.396
Italia:	12.991	Tailandia:	3.252
Grecia:	204	Reino Unido:	14.415
México:	376	Venezuela:	170
Malasia:	2.143	EE.UU.:	42.028
Perú:	1.454	Yugoslavia:	10.005
Rumanía:	6.902	Zaire:	279

Dicho trabajo incluye un análisis de la incidencia de Salmonella por serotipos en distintos países. Existen dos serotipos mayoritarios implicados en la contaminación de alimentos: serotipo Enteritidis y Typhimurium. Hasta 1986 Salmonella serotipo Typhimurium era el serotipo más frecuentemente aislado, pero a partir de ese año Salmonella serotipo Enteritidis pasó a ocupar la primera posición, siendo esto más evidente en Europa que en América (78).

Así pues, a partir de los últimos 8 años Salmonella serotipo Enteritidis ha pasado a ser el serotipo más importante como causante de salmonelosis en Europa, América del Norte y del Sur, pudiéndose incluir también Africa,

aunque en este continente las diarreas más importantes (más por su gravedad que por su frecuencia) no sean las producidas por este microorganismo. La causa de este aumento no está clara pero se estima relacionada con el consumo indiscriminado de huevos y pollos contaminados (79).

En el trabajo anteriormente mencionado (78), se hace también un estudio comparativo del número de casos producidos por Salmonella serotipo Enteritidis y Typhimurium en distintos países durante 1986 :

PAISES	Nº TOTAL CEPAS	SEROTIPO ENTERITIDIS	SEROTIPO TYPHIMURIUM
Austria	3.098	641	512
Bulgaria	1.559	719	403
Dinamarca	1.636	654	540
Finlandia	5.329	1.859	1.032
Hungría	17.488	8.908	1.698
G.B.	14.415	5.885	4.001
EE.UU.	42.028	10.742	5.967

Fue a partir de 1988 cuando la frecuencia de Salmonella serotipo Enteritidis aumentó en todos los países (80). Esto dio pie a numerosos estudios, asociándose el serotipo Enteritidis en la mayoría de los casos al consumo de huevos y pollos contaminados (81,82,83).

2.4 Situación epidemiológica de la salmonelosis en España.

En España, al igual que en el resto de los países desarrollados, el principal agente causal de las diarreas es Salmonella (no Typhi). Estudios realizados por el Centro Nacional de Referencia de salmonelas del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (CNMVIS) del Instituto de Salud Carlos III así lo confirman (84,85,86,87,88,89,90).

Hasta 1982 el serotipo más frecuente era Typhimurium, pero a partir de ese año Enteritidis pasó a ser el serotipo mayoritario en España.

En la tabla 1 y gráfico 1 aparecen reflejados los serotipos mayoritarios entre 1980 y 1991, apreciándose el aumento progresivo de aislamientos de Salmonella serotipo Enteritidis a partir de 1982, así como la gran diferencia de este serotipo y el serotipo Typhimurium con el resto de los serotipos mayoritarios aislados en España entre 1980 y 1991 (84,85,86,87,88,89,90). En todas las tablas y gráficos que se muestran a lo largo de este trabajo no se incluye el número de aislamientos de Salmonella serotipo Typhi.

El aumento progresivo que ha sufrido el serotipo Enteritidis ha sido tanto en aislados de origen humano como no humano (90), existiendo una clara influencia estacional que da lugar a la aparición de un pico en los meses de verano

(Gráfico 2).

El gráfico 3 recoge los porcentajes totales de los serotipos más abundantes en 1991.

TABLA 1. SEROTIPOS MAYORITARIOS DEL GENERO SALMONELLA
AISLADOS EN ESPAÑA ENTRE 1980-1991.

	Enter	Typhm	Virch	Heide	Block	Agona	Ohio	Infn
1980	36,7	40,9	0,9	4,0	2,6	2,4	2,0	1,6
1981	35,9	37,5	0,6	6,1	3,5	1,9	0,9	2,1
1982	35,8	28,0	0,9	5,1	5,3	2,8	0,9	3,1
1983	43,0	21,6	0,5	3,3	2,9	0,2	5,8	4,2
1984	45,2	12,5	3,0	1,6	2,1	0,5	2,9	3,6
1985	61,7	13,1	3,1	0,7	0,9	0,2	2,7	1,8
1986	93,5	12,7	5,9	0,6	1,5	0,1	2,4	2,3
1987	63,4	8,3	6,9	0,2	1,2	0,5	1,8	0,9
1988	50,9	12,5	7,7	0,5	0,0	1,6	1,7	0,6
1989	48,6	14,1	6,6	0,1	0,6	1,6	0,1	2,3
1990	46,4	16,5	4,9	0,4	0,3	1,2	1,5	1,9
1991	44,0	21,1	5,8	0,3	0,1	0,5	1,6	1,0

Enter: **Enteritidis** / Typhm: **Typhimurium** / Virch: **Virchow**

Heide: **Heidelberg** / Block: **Blockley** / Infn: **Infantis**

Gráfico 1. SEROTIPOS MAS FRECUENTES DEL GENERO SALMONELLA AISLADOS EN ESPAÑA ENTRE 1980-1991

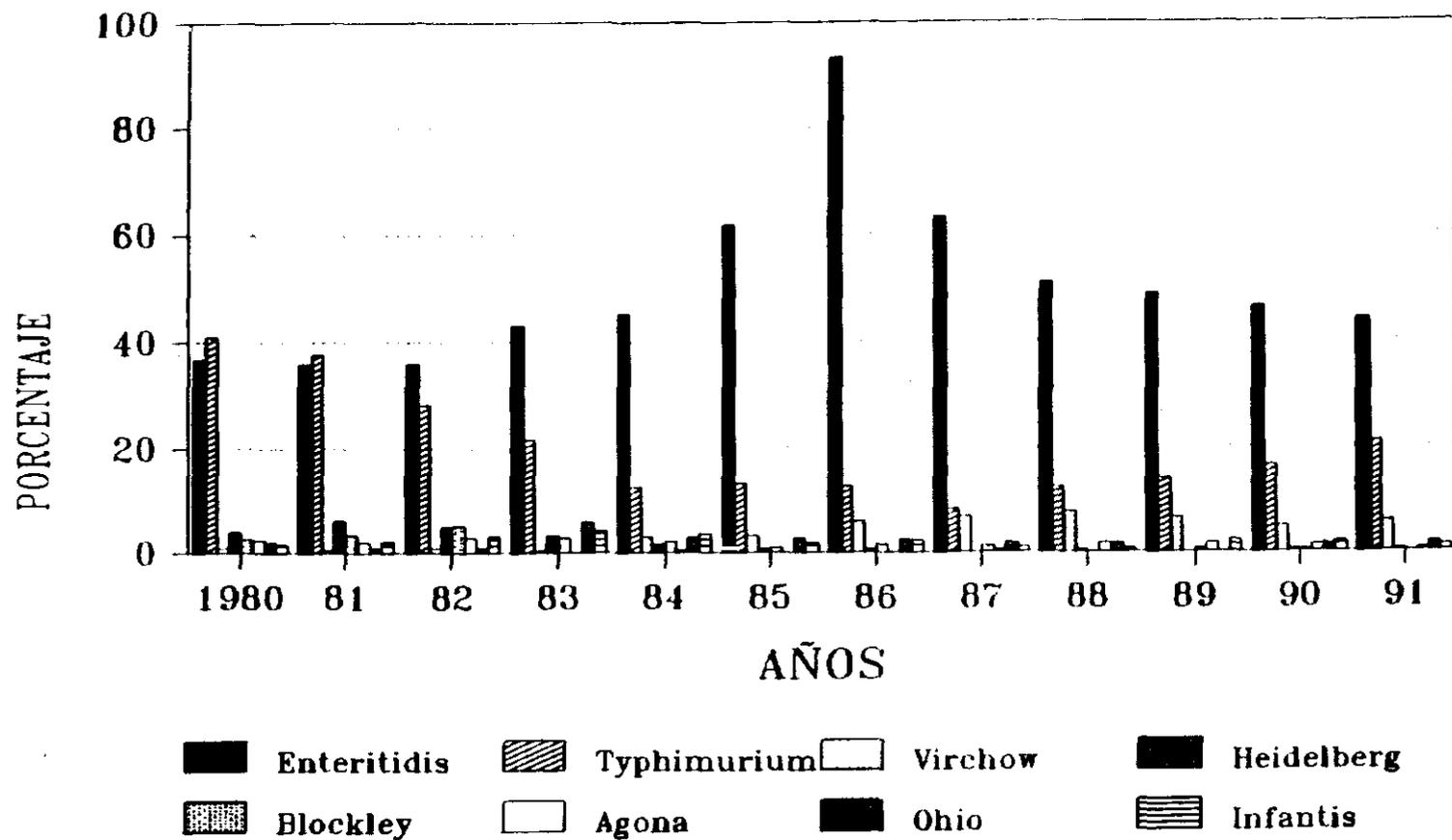
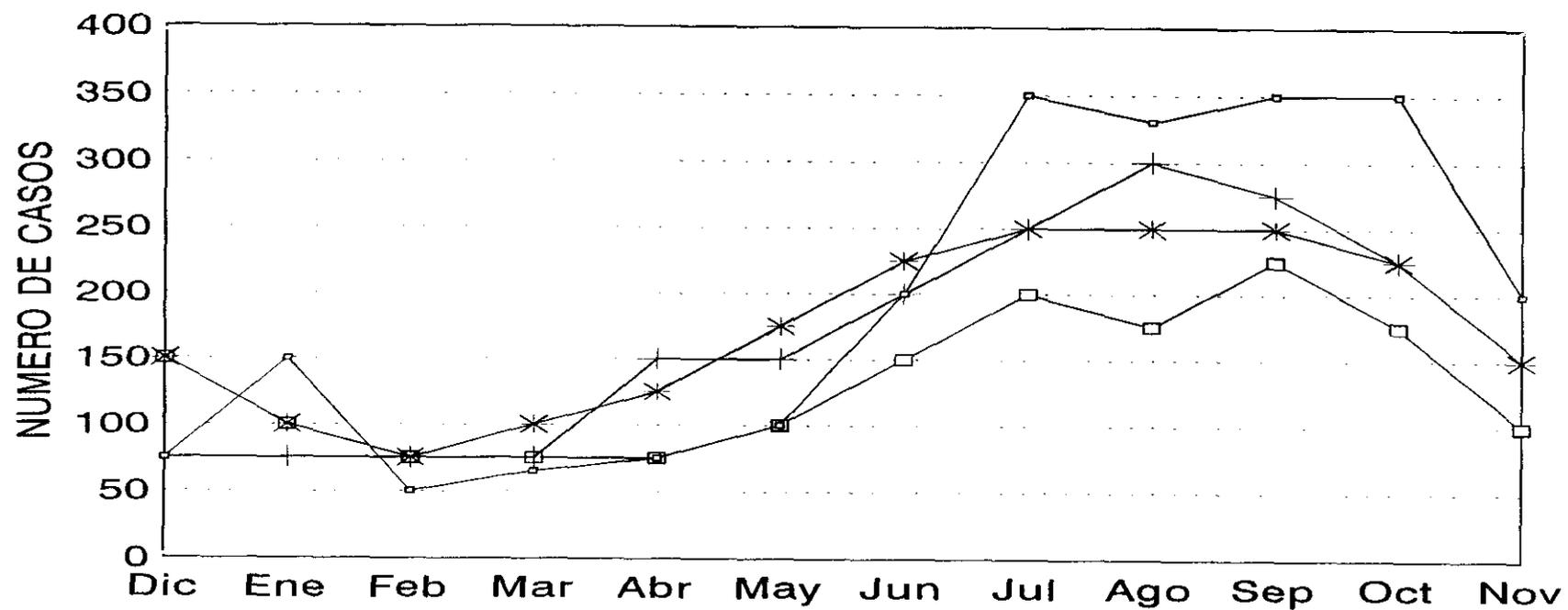
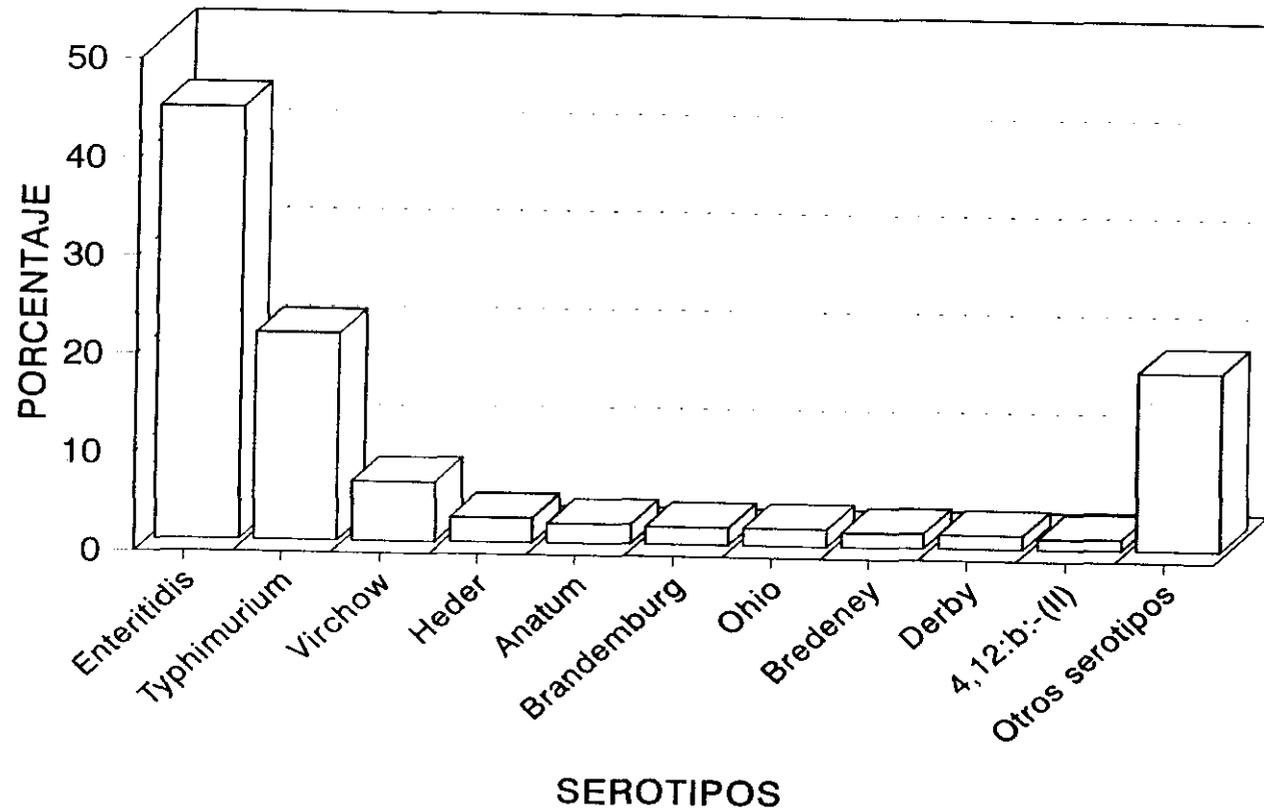


Gráfico 2. INFLUENCIA ESTACIONAL DE GASTROENTERITIS AGUDA POR SALMONELLA SEROTIPO ENTERITIDIS (1985-1988)



—○— 1985 + 1986 * 1987 —□— 1988

Gráfico 3. PORCENTAJES TOTALES DE LOS DIEZ SEROTIPOS MAS ABUNDANTES EN ESPAÑA



3 EL MICROORGANISMO: SALMONELLA ENTERICA SEROTIPO ENTERITIDIS.

La exposición del microorganismo Salmonella serotipo Enteritidis se hará, en este trabajo, de forma global con el resto de los serotipos que constituyen el género Salmonella, ya que este serotipo no presenta ninguna excepción a las características generales del género al que pertenece.

3.1 Posición taxonómica y nomenclatura.

Las bacterias que componen el género Salmonella fueron exhaustivamente estudiadas en la primera mitad de este siglo, lo que llevó a conferir a los distintos serotipos la categoría de especies (107). Esta situación atípica, objeto de controversias, condujo al equipo del profesor L. Le Minor a realizar, a principios de la década de los ochenta, un amplio estudio taxonómico basado en taxonomía numérica y en la homología ADN-ADN (91,92).

Para ello realizaron una selección de cepas representativas de los distintos subgéneros de Kauffmann (93) y de los principales serotipos y biotipos (94).

Los resultados obtenidos les llevaron a postular la existencia de una sola especie y 6 subespecies, añadiéndose posteriormente, en el año 1986, una séptima subespecie (95).

Por lo tanto, el serotipo perdió la categoría taxonómica de especie, que hasta entonces había tenido, concediéndosele a partir de entonces un valor como marcador epidemiológico, al igual que sucede con los distintos biotipos, fagotipos, etc.

En base a los trabajos anteriormente mencionados y a una modificación realizada en el año 1987 (94), la nomenclatura de las distintas subespecies queda de la siguiente forma:

- Salmonella enterica para la especie.
- Salmonella enterica, subespecie enterica, para la subespecie I.
- Salmonella enterica, subespecie salamae, para la subespecie II.
- Salmonella enterica, subespecie arizonae, para la subespecie IIIa.
- Salmonella enterica, subespecie diarizonae, para la subespecie IIIb.
- Salmonella enterica, subespecie heutanae, para la subespecie IV.
- Salmonella enterica, subespecie bongori, para la subespecie V.
- Salmonella enterica, subespecie indica, para la subespecie VI.

Según este criterio el serotipo se escribiría sin subrayar, empezando con una letra mayúscula. Ahora bien, debido al uso general de la nomenclatura antigua en los

trabajos anteriormente citados (94,95), se propone que, a efectos prácticos y para no complicar la nomenclatura actual, se mantengan los serotipos tradicionales precedidos por la palabra serotipo, como se indica en el siguiente ejemplo: Salmonella enterica, subespecie enterica, serotipo Enteritidis o Salmonella serotipo Enteritidis.

En un trabajo de 1989 Reeves et al. (95,98), basándose en estudios genéticos, proponen que la subespecie bongori sea elevada a la categoría de especie, quedando, por lo tanto, según dicho autor, en el género Salmonella dos especies: Salmonella enterica, con 6 subespecies, y Salmonella bongori.

3.2 Características generales y bioquímicas

Salmonella serotipo Enteritidis se encuentra dentro del género Salmonella y de la familia Enterobacteriaceae (96).

El género Salmonella está compuesto por bacterias Gram negativas (0,5-0,8 x 1 micras), no esporuladas, no capsuladas (salvo Salmonella serotipos Typhi, Paratyphi C y Dublin), normalmente móviles por flagelos peritricos (excepto Salmonella serotipo Gallinarum), aerobias o anaerobias facultativas. Crecen bien en medios ordinarios entre límites de pH 6-8, con temperatura óptima de 37,5°C. Crecen en colonias circulares (2-4µm de diámetro), planas, convexas y brillantes (96).

Pueden sobrevivir en el agua durante 2 ó 3 semanas y en aguas residuales entre 1 y 2 meses; en el hielo y en la nieve persisten viables más de 3 meses. En contraste, se destruyen rápidamente al pasteurizar la leche o clorar el agua y son sensibles a los desinfectantes habituales. El fenol al 5% las mata en 5 minutos (96).

Sus principales caracteres bioquímicos son:

Movilidad	+
Ureasa	-
Indol	-
SH ₂ en "TSI"	+
Lactosa	-

Citrato de Simmons	+
Rojo de metilo	+
Voges Proskauer	-
Fenilamina deaminasa	-
Lisín decarboxilasa	+
Arginín decarboxilasa	(+) ó +
KCN	-
Gelatina 22C	-
Malonato	-
Ornitín decarboxilasa	+
Producción de gas a partir de glucosa	+
Fermentación de la glucosa	+
Sacarosa	-
Manitol	+
Salicina	-
Adonitol	-
Dulcitol	d
Inositol	d
Sorbitol	+
Arabinasa	+
Rafinasa	-
Rhamnasa	+

d: diferentes tipos bioquímicos.

(+): positiva tardía.

3.3 Aislamiento e identificación.

El aislamiento e identificación de Salmonella serotipo Enteritidis se realiza, generalmente, a partir de coprocultivos (al igual que la mayor parte de los serotipos que constituyen el género Salmonella), por lo que se han ideado medios para evitar el crecimiento de la flora saprofita entérica y facilitar, de este modo, el desarrollo de los patógenos intestinales (11).

Si sólo existe la posibilidad de utilizar un único medio de enriquecimiento se suele emplear caldo GN (Gram negativos) para fines generales, aunque existen otros más específicos para cada uno de los diferentes géneros de enterobacterias. Uno de los más útiles es el tetracionato de Muller (al modificarle con sales biliares es medio de Kauffmann).

Los medios de aislamiento más frecuentemente usados para Salmonella son:

- Medios no inhibidores: agar sangre o agar nutritivo.
- Medios no inhibidores diferenciales: agar azul de bromotimol, agar lactosa rojo fenol.
- Medios de escasa selectividad: agar McConkey, agar eosina azul de metileno (EMB).
- Medios moderadamente selectivos: agar Salmonella - Shigella.
- Medios muy selectivos: agar sulfito de bismuto,

pero sólo para el serotipo Typhi, o agar verde brillante para salmonellas en general.

También es posible aislar salmonellas no sólo de heces sino de abscesos, orina y, en caso de bacteriemias, de sangre.

El hemocultivo normalmente da resultado positivo en la mayoría de los casos no tratados entre los 7 y los 10 primeros días de la enfermedad (11). La muestra debe ser tomada preferentemente en el período de subida de temperatura y deberá repetirse varias veces en el transcurso del día. La sangre se siembra en un medio nutritivo líquido o semisólido. Para pasos sucesivos se emplearán frascos de Castañeda donde se asocia medio líquido y medio sólido.

La población de bacterias presentes en sangre es normalmente pequeña, de 10 a 20 ufc/ml, por lo que es conveniente sembrar una cantidad igual o mayor que esta.

Otra posibilidad es aislar la bacteria a partir de un coágulo que se obtiene de la muestra de sangre extraída. Es necesario lisar dicho coágulo mediante estreptoquinasas o por la bilis del medio de tetracionato (medio de Muller-Kauffmann) (97).

Tras el aislamiento del germen, las colonias sospechosas se siembran en medios de identificación bioquímica (96).

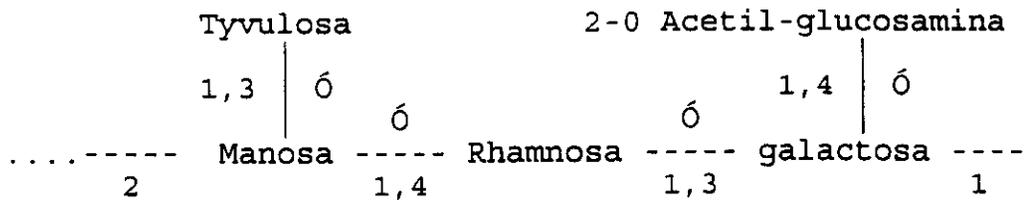
3.4 Estructura antigénica

El género Salmonella tiene tres clases de antígenos utilizados como marcadores epidemiológicos y que dan lugar a los distintos serotipos. Estos son: los antígenos somáticos "O", los antígenos flagelares "H" y el antígeno capsular "Vi" (99).

En Salmonella serotipo Enteritidis dichos antígenos tienen las siguientes características:

*** Antígeno somático "O":**

Es un antígeno termoestable, complejo, de naturaleza lipopolisacaróidea (LPS). Las moléculas, según Luderitz (100), se pueden dividir en tres regiones (I, II y III). La región III corresponde al lípido A, principal determinante de la toxicidad del LPS. La región II es de naturaleza polisacárida y muy similar en todas las salmonellas. La región I ha sido estudiada con mucho detenimiento en los últimos años, es de naturaleza polisacárida, es variable y responsable de la especificidad de los antígenos somáticos. Esta región, según Jann (101), es como se indica en el esquema siguiente:



La presencia del antígeno somático se detecta por técnicas de aglutinación en tubo, porta o microaglutinación.

Los antígenos somáticos se ven sometidos a fenómenos que cambian la estructura del LPS (102). La variación Lisa-Rugosa es la más importante (103). Es una variación que sucede en todas las salmonellas y se debe a mutaciones que bloquean diferentes pasos en la síntesis de la cadena polisacárida, tanto en la región I como en la región II.

Existen otras variaciones que son:

- S → T → R (93)
- Variación inducida por bacteriófagos (104).

Se conocen, dentro del género Salmonella, 67 factores antigénicos "O" distintos. Se les puede clasificar en:

- Factores antigénicos mayores o de grupo: Estos factores tienen un alto poder discriminatorio. Su estudio permite clasificar las salmonellas en grupos (A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, ...). Salmonella

serotipo Enteritidis pertenece al grupo D₁.

- Factores antigénicos menores o accesorios: De escaso poder discriminatorio, suelen ir asociados a uno o varios factores antigénicos mayores.

Los antígenos somáticos del serotipo Enteritidis son 1, 9 y 12. El antígeno 1 puede, en ocasiones, no existir (105).

*** Antígenos flagelares "H":**

Los flagelos son peritricos y tienen estructura compleja, formada por un cuerpo basal, cuello y filamentos. La especificidad antigénica reside en determinadas proteínas del filamento, llamadas flagelinas, cuyo peso molecular varía entre 51.000 y 57.000. La flagelina está formada por monómeros que se repiten y tienen una parte común y una parte variable. Se cree que es en la parte variable donde reside la capacidad antigénica flagelar.

En la práctica, la detección de los antígenos flagelares se hace por aglutinación en porta, tubo o microcápsula a partir de una suspensión de gérmenes muy móviles. La aglutinación es rápida, reversible y tiene un aspecto flocular.

Los antígenos flagelares "H" tienen dos características especiales (106):

- Ciertos tipos de Salmonella sólo pueden fabricar flagelos de una sola especificidad. El antígeno "H", en este caso, se llama monofásico. En este grupo está incluido el serotipo Enteritidis.
- La mayor parte de los serotipos de Salmonella están capacitados para expresar alternativamente dos especificidades de su antígeno "H". En este caso el antígeno se llama difásico.

La variación más importante que sufre el antígeno "H" en el género Salmonella es la variación de cambio de fase. Muchos de los serotipos de este género tienen dos fases (I y II) y otros poseen una sola. Las cepas que tienen dos fases representan en su genoma la información para ambas fases; sin embargo, cada bacteria sólo expresa una de ellas, pudiendo revertir una en otra. La fase I revierte en la fase II una vez cada 1.000 ó 10.000 divisiones. La fase II revierte en la fase I con una frecuencia menor.

En orden a los antígenos somático y flagelares, Kauffmann-White han establecido un esquema para los

distintos serotipos de Salmonella que se han descubierto hasta hoy (4).

Salmonella serotipo Enteritidis, como ya se ha mencionado, sólo posee la fase I de su antígeno "H" (es un antígeno "H" monofásico). Su esquema antigénico con respecto a H es:

gm: -

gm: antígeno "H" de fase I.

-: no posee antígeno "H" de fase II.

*** Antígeno capsular:**

Salmonella serotipo Enteritidis carece de él.

Es un antígeno poco frecuente en salmonelas. Sólo presentan antígeno capsular 3 serotipos: Typhi, Dublin y Paratyphi C.

3.5 Marcadores epidemiológicos

Los marcadores epidemiológicos usados para el estudio de Salmonella serotipo Enteritidis se aplican también para el estudio de otros serotipos.

Le Minor diferencia los marcadores epidemiológicos para Salmonella en mayores y menores (108). Los mayores vienen determinados por genes cromosómicos. Estos determinan la especie, subespecie y serotipos. El más importante es la serología. Los menores son aquellos que están afectados por replicones extracromosómicos o no tienen la suficiente estabilidad genética; se utilizan para dividir los serotipos. Estos son: biotipia, auxotipia, patrones electroforéticos de isoenzimas, sensibilidad a antimicrobianos, fagotipia, bacteriocinotipia, perfiles plasmídicos, etc.

En cuanto a los mayores pocas novedades han aparecido en los últimos años, a excepción de la nueva nomenclatura anteriormente citada, diferenciándose las especies por algunas características bioquímicas (109).

3.5.1 Serotipia.

Es una técnica tradicionalmente empleada en el estudio de las salmonelas, debido a que en ella confluyen las propiedades básicas de todo marcador epidemiológico (4), como son:

- Buena sensibilidad.
- Estabilidad.
- Reproducibilidad.
- Alto poder discriminatorio.

Kauffmann (93) fue principalmente quien desarrolló este marcador y, gracias a él, hoy en día se pueden distinguir un número mayor a 2.300 serotipos diferentes.

Son numerosos los trabajos publicados sobre el origen y distribución mundial de los distintos serotipos (90,110).

El fundamento de la serotipia radica en la detección de aquellos antígenos esenciales del microorganismo y que habitualmente forman parte de sus estructuras exteriores. La serotipia se realiza con sueros obtenidos a partir de conejos inoculados, teniéndose que realizar a veces absorciones para eliminar las reacciones cruzadas que pudieran existir.

Las técnicas de serotipia más utilizadas son: la aglutinación en porta, en tubo y una variante de ésta que es la aglutinación en microplaca.

La serotipia determina la estructura antigénica de la bacteria que, atendiendo al esquema de Kauffmann-White (93), nos dará el serotipo buscado.

Por último, solo cabría destacar que, según Le Minor (108), el 99,7% de las cepas de Salmonella de origen humano pertenecen a los serotipos de la subespecie I, en la cual está incluido el serotipo Enteritidis.

3.5.2 Resistencia a antimicrobianos.

La antibiología es una técnica de marcaje que consiste en la detección de resistencias de los microorganismos a distintos antimicrobianos, pudiendo establecer diferencias dentro de un mismo serotipo.

La resistencia puede tener dos orígenes:

- No genético: Por pérdida de receptores específicos o simplemente porque el germen es fenotípicamente resistente a un medicamento.
- Genético: Por resistencia cromosómica, debido a una mutación espontánea y por resistencia extra-cromosómica, por plásmidos del citoplasma o del cromosoma bacteriano.

Las salmonellas presentan, con mucha frecuencia, una resistencia en bloque a la ampicilina, estreptomina, kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina.

La resistencia a antimicrobianos puede ser de gran utilidad como marcador epidemiológico complementario, sobre todo en los casos en que los marcadores epidemiológicos tradicionales no aporten la suficiente discriminación (111,112).

3.5.3 Marcadores moleculares.

3.5.3.1 Plasmidotipia.

Es un marcador epidemiológico que se basa en la tipificación de cepas mediante la obtención y caracterización de plásmidos (113,114).

Los plásmidos, en ocasiones, portan genes que confieren nuevas propiedades al huésped. Los plásmidos más conocidos son:

- Factores sexuales.
- Factores col.
- Plásmidos metabólicos.
- Plásmidos de resistencia.
- Plásmidos degradantes.
- Plásmidos de virulencia.

La técnica de la plasmidotipia se basa en la detección y caracterización de los plásmidos atendiendo a su peso molecular y migración electroforética en geles de agarosa.

Los métodos más utilizados para la extracción plasmídica son:

- Kado y Liu (115).
- Birboim y Doly (116).

Una modificación del método de Kado y Liu es el propuesto por Nakamura y Sato (117). Es una técnica descrita fundamentalmente para Salmonella Enteritidis.

En el Laboratorio de Enterobacterias del C.N.M.V.I.S. se hizo un trabajo sobre contenido plasmídico de cepas de Salmonella Enteritidis (118), encontrándose 8 perfiles plasmídicos diferentes (Tabla 2). Se vio que en el 80% de los casos aislados estudiados y en el 61,5% de los brotes aparecía un plásmido de 36 Md (corresponde al perfil I).

TABLA 2. PERFILES PLASMIDICOS EN CEPAS DE SALMONELLA SEROTIPO ENTERITIDIS. PORCENTAJES EN CASOS AISLADOS Y BROTES.

Perfiles plasmídicos	Contenido plasmídico (Mda)	Casos aislados (%)	Brotos (%)
I	36	80	61.5
II	36;2.6;1.2	10	7.7
III	36;3.9;2.4	4	7.7
IV	5.3;3.3	0	7.7
V	36;1.8;1.2	0	7.7
VI	55;36;22;5.5	2	0
VII	36;1.8	2	0
VIII	36;1.2	2	0

3.5.3.2 Patrones de fragmentos de ADN cortados con endonucleasas de restricción.

Pueden aplicarse sobre ADN plasmidico y sobre ADN cromosómico de las cepas que se desean estudiar (119,120,121).

Estudios realizados por Chart (122) demuestran que determinadas cepas de Salmonella serotipo Enteritidis (cepas fagotipo 4 por el esquema de fagotipia de L.R. Ward (153)) se encuentran en posesión, casi en su totalidad, de un plásmido de 36 Md que les confiere especial virulencia.

Existen trabajos preliminares hechos con endonucleasas sobre ADN cromosómico de cepas de Salmonella serotipo Enteritidis, en los que se ha observado que tales cepas tenían prácticamente el mismo patrón de restricción (123).

3.5.3.3 Ribotipia.

Se basa en el estudio de los patrones de restricción de los genes de ARN ribosómico. Es una técnica estable y reproducible pero que hasta la actualidad se ha aplicado tan solo a unos pocos serotipos de Salmonella, pudiendo ser utilizada como marcador complementario de otros marcadores epidemiológicos (124).

3.5.4 Patrones electroforéticos de isoenzimas.

Reeves y cols.(125) y Selander y cols.(126) han realizado estudios de patrones electroforéticos de enzimas de Salmonella serotipo Typhi, demostrando que las cepas estudiadas provenientes de distintas partes del mundo proceden de un solo clon, según Reeves, o dos clones, según Selander, lo cual, aunque es muy interesante filogenéticamente, es poco útil como marcador epidemiológico.

3.5.5 Fagotipia.

La fagotipia es un sistema de marcaje que se basa en la tipificación de cepas por medio de bacteriófagos (137).

De todos los marcadores epidemiológicos expuestos anteriormente éste es el mas utilizado para subdividir serotipos del género Salmonella.

3.5.5.1 Bacteriófagos.

Los bacteriófagos son virus que infectan a las bacterias. Están compuestos por cabeza y cola. La cabeza contiene el ácido nucleico, rodeado de una cubierta proteica o cápside, la cual está formada por subunidades idénticas agrupadas para formar una estructura prismática. El diámetro

de la cabeza oscila entre 25 μ m en los pequeños y 100x70 μ m en los grandes. La cola suele ser larga y flexible, monocontráctil (T5) o rígida contráctil (T4,P2...). Es el órgano de unión a la bacteria. Su composición no es muy conocida. Su estructura es generalmente proteica (128,140,141). Generalmente, el receptor de la bacteria se encuentra en el lipopolisacárido del antígeno O (128).

Existen, fundamentalmente, dos tipos de bacteriófagos:

- Salvajes o silvestres: Se encuentran en la naturaleza. Dentro de éstos existe una variedad que son los bacteriófagos adaptados. Estos últimos son específicos para un tipo determinado de Salmonella. Se pensó, en un principio, que éstos eran mutadores de la célula huésped, pero más tarde se vio que eran los propios fagos los que sufrían modificaciones al ser enfrentados en varias ocasiones a una misma cepa, de forma que se hacían activos frente a cepas que en un principio no lisaban (130,131,132).

- Lisogénicos: Forman parte de la estructura genética de la bacteria. La situación de lisogenia es una forma especial de interacción virus-huésped, basada en la asociación íntima del ADN vírico y bacteriano. Existe un entrecruzamiento entre el ADN del virus y el ADN bacteriano,

empleando el mismo mecanismo de rotura y recombinación observado en la recombinación genética. Sólo presentan poder lítico frente a su célula huésped si sufren algún tipo de modificación genética.

El esquema 1 representa la estructura de un bacteriófago. El esquema 2 representa el mecanismo de inserción-recombinación de un bacteriófago lisogénico con su célula huésped.

3.5.5.2 Ciclo del bacteriófago y del huésped.

La absorción e infección de la bacteria por el bacteriófago consta de varias etapas (140,141):

- A.- Interacción
- B.- Fijación
- C.- Penetración
- D.- Salida del bacteriófago

El esquema 3 representa el ciclo del bacteriófago y el huésped.

3.5.5.3 Esquemas de Fagotipia.

Un esquema de fagotipia consta de un juego de bacteriófagos y de una serie de fagotipos resultantes de la acción de estos bacteriófagos sobre un grupo de cepas que se desea tipar.

En relación al tipo de bacteriófagos usados, existen varios modelos de esquemas de fagotipia (129):

- A.- Sistema de fagotipia formado por bacteriófagos salvajes y un número de bacteriófagos derivados de los salvajes por adaptación (130).
- B.- Sistema de fagotipia formado por bacteriófagos salvajes, sus adaptados y lisogénicos (134,142).
- C.- Sistema formado por bacteriófagos silvestres y lisogénicos (133).
- D.- Sistema formado por bacteriófagos lisogénicos (134,135,136).

Existen esquemas de fagotipia desarrollados para determinados serotipos de Salmonella (138). Los esquemas internacionalmente establecidos son para los serotipos Typhi, Paratyphi A y B y Typhimurium (139).

Los trabajos de Felix y Craigie sobre desarrollo de esquemas de fagotipia condujeron a la formación del Comité Internacional para Fagotipia de Patógenos Entéricos (IFEPT), que nombró como Laboratorio Internacional de Referencia a la División de Patógenos Entéricos de Colindale, Londres (127).

En nuestro Laboratorio, en 1987 se desarrolló un esquema de fagotipia para Salmonella serotipo Enteritidis (133). Su uso es exclusivamente local. Aunque presenta una alta tipabilidad, su poder discriminatorio es bajo, siendo necesario mejorarlo.

3.5.5.4 Técnicas de Fagotipia.

Existen, fundamentalmente, dos técnicas de fagotipia:

- Directa: Consistente en el aislamiento de bacteriófagos salvajes de la naturaleza y su posterior aplicación a un conjunto de cepas que se desean estudiar.

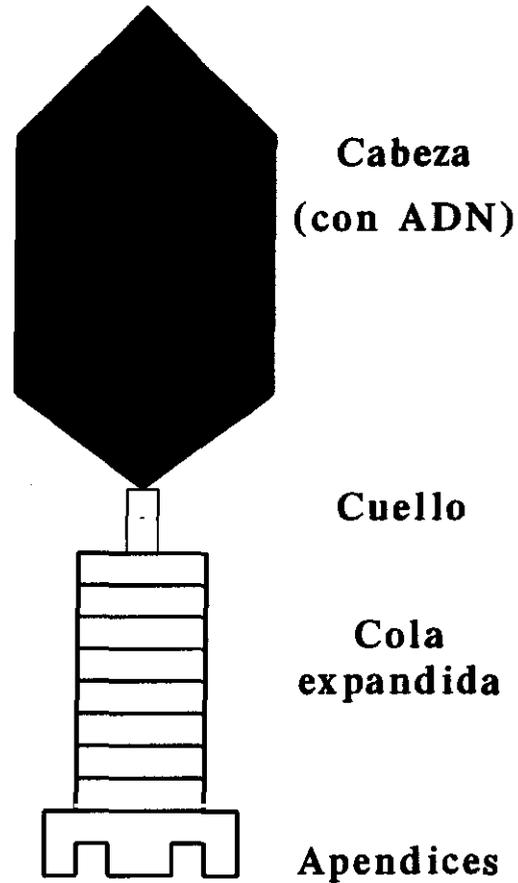
- Indirecta: Consistente en la inducción de bacteriófagos de las propias cepas y, una vez transformados en líticos, formar con ellos un juego de fagotipia para las cepas a estudiar.

El esquema 4 representa las técnicas de la fagotipia

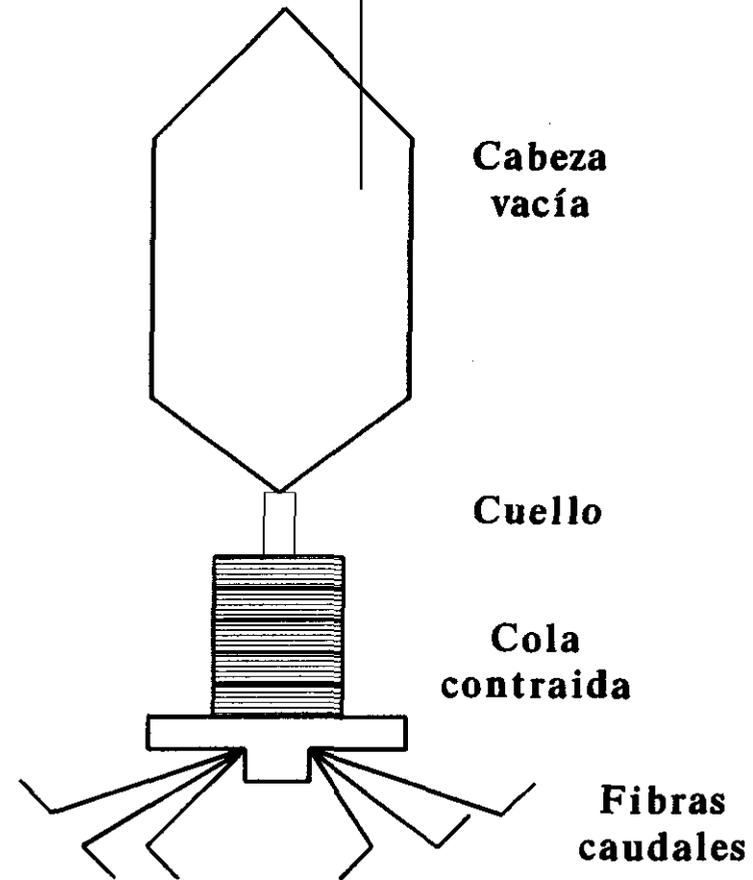
directa (juego de bacteriófagos silvestres) y la fagotipia indirecta (juego de bacteriófagos lisogénicos).

Esquema 1. ESTRUCTURA DE UN BACTERIOFAGO

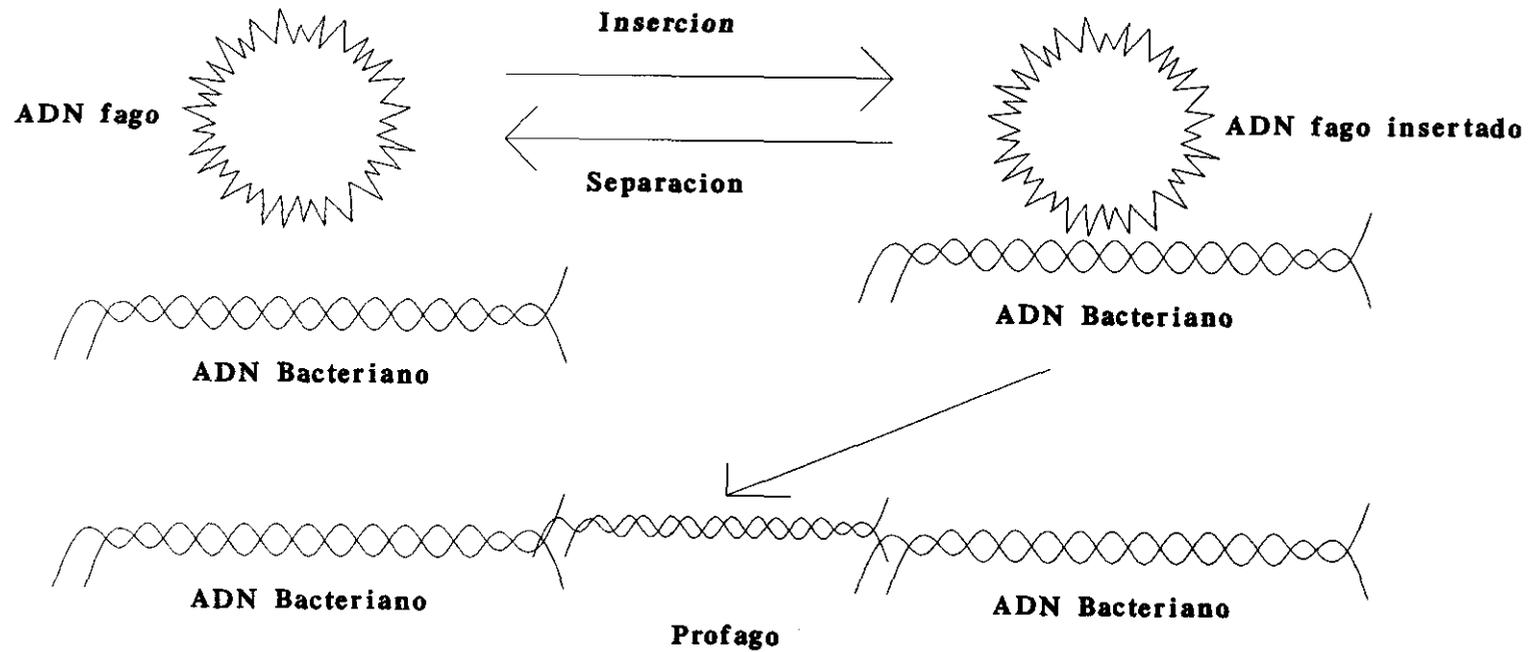
Fago Activo : 1er. Estado



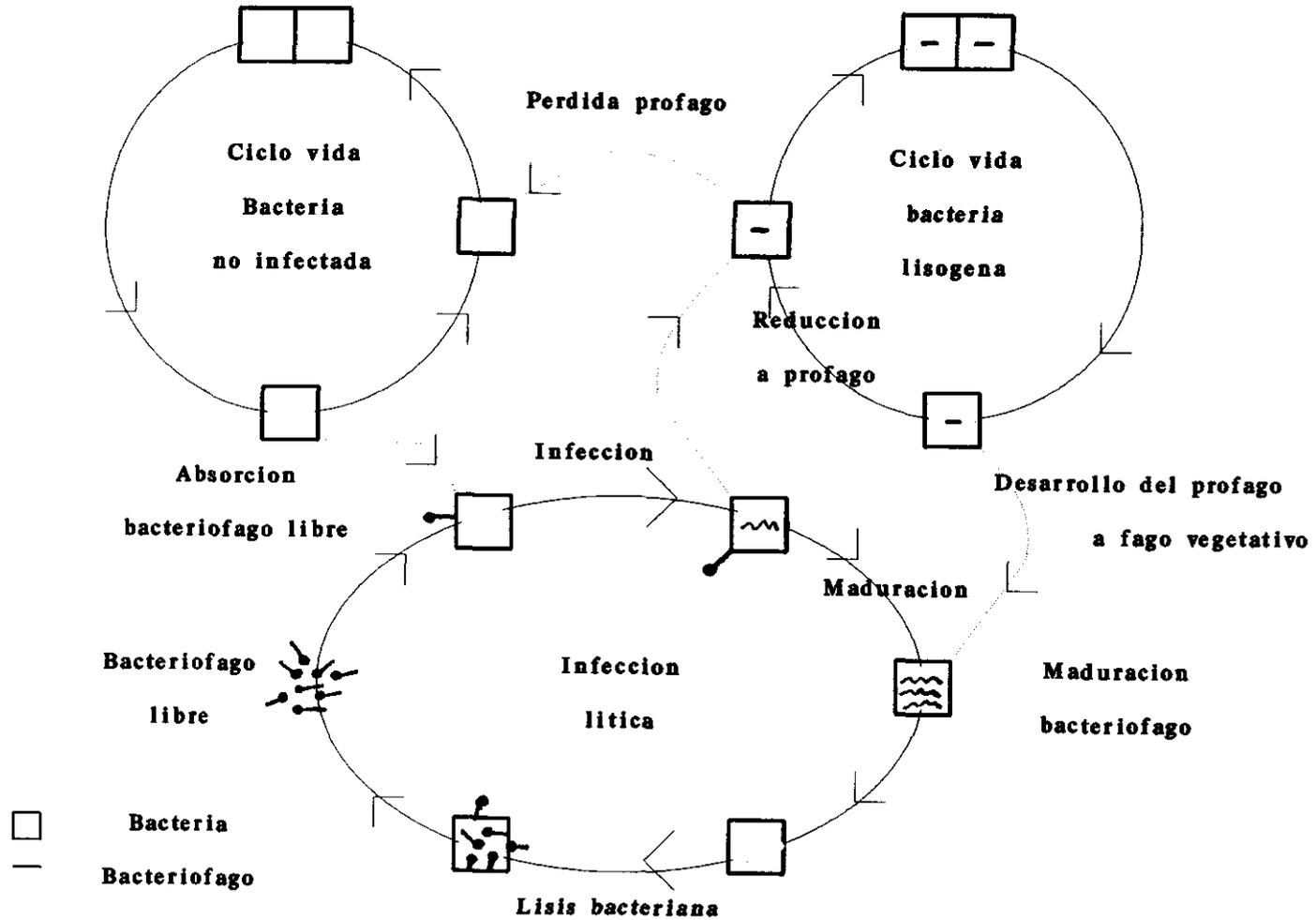
Fago Inactivo: 2º Estado



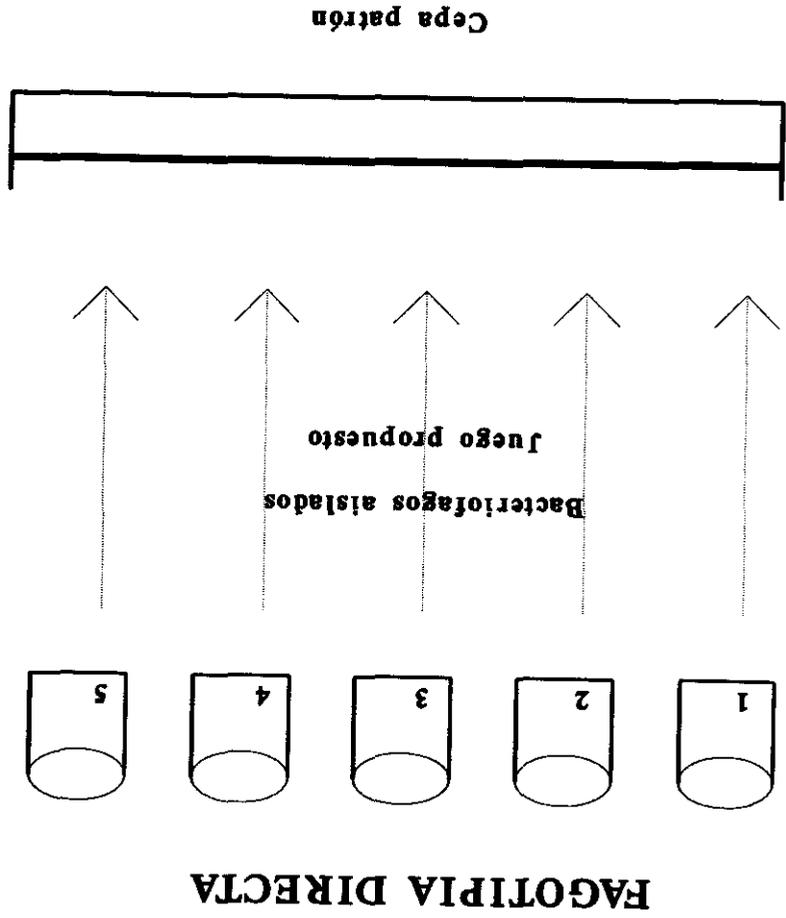
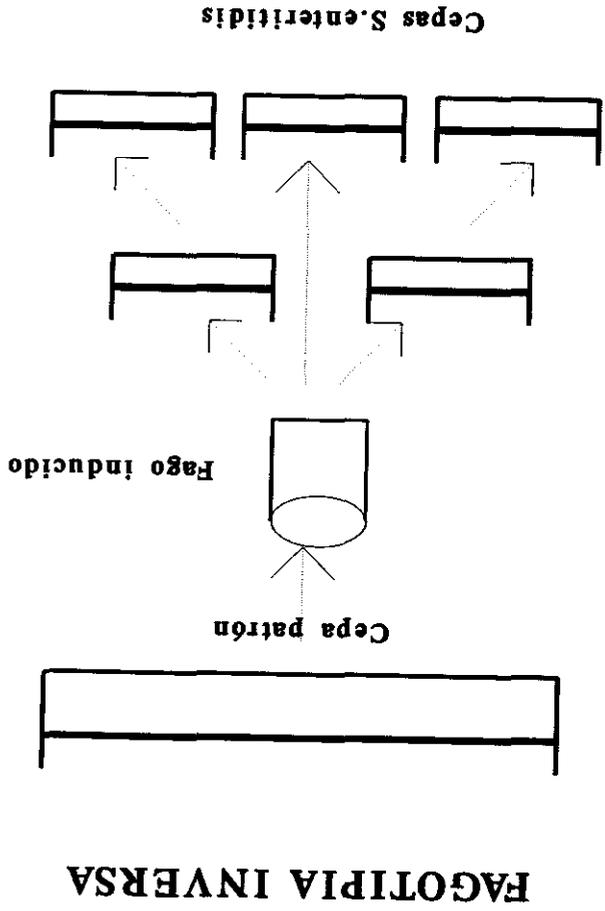
Esquema 2. MECANISMO INSERCIÓN RECOMBINACIÓN DE UN BACTERIOFAGO LI SOGENICO



Esquema 3. CICLO BACTERIOFAGO-HUESPED



Esquema 4. TECNICAS DE FAGOTIPIA



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El elevado número de toxiinfecciones alimentarias en España producidas por Salmonella y, dentro de este género, la supremacía de los aislamientos del serotipo Enteritidis, unido a la falta de marcadores epidemiológicos homologados internacionalmente para este serotipo, nos ha llevado a la configuración de un nuevo marcador epidemiológico complementario para este serotipo, con el fin de mejorar la vigilancia epidemiológica y el control de la Salmonelosis producida por Salmonella serotipo Enteritidis.

OBJETIVOS COMPLEMENTARIOS

- 1.- Búsqueda, aislamiento y selección de bacteriófagos silvestres líticos frente a Salmonella serotipo Enteritidis, aislados de aguas residuales de distintas zonas geográficas de España.
- 2.- Búsqueda, aislamiento y selección de bacteriófagos lisogénicos en cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.
- 3.- Ampliación y desarrollo del esquema de fagotipia autóctono (133), elaborado en el Laboratorio de Enterobacterias del C.N.M.V.I.S. en trabajos anteriores, aportando nuevos bacteriófagos salvajes y lisogénicos previamente seleccionados.

- 4.- Evaluación de otros esquemas de fagotipia de Salmonella serotipo Enteritidis autóctonos de otros países y de otros microorganismos con características semejantes a este, para su posible aplicación en cepas de este serotipo aisladas en España, así como la posible incorporación de algún bacteriófago de estos esquemas al nuestro.

- 5.- Aplicación del nuevo esquema de fagotipia autóctono una vez configurado en cepas de Salmonella serotipo Enteritidis para comprobar su poder discriminatorio.

- 6.- Aplicación del nuevo esquema de fagotipia autóctono a brotes de gastroenteritis ocasionados por una toxiinfección alimentaria producida por cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.

- 7.- Evaluación de la eficacia de la fagotipia como marcador epidemiológico complementario para cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.

MATERIAL

Y

METODOS

1 MUESTRAS DE AGUA.

1.1 Origen de las muestras de agua.

Las muestras de agua fueron el material de aislamiento de bacteriófagos salvajes. Dichas muestras procedían de:

- Aguas residuales.
- Aguas estancadas.
- Aguas de entrada y salida de depuradoras.
- Aguas contaminadas de superficies (rios, lagos, mar etc).

Fueron remitidas por laboratorios de Microbiología de diferentes provincias Españolas, que habitualmente envían cepas de Salmonella a nuestro laboratorio para su estudio.

La recogida y envío de las muestras de agua se hizo siguiendo un protocolo que les fue remitido. Dicho protocolo se detalla a continuación:

PROTOCOLO DE RECOGIDA Y ENVIO DE MUESTRAS DE AGUA:

1.- Puntos de recogida:

- Aguas fecales de colectores de salidas de alcantarillado.
- Aguas fecales de entradas y/o salidas de depuradoras.

- Aguas de regadío.
- Aguas estancadas.

2.- Toma de la muestra:

- Tomar dos litros de agua de dos puntos de recogida diferentes.
- En cada frasco, anotar en la etiqueta el lugar de recogida.
- Conservar en nevera (4°C) hasta el momento del envío.

3.- Envío de la muestra:

- Remitir a nuestro laboratorio, en un plazo no superior a tres días desde la fecha de recogida.
- Enviar por correo ordinario.

1.2 Selección de las muestras de agua.

De todas las muestras de agua recibidas se hizo una selección, basada fundamentalmente en:

- Calidad de la muestra.
- Diversidad geográfica.
- Distintos orígenes de recogida de la muestra.

Se seleccionaron finalmente 16 muestras procedentes de 8 provincias españolas. Esta selección viene reflejada en la

tabla 3.

TABLA 3. MUESTRAS DE AGUA SELECCIONADAS PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS SALVAJES.

LOCALIDAD	PUNTOS DE RECOGIDA
Burgos	Entrada depuradora
	Alcantarillado urbano
Canarias	Alcantarillado urbano
	Agua de mar
Guadalajara	Alcantarillado urbano (Guadalajara capital)
	Alcantarillado urbano (Humanes de Mohernando)
La Rioja	Salida depuradora
	Entrada depuradora
Murcia	Alcantarillado urbano
	Entrada depuradora
Palma de Mallorca	Alcantarillado urbano
	Entrada depuradora
Pamplona	Salida hospital
	Salida depuradora Pamplona
Vizcaya	Entrada depuradora (Vertido urbano + agrícola)
	Entrada depuradora (Vertido urbano + industrial)

2 CEPAS DE SALMONELLA SEROTIPO ENTERITIDIS.

2.1 Procedencia y origen de las cepas.

Las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis seleccionadas para este trabajo proceden de la colección de cepas de Salmonella existente en el Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología Virología e Inmunología Sanitarias (C.N.M.V.I.S.) del Instituto de Salud Carlos III. Las cepas son remitidas periódicamente por distintos laboratorios de Microbiología de toda España para su estudio.

Todas las cepas seleccionadas fueron de origen humano. Se aislaron de heces de personas afectas de un proceso de gastroenteritis por Salmonella serotipo Enteritidis o de portadores asintomáticos de la enfermedad.

2.2 Distribución de las cepas en grupos.

Se seleccionaron un total de 1.706 cepas de Salmonella serotipo Enteritidis, pertenecientes a cinco grupos. Estos son:

- GRUPO PRIMERO: Formado por 50 cepas de Salmonella serotipo Enteritidis elegidas entre todas las cepas de este serotipo existentes en el Laboratorio de

Enterobacterias del C.N.M.V.I.S. Estas cepas se seleccionaron atendiendo a la máxima diversidad geográfica y fecha de aislamiento de la muestra, entre 1981 y 1991 (Tabla 4).

- GRUPO SEGUNDO: formado por 100 cepas seleccionadas con el criterio del grupo anterior. Son cepas asimismo pertenecientes a la colección existente en el Laboratorio de Enterobacterias del C.N.M.V.I.S. Su distribución geográfica viene representada en el Mapa 1.
- GRUPO TERCERO: formado a su vez por dos subgrupos:
 - SUBGRUPO A: Formado por 9 cepas de Salmonella serotipo Enteritidis correspondientes, cada una de ellas, a los 9 fagotipos del esquema autóctono (133), elaborado en estudios previos en el Laboratorio de Enterobacterias del C.N.M.V.I.S. Este grupo viene representado en la Tabla 5.
 - SUBGRUPO B: Formado por 5 cepas de Salmonella serotipo Enteritidis no fagotipables por el juego autóctono (133). En la Tabla 6 viene representado dicho grupo.
- GRUPO CUARTO: formado por 1500 cepas de Salmonella serotipo Enteritidis seleccionadas de la colección de aislados de este serotipo del Laboratorio de

Enterobacterias del C.N.M.V.I.S. Se eligieron atendiendo a los mismos criterios aplicados para el grupo primero. Este grupo incluye las cepas pertenecientes al segundo grupo. El Mapa 2 recoge la distribución geográfica de este cuarto grupo.

- GRUPO QUINTO: formado por 42 cepas pertenecientes a 8 brotes de gastroenteritis por Salmonella serotipo Enteritidis tras una toxiinfección alimentaria. Los brotes fueron numerados correlativamente del 1 al 8. Este grupo viene reflejado en la Tabla 7.

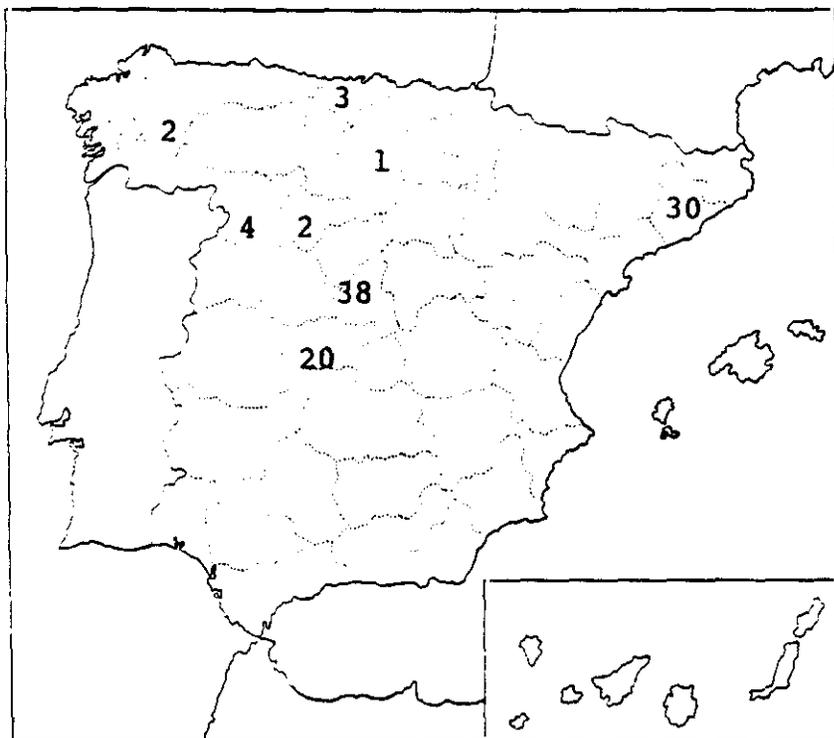
TABLA 4. GRUPO PRIMERO. DATOS EPIDEMIOLOGICOS.

N° CEPA	AÑO AISLA- MIENTO	PROCEDENCIA GEOGRAFICA	ORIGEN HUMANO		
			ENFERMO O PORTADOR	EDAD	BROTE O CASO AISLADO
78041	1985	Madrid	Enfermo	34	Aislado
78099	1985	Madrid	Enfermo	15	Aislado
78299	1985	Barcelona	Enfermo	6 m	Aislado
78863	1985	Zaragoza	Enfermo	38	Aislado
78881	1985	Barcelona	Enfermo	20	Aislado
79133	1985	Alicante	Enfermo	2	Aislado
79279	1985	Toledo (Talavera)	Enfermo	2	Aislado
79649	1985	Madrid	Enfermo	NC	Aislado
79672	1985	Barcelona	Enfermo	42	Aislado
79678	1985	Madrid	Enfermo	45	Aislado
80041	1986	Vitoria	Enfermo	9	Aislado
80048	1986	Madrid	Enfermo	15	Aislado
80063	1986	Málaga	Enfermo	NC	Aislado
80238	1986	Barcelona	Enfermo	NC	Aislado
80253	1986	Asturias (Avilés)	Enfermo	2	Aislado
80371	1986	La Rioja	Enfermo	32	Aislado
80441	1986	Gerona	Enfermo	NC	Aislado
80523	1986	Barcelona	Enfermo	8	Aislado
80544	1986	Zaragoza	Portador	NC	Aislado
86946	1986	Madrid (Fuenlabrada)	Portador	NC	Aislado
88158	1986	Barcelona	Enfermo	22	Aislado
88523	1986	Barcelona	Enfermo	NC	Aislado
88736	1986	Madrid	Enfermo	9	Aislado
88825	1986	Zaragoza	Enfermo	NC	Aislado
89015	1986	Guadalajara	Enfermo	35	Brote

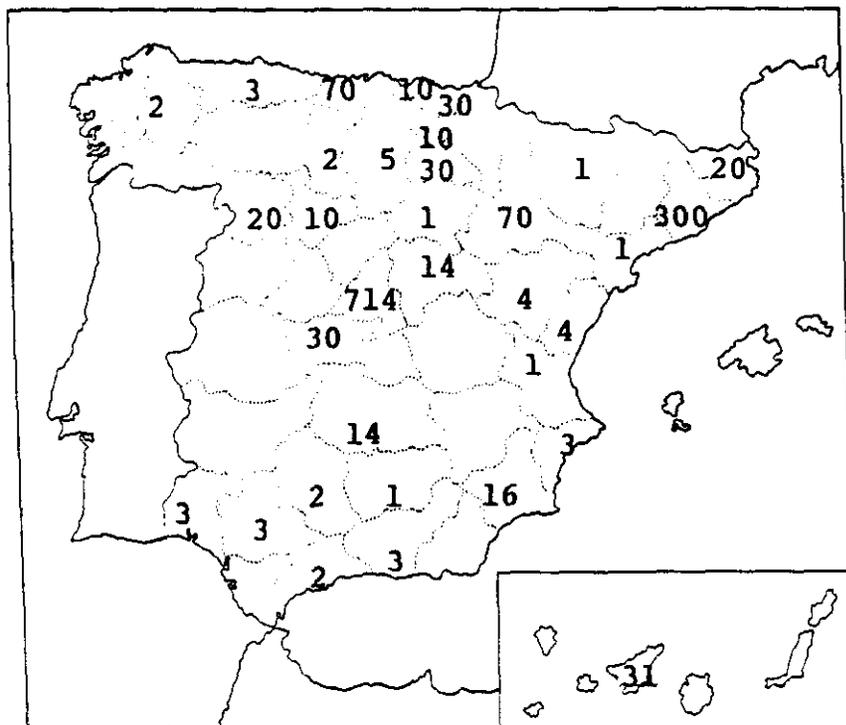
89022	1986	Toledo (Talavera)	Enfermo	NC	Brote
89031	1986	Pamplona	Enfermo	5	Aislado
89033	1986	Zamora	Enfermo	9	Aislado
89043	1986	Alicante	Enfermo	NC	Aislado
89193	1986	Barcelona (Tarrasa)	Portador	NC	Brote
89328	1986	La Rioja	Enfermo	20 m	Aislado
89354	1986	Granada	Portador	NC	Brote
89459	1986	Zaragoza	Enfermo	NC	Aislado
89460	1986	Madrid (Majadahonda)	Enfermo	5	Aislado
89468	1986	Castellón	Enfermo	Lac.	Aislado
89469	1986	Teruel	Enfermo	Lac.	Aislado
89542	1986	Gerona	Enfermo	14	Aislado
89595	1986	Valladolid	Enfermo	NC	Aislado
2	1987	Madrid	Enfermo	69	Aislado
5	1987	Barcelona	Enfermo	NC	Aislado
15	1987	Toledo (Talavera)	Enfermo	6 m	Aislado
19	1987	Zaragoza	Portador	NC	Aislado
35	1987	Zaragoza	Portador	22 m	Aislado
38	1987	Málaga	Enfermo	NC	Brote
136	1987	Zamora	Enfermo	20	Brote
145	1987	Vizcaya (Galdakano)	Enfermo	35	Brote
311	1987	Barcelona (Granollers)	Enfermo	NC	Aislado
361	1987	Logroño	Enfermo	5	Aislado
406	1987	Zaragoza	Enfermo	5	Aislado
613	1987	Pamplona	Enfermo	4	Aislado

NC = No consta

m = meses



MAPA 1: DISTRIBUCION
GEOGRAFICA CEPAS
SEGUNDO GRUPO



MAPA 2: DISTRIBUCION
GEOGRAFICA CEPAS
CUARTO GRUPO

TABLA 5. GRUPO TERCERO, SUBGRUPO A. DATOS EPIDEMIOLOGICOS.

FAGOTIPO	Nº CEPA	AÑO AISLAMIENTO	ORIGEN MUESTRA	PROCEDENCIA GEOGRAFICA
A	2215	1980	Heces enf.	Madrid
B	5048	1982	Heces enf.	Barcelona
C	2259	1980	Heces enf.	Madrid
D	6566	1984	Heces enf.	Madrid
E	7072	1983	Heces enf.	Toledo
F	7432	1980	Heces enf.	Madrid
G	9193	1982	Heces enf.	Madrid
H	13730	1984	Heces enf.	Alicante
I	9194	1985	Heces enf.	Madrid

TABLA 6. GRUPO TERCERO, SUBGRUPO B. DATOS EPIDEMIOLOGICOS.

Nº CEPA	AÑO AISLAMIENTO	ORIGEN MUESTRA	PROCEDENCIA GEOGRAFICA
2201	1980	Heces enf.	Madrid
2216	1980	Heces enf.	Madrid
2268	1980	Heces enf.	Madrid
2272	1980	Heces enf.	Madrid
15044	1982	Heces enf.	Madrid

TABLA 7. GRUPO QUINTO. DATOS EPIDEMIOLOGICOS.

BROTE	N° CASOS	ALIMENTO CAUSANTE	PRESENCIA DE PORTADOR	TIPO DE EPIDEMIA	PROCEDENC. GEOGRAFICA
1	12	Mouse de chocolate	Sí	DC	Las Palmas (Arucas)
2	36	Mouse de chocolate	Sí	DC	Las Palmas (Sta. Brígida)
3	5	Tarta casera	No	F	Murcia
4	49	Salsa rosa	Sí	DC	Murcia (Cartagena)
5	40	Mahonesa	Sí	DC	Madrid (Fuenlabrada)
6	15	Huevo relleno	Sí	F	Huelva
7	9	Ensaladilla	No	F	Badajoz
8	56	Sopa de marisco	No	DC	Oviedo

DC = Distintas Comunidades

F = Familiar

2.3 Crecimiento y conservación de las cepas.

La formación de todos los medios de cultivo utilizados en este apartado y los siguientes se exponen en el anexo.

Las cepas se sembraron en placas de Agar Mac Conkey (McC) en aislamiento, incubándose durante 18-24 horas a 37°C. Se picó una colonia lisa bien aislada y se sembró en masa en placas de TSA (Triptosa con extracto de levadura). Se incubó durante 18-24 horas a 37°C. A partir de este último crecimiento se realizó por un lado la identificación bioquímica y por otro lado se conservó el germen en dos viales de leche descremada, uno de los cuales se congeló a -70°C y el otro se liofilizó.

Para su huso habitual y mantenimiento en cortos periodos de tiempo se sembró en TSA inclinado.

3 IDENTIFICACION.

3.1 Pruebas bioquímicas convencionales.

3.1.1 Medios diferenciales combinados.

De un cultivo incubado durante 18-24h se sembraron los siguientes medios bioquímicos combinados:

a) Agar de Kligler con hierro (KIA): Este medio se inocula en profundidad y en superficie en el pico de flauta incubándose durante 18-24h a 37°C, y en él se determinan las siguientes reacciones bioquímicas (143):

- Fermentación de la glucosa con producción o no de gas: su lectura se hace en el fondo del tubo y la reacción positiva se detecta por un cambio de color del mismo de naranja a amarillo al acidificarse el medio; el gas se detecta por la formación de burbujas o rotura del medio.
- Fermentación de lactosa: su lectura se hace en el pico de flauta y se detecta por la acidificación del mismo, color amarillo.
- Producción de SH₂: se detecta por la producción de un precipitado negro en el medio.

El patrón de Salmonella serotipo Enteritidis en este medio es glucosa +, gas +, lactosa -, SH₂ +.

b) Agar con hierro y lisina (LIA): Este medio se inocula e incuba de la misma manera que el KIA. En él se determinan las siguientes reacciones bioquímicas (144): Decarboxilación de la lisina, desaminación de la misma y producción de SH₂.

La decarboxilación se detecta en el fondo del medio porque este revierte a su color original después de haber sido acidificado (color amarillo) por la fermentación de la glucosa; al decarboxilarse la lisina el medio se alcaliniza y vuelve a su color original púrpura. La desaminación de la lisina se detecta en el pico de flauta porque vira a color rojo, y la producción de SH₂ por un ennegrecimiento del medio.

Salmonella serotipo Enteritidis tiene el siguiente patrón: Lisina decarboxilasa +, lisina deaminasa -, producción de SH₂ +.

- c) Agar semisólido de movilidad, indol y ornitina (MIO): Se inocula en profundidad y se incuba igual que los dos medios anteriores.

En él se determinan las siguientes pruebas bioquímicas (145): La movilidad, la decarboxilación de la ornitina y la producción de indol a partir de triptófano. La movilidad se detecta por el enturbiamiento del medio. La decarboxilación de la ornitina sigue un proceso similar al de la decarboxilación de la lisina en el medio de LIA. La producción de indol se detecta por la aparición de un anillo de color rojo después de echar unas gotas del reactivo de Kovacs una vez que se hayan leído las pruebas anteriores. Salmonella serotipo Enteritidis

tiene el siguiente patrón bioquímico: Movilidad +.
ornitina decarboxilasa + e indol -.

3.1.2 Medios diferenciales individuales.

3.1.2.1 Fermentación de azúcares.

Se usó el medio de fermentación de azúcares con indicador de Andrade (145). Se inoculó con un par de gotas de una suspensión del germen y se incubó 24-48h a 37°C. Se determinó la fermentación de los siguientes azúcares (145): glucosa con producción de gas (para lo que se incluyó en el medio una campana de Durham invertida), lactosa, dulcitol, arabinosa, xylosa y rhamnosa. La reacción positiva se aprecia por un color rosa intenso.

Salmonella serotipo Enteritidis tiene el siguiente patrón: Glucosa +, gas en glucosa +, lactosa -, xylosa +, dulcitol +, arabinosa + y rhamnosa +.

3.1.2.2 Actividad enzimática (Ureasa y Fenil Alanina deaminasa).

Se usó el medio de agar urea para la detección de la ureasa. Se inoculó en profundidad, incubándose 24-48h a 37°C. La reacción positiva consiste en el desarrollo de un color

rojizo en el medio.

Para la detección de la fenil alanina deaminasa se usó el medio de agar con fenilalanina. Se inoculó en superficie, incubándose 24-48h a 37°C. La lectura se realizó después de echar en el medio crecido unas gotas de cloruro férrico al 10%. La reacción positiva consiste en el desarrollo de un color verde oliva en la zona donde hay crecimiento.

Salmonella serotipo Enteritidis da resultados negativo y positivo en estas reacciones, respectivamente.

3.1.2.3 Utilización de compuestos químicos como única fuente de carbono.

Para la determinación de la capacidad de la bacteria en estudio de utilizar como única fuente de carbono el citrato y el malonato de sodio, se utilizaron los medios agar citrato de Simmons y caldo malonato, respectivamente. El citrato se inocula en superficie y el malonato echando unas gotas de una suspensión.

Ambos medios se incuban 24-48h a 37°C y la reacción positiva se determina por el desarrollo de un color azulado en el medio.

Salmonella serotipo Enteritidis es positiva y negativa,

respectivamente, para ambas reacciones.

3.1.2.4 Decarboxilación de aminoácidos.

Se usó el método de Falkow (145), con el medio base de decarboxilación al que se le añadieron los siguientes aminoácidos en tubos separados: lisina, arginina y ornitina. Además se dejó un tubo sin aminoácido como control. Una vez inoculados se añadió una sobrecapa de aceite de parafina estéril. Se incubaron 24-48h a 37°C. La reacción positiva se determina porque el medio control inoculado se vuelve de color amarillo y el medio con aminoácido revierte a color púrpura.

Salmonella serotipo Enteritidis es lisina +, arginina + ó + débil y ornitina +.

3.2 Panel comercial de identificación.

Se usó un panel comercial de identificación y Punto de corte de la casa Baxter (sistema Autoscan) con lector automático del panel.

Las pruebas usadas por el panel comercial en la identificación fueron las siguientes:

a) Pruebas bioquímicas:

- Fermentación de los carbohidratos glucosa, sacarosa, sorbitol, rafinosa, rhamnosa, arabinosa, inositol, adonitol y melobiosa.
- Decarboxilación de los aminoácidos lisina, arginina y ornitina.
- Utilización de citrato, malonato, tartrato y acetato como única fuente de carbono.
- La producción de SH_2 , la hidrólisis de la urea, la formación de indol, la producción de ácido indolpirúvico, la hidrólisis de la esculina, la producción de acetoina, la hidrólisis del orto-nitrofenol-beta-D-galactopiranosido.
- La reducción de los nitratos, la oxidación-fermentación de la glucosa.

b) Pruebas de resistencia y tolerancia:

- Tolerancia a determinada concentración de ceftrimida.
- Resistencia a los antimicrobianos: tobramicina,

nitrofurantoina, cefalotina, colistina, kanamicina y penicilina.

El panel viene comercializado con los productos desecados, que se rehidrataron mediante un inoculador automático con una suspensión del germen. Los pocillos de la glucosa, lisina, ornitina, control de aminoácidos y SH, se cubrieron con un par de gotas de aceite de parafina estéril, se incubaron durante 18-24h a 37°C. Se añadieron los siguientes reactivos en los pocillos que a continuación se indican: R. de Kovac en el indol, cloruro férrico en el Triptófano deaminasa (TDA), hidróxido potásico 40% y alfa naftol en el Voges Proskauer y ácido sulfanílico 0,8% con dimetilalfanatilamina 0,5% en los nitratos.

Los resultados se leyeron en el lector automático que, con la ayuda de un programa de software, interpreta dichos resultados, dando lugar a una identificación a nivel de especie.

4 SEROTIPIA.

4.1 Producción de sueros.

Los sueros utilizados fueron inducidos en nuestro laboratorio por inoculación en conejos de la raza Boustac Blanch con suspensiones de los antígenos correspondientes.

Todas las cepas utilizadas en el apartado de producción de sueros fueron suministradas por el Laboratorio Internacional de Referencia del Instituto Pasteur de París.

4.1.1 Suero anti O:9.

El antígeno se preparó haciendo una suspensión densa (2×10^9 u.f.c. por ml) de un cultivo de 18h de la cepa Salmonella serotipo Typhi T2. La suspensión se realizó en una suspensión salina y se hirvió durante 2 horas. Los conejos se inocularon en vena con cantidades de 0,5, 1, 2 y 4 ml a intervalos de cuatro días. A los 8 ó 10 días de la última inyección el conejo se sangró a muerte, se separó el suero y se absorbió con los serotipos Paratyphi A y Senftenberg hasta que no se detectaron reacciones cruzadas. Una vez terminada la absorción se tituló el suero frente a cepas de Salmonella de los grupos D1, D2 y D3, para determinar la dilución de uso.

4.1.2 Suero anti HG.

El antígeno PoliG se preparó a partir de una mezcla de cultivos muy móviles de cepas de Salmonella serotipo Oraniemburg, Derby y Dublin. Las cepas se incubaron en caldo nutritivo durante 8 horas. Se hizo una mezcla de las tres cepas a partes iguales hasta conseguir una suspensión de

2x10 ufc/ml y se añadió formol a una concentración final del 0.5%(u/v). Se tituló frente a una selección de serotipos con los antígenos: gm - gp - gt - gq - gms - gz51 - gz62 - gz63 - mt - fg - gpu.

4.1.3 Suero anti H:m.

El antígeno se preparó de forma similar al anterior con una cepa muy móvil del serotipo Oraniemburg. El suero se absorbió frente a los serotipos: Senftemberg, Berta, Moscow, Rostock, Maestved, Budapest, Wayne y 38:gt:-(II). Se tituló frente a una selección de serotipos con los antígenos gm - gms gmst - -gmq - gmps - mt - gmt - mptu

4.2 Aglutinación.

4.2.1 Aglutinación en microcápsula.

Es una técnica de aglutinación que permite probar muchas cepas a la vez (146).

La cepa a probar se creció previamente en un caldo nutritivo durante 18 horas a 37°C y se inactivó con formol. Esta suspensión se repartió en microcápsulas en cantidades de 0,25 ml , que se enfrentaron a sus sueros

correspondientes. La placa se colocó en un baño a 50°C. A las dos horas se sacaron las placas y se leyeron los resultados de los antígenos flagelares; después se guardaron a 4°C y al día siguiente se leyeron los resultados de los antígenos somáticos.

4.2.2 Aglutinación en porta.

Se creció la cepa en medio de Agar Nutritivo haciendo una suspensión densa. Se comprobó que no era autoaglutinable. A continuación se enfrentó con el suero correspondiente, viéndose la aglutinación en un intervalo menor de un minuto. Esta aglutinación era de aspecto granular para los antígenos "O" y flocular para los "H". Esto fue reversible por agitación.

5 FAGOTIPIA.

5.1 Aislamiento de bacteriófagos.

Existen varios esquemas de trabajo descritos para la búsqueda y aislamiento de bacteriófagos (54,137,138,147,148).

Los aplicados en este trabajo fueron, el propuesto por Gersman (137) para el aislamiento de bacteriófagos de procedencia salvaje, y el descrito por Guinée, Leeuwen y Saxe

y Notley (149) para el aislamiento e identificación de bacteriófagos lisogénicos.

5.1.1 Aislamiento e identificación de bacteriófagos salvajes.

Los bacteriófagos salvajes o silvestres se aislaron de la Naturaleza: de aguas residuales, estancadas, o de muestras de aguas superficiales contaminadas.

Se estudiaron un total de 16 muestras de agua (de un litro cada una).

A partir de la muestra de agua se siguió el método de Gersman para el aislamiento de bacteriófagos salvajes (137,138), que se describe a continuación.

Cada litro de agua se distribuyó en frascos de 20ml y en cada uno se inoculó una cepa crecida previamente en caldo común con cloruro sódico durante 1h y 30 min. a 37°C (dicha cepa, en caso de aislamiento de bacteriófago, se convierte en su cepa propagadora). Las cepas usadas en este paso fueron del grupo primero y tercero, subgrupo B.

El contenido total del frasco (muestra de agua más cepa propagadora) se incubó a 37°C durante 18-24h. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min, se recogió el sobrenadante y se filtró por membranas Millipore de 0,45µm.

El filtrado se consideró el cultivo puro del fago.

Para comprobar la presencia de bacteriófago el filtrado se enfrentó a su cepa propagadora, de nuevo crecida en 5ml de caldo común con cloruro sódico durante 2h y 30min a 37°C. Se inundó una placa de Agar común con cloruro sódico (dejada secar con anterioridad durante 2h en la estufa de 37°C), con la cepa crecida, se retiró el exceso de fluido y se dejó secar a temperatura ambiente durante 20-30min. A continuación se aplicó una gota del cultivo puro de bacteriófago. Se incubó durante 18-24h a 37°C. Pasado este tiempo, la presencia del bacteriófago se visualizó en la aparición de placas de lisis.

Una vez confirmada la presencia de bacteriófagos, se purificaron para comprobar si las placas de lisis estaban producidas por uno o más bacteriófagos.

5.1.2 Aislamiento e identificación de bacteriófagos lisogénicos.

Se realizó siguiendo el método de Saxe y Notley (149), basado en la inducción de bacteriófagos por medio de la Mitomicina C.

Se aplicó la técnica a 150 cepas de Salmonella serotipo Enteritidis pertenecientes a los grupos primero y segundo.

Cada cepa se creció en caldo común durante 18-24h a 37°C. Posteriormente, el caldo ya crecido se diluyó con más caldo común a 1/3 de su concentración y se incubó a 37°C durante 30 min. Se añadió a continuación Mitomicina C, a una concentración de 0,5 ngr/ml. Tras incubarse en baño durante 30 min a 37°C, se centrifugó a 5000 rpm, desechando el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 2ml de caldo común, incubándose de nuevo durante 90 min a 37°C. De esta manera se consiguió la liberación de los bacteriófagos, separados posteriormente de los restos bacterianos mediante una nueva centrifugación. Al final de este proceso se recogió el sobrenadante.

Para comprobar la presencia de bacteriófagos en el sobrenadante, se siguió el mismo procedimiento usado en el caso de bacteriófagos de procedencia salvaje a partir del cultivo de bacteriófago puro.

Posteriormente, se realizó la purificación de las placas de lisis.

5.2 Purificación de los bacteriófagos.

La purificación es un proceso encaminado a confirmar la presencia de uno o más bacteriófagos en las placas de lisis que estos producen en las bacterias, con la finalidad de aislarlos y usarlos posteriormente teniendo la certeza de que

cada placa de lisis se debe a la acción de un solo bacteriófago.

Se realizó por pases sucesivos en placas de Agar común con cloruro sódico (137). Se deben realizar, como mínimo, tres pases. Para considerar a un bacteriófago purificado es necesario poder distinguir claramente la morfología de las placas de lisis aisladas que produce en su cepa propagadora después del tercer pase. Si no es así, se debe realizar algún pase más.

En caso de existir varias placas de lisis de distinta morfología en cualquiera de los pases, se deben aislar por separado cada una de ellas y ser tratadas como fagos distintos, iniciándose el proceso de purificación en cada una ellas.

Los pases de purificación en los bacteriófagos aislados, tanto de tipo salvaje como lisogénico, se realizaron de la siguiente manera:

- PRIMER PASE: Se consideró como primer pase el proceso de aislamiento del bacteriófago en su cepa propagadora (en caso de aparición de placas de lisis aisladas).
- SEGUNDO PASE: Se tocó con la punta de un asa de inoculación una placa de lisis bien aislada en el pase anterior, se descargó en 0,5ml de caldo común con

cloruro sodico y a partir de esta suspensión (considerada como cultivo de fago puro) se hicieron diluciones decimales. Sobre una placa de agar común con cloruro sodico sembrada con su cepa propagadora (de igual forma que en el proceso de aislamiento de fago) se depositó una gota de cada una de las diluciones del bacteriófago. Se incubó a 37°C durante 18-24h.

- TERCER PASE: Se realizó de igual forma que el pase anterior, partiendo de una placa de lisis aislada del segundo pase y así sucesivamente, tantos pases como fueran necesarios hasta conseguir el aislamiento del bacteriófago. Generalmente, tres o cuatro pases fueron suficientes.

5.3 Determinación del RTD de los bacteriófagos.

Routine Test Dilution (RTD) de un bacteriófago es su dilución de uso. Se considera el RTD, o título del bacteriófago, a la última dilución que ocasiona una lisis entre confluyente y semiconfluyente en su cepa propagadora.

Cada bacteriófago aislado se tituló frente a su cepa propagadora. Para ello se creció la cepa en caldo común con cloruro sódico durante 18-24 horas a 37°C. Con el caldo crecido se inundó una placa de agar común con cloruro sódico, retirando el exceso de liquido con una pipeta Pasteur. A

continuación, se depositó sobre el agar una gota de cada una de las diluciones decimales del bacteriófago a titular. Dichas diluciones se hicieron previamente con caldo común, partiendo del cultivo puro de fago. El agar inoculado se incubó a 37°C durante 18-24 horas. Pasado este tiempo se visualizó el RTD o título del bacteriófago.

5.4 Propagación del bacteriófago.

A partir de un bacteriófago aislado y purificado, tanto de origen salvaje como lisogénico, se llevó a cabo su propagación con el fin de disponer de una cantidad suficiente para su uso posterior.

Se realizó por el medio de agar semisólido descrito por Swanstrom y Adams (150). El Agar semisólido repartido en tubos a 6ml se fundió en baño de ebullición, se dejó enfriar a 45°C y se añadieron 0,5ml de caldo crecido con la cepa propagadora, 0,6ml de bacteriófago a su RTD y 0,25ml de cloruro cálcico, a una concentración de 0,4gr/ml. Todo ello se vertió sobre una placa de agar común 1,1 (de 15cm de diámetro) y se incubó a 37°C, durante 18-24h. Una vez propagado el bacteriófago, se inundó la placa con 15ml de caldo común y se recogió, mediante arrastre, con pipeta Pasteur doblada. Tras centrifugar durante 1h, se recogió el sobrenadante y se filtró por membranas Millipore de 0,45nm.

El filtrado, que es el fago ya propagado, se tituló de nuevo en su cepa propagadora. Finalmente, los bacteriófagos se guardaron a 4°C para su conservación.

5.5 Técnica de la fagotipia.

Las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis a estudiar se sembraron en caldo común con ClNa al 0,8%, se incubaron en agitación durante 2h y 30min en tubos inclinados a 37°C. Una vez crecidas, se inocularon por inundación en placas de agar común con ClNa al 0,8%, retirando el exceso de líquido y dejándolas secar durante 20 min a temperatura ambiente.

A continuación, sobre la placa ya seca se depositó una gota (0,25µl) de cada uno de los bacteriófagos seleccionados. Se dejaron secar y se incubaron durante 18-24h en estufa de 37°C. Pasado este tiempo, se leyeron los resultados de acuerdo con el patrón de lectura propuesto por Anderson y Williams (151).

5.6 Lectura de los resultados.

Se realizó de acuerdo a los criterios propuestos por Anderson y Williams (151). Estos se basan fundamentalmente en tres factores:

a) El tamaño de las placas de lisis:

- 1.- Placas grandes "L".
- 2.- Placas normales "N".
- 3.- Placas pequeñas "S".
- 4.- Placas diminutas "m".
- 5.- Placas micro " μ " visibles tan solo con lupa de 10 aumentos.

b) El número de placas de lisis:

- 1.- De 0 a 5 placas, se indica el número de las mismas.
- 2.- De 0 a 20 placas, se pone \pm
- 3.- De 21 a 40 placas, se pone +
- 4.- De 41 a 60 placas, se pone + \pm
- 5.- De 61 a 80 placas, se pone + +
- 6.- De 81 a 120 placas, se pone + + \pm
- 7.- Más de 120 placas, se pone + + +

c) El tipo de lisis:

- 1.- Lisis semiconfluente "scl"
- 2.- Lisis confluyente "cl"
- 3.- Lisis menor que semiconfluente "<scl" o lisis menor que confluyente "<cl", que representan grados intermedios de lisis.
- 4.- Lisis opaca "ol", que se debe a un sobrecrecimiento posterior de la misma cepa

5.7 Interpretación de los resultados.

La interpretación de los resultados se realizó en base a los esquemas de fagotipia desarrollados para Salmonella serotipo Typhi y Typhimurium (139), siguiendo sus mismos criterios de diferenciación. Se consideraron fagotipos distintos cuando la lectura de las lisis producidas en dos cepas mostraba una o mas diferencias significativas entre ellas.

5.8 Juego de bacteriófagos alternativos

Se probaron una serie de juegos de bacteriófagos desarrollados para otros microorganismos:

- Juego de bacteriófagos para Pseudomonas: suministrado por el Laboratorio Internacional de Fagotipia de Pseudomona de Londres (Central Public Health Laboratory), el juego consta de 20 bacteriófagos.
- Juego de bacteriófagos para Serratia: suministrado por el Laboratorio Internacional de Fagotipia de Serratia de Londres (Central Public Health Laboratory), el juego consta de 12 bacteriófagos.
- Juego de bacteriófagos para Salmonella serotipo Typhimurium: suministrado por el Laboratorio

Internacional de Fagotipia de Salmonella serotipo Typhimurium de Londres (Central Public Health Laboratory), el juego consta de 30 bacteriófagos.

- Juego de bacteriófagos para Salmonella serotipo Enteritidis: suministrado por el Instituto Nacional de Higiene de Budapest, este juego consta de 8 bacteriófagos y es de uso local.

5.9 Juego de bacteriófagos autóctono para Salmonella serotipo Enteritidis

Este juego se elaboró en el Laboratorio de Enterobacterias del C.N.M.V.I.S. en trabajos anteriores relacionados con cepas de Salmonella serotipo Enteritidis (133). Consta de 6 bacteriófagos y diferencia 9 fagotipos. Presenta alta tipabilidad, pero baja discriminación. Es de uso local. Constituye la base para el desarrollo del juego de bacteriófagos propuesto en este trabajo.

6 ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

Agar MacConkey (McC) . (Difco)

Fórmula (g/l):

Peptona	17
Peptona Proteasa	3
Lactosa	10
Sales biliares n° 3	1,5
Cloruro sódico	5
Agar	13,5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001

pH final aprox. 7,1

Preparación:

Se añaden 50 gramos a un litro de agua destilada. Se calienta hasta la ebullición con agitación suave para disolverlo por completo. Se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121°C se deja enfriar hasta 55°C y se reparte en placas de petri en cantidades de 20ml por placa.

Agar de Triptona Soja (TSA) .(Oxoid)

Fórmula (g/l):

Triptona	15
Peptona de soja	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

pH aprox. 7.3

Preparación:

Se suspenden 40 gramos en un litro de agua destilada y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Leche descremada (LD) . (Oxoid)

Consiste en leche desnatada secada por pulverización.

Se mezcla el polvo con una pequeña cantidad de agua destilada hasta formar una pasta uniforme. Luego se añade gradualmente más agua destilada hasta que se obtenga una mezcla del 10% p/v. Se esteriliza en autoclave a 121°C cinco minutos.

Agar de Kliqler con hierro (KIA). (Difco)

Fórmula (g/l):

Extracto de vacuno	3
Extracto de levadura	3
Peptona	15
Proteasa y Peptona de Difco	5
Lactosa	10
Dextrosa	1
Sulfato ferroso	0,2
Cloruro sódico	5
Tiosulfato sódico	0,3
Agar	12
Rojo fenol	0,024

pH final aprox. 7,4

Preparación:

Se resuspenden 55g en un litro de agua destilada. Se hierve hasta su disolución. Se autoclaviza 15 minutos a 121°C

Agar con lisina y hierro (LIA) . (Difco)

Fórmula (g/l):

Peptona	5
Extracto de levadura	3
Dextrosa	1
Hidrocloruro de L-lisina	10
Citrato amónico férrico	0,5
Tiosulfato sódico	0,04
Púrpura de bromocresol	0,02
Agar	15

pH final aprox. 6,7

Preparación :

Suspender 34,5g en 1l de agua destilada. Hervir hasta su disolución. Autoclavizar 12 minutos a 121°C.

Medio para movilidad, indol, ornitina (MIO) (Difco)

Fórmula (g/l):

Extracto de levadura	3
Peptona + Triptona	10 + 10
Hidrocloruro de L-Ornitina	5
Dextrosa	1
Agar	2
Púrpura de bromocresol	0,02

pH final aprox. 6,5

Preparación:

Suspender 31 g en 1 l de agua destilada. Hervir hasta su disolución. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Medio para la fermentación de azúcares

Fórmula (g/l):

Peptona. (Difco)	10
Extracto de carne. (Difco)	3
Cloruro sódico. (Merck)	5
Indicador de Andrade	10 ml

pH final aprox. 7,1

Preparación:

Una vez preparado el caldo anterior, se reparte en frascos para echar el azúcar correspondiente. La glucosa y la lactosa se preparan a una concentración final del 1%, los demás azúcares se preparan al 0,5%. Se autoclavian 10 minutos a 121°C.

Indicador de Andrade

Fórmula:

Fucsina ácida. (Sigma)	0,5 g
Hidróxido sódico 1 N. (Merck)	16 ml
Agua destilada	100 ml

Preparación:

Se disuelve la fucsina en el agua destilada y se añade el hidróxido sódico. Si después de 1 ó 2 horas no se ha decolorado la fucsina, se añade más hidróxido sódico hasta que se decolore. Se prepara con antelación y se guarda, ya que mejora con el tiempo.

Agar Urea. (Difco)

Fórmula (g/l):

Peptona	1
Dextrosa	1
Cloruro sódico	5
Fosfato potásico monobásico	2
Urea	20
Rojo fenol	0,012

pH final aprox. 6,8

Preparación:

Suspender 29g del medio anterior en 100 ml de agua destilada y mezclar bien para disolver completamente. Estirilizar por filtración esta base concentrada. Disolver 15g de Agar (Difco) en 900ml de agua destilada, hervir y autoclavizar 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar hasta 50-55°C y añadir asépticamente 100ml del medio de urea anterior al agar enfriado. Mezclar bien y distribuir en tubos estériles.

Fermentación de la Xylosa. (Xy)

Fórmula y preparación:

Usar el mismo medio base que para la fermentación de azúcares con indicador de Andrade. Añadir Xylosa al 0,5% concentración final. Autoclavizar 10 minutos a 121°C

Agar fenil alanina. (PhAl) (Difco)

Fórmula (g/l):

Extracto de levadura	3
Fosfato dipotásico	1
Cloruro sódico	5
Agar	12

pH final aprox. 7,3

Preparación:

Resuspender 23g en 1 litro de agua destilada. Hervir hasta disolverlo. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Agar Citrato de Simmons (CS) (Difco)

Fórmula (g/l):

Sulfato de magnesio	0,2
Fosfato dihidrógeno amónico	1
Fosfato dipotásico	1
Citrato sódico	2
Cloruro sódico	5
Azul de bromotimol	0,08
Agar	15

Preparación:

Resuspender 24,2g en un litro de agua destilada. Hervir hasta disolver. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Caldo malonato (Difco)

Fórmula (g/l):

Extracto de levadura	1
Sulfato amónico	2
Fosfato dipotásico	0,6
Fosfato monopotásico	0,4
Cloruro sódico	2
Malonato sódico	3
Dextrosa	0,25
Azul de bromotimol	0,025

pH final aprox. 6,7

Preparación:

Resuspender 9,3g en 1l. Agitar hasta disolver.
Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Presencia de Tetrionato Reductasa (TTR).

Formula (g/l):

Tetrionato potásico	5
Solución de azul de bromotimol	25 ml
Agua peptonada estéril pH 7,4	1 l

Preparación:

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración. La solución de azul de bromotimol se prepara en una proporción de 1/500 de la siguiente manera: se disuelven 0,2g del colorante en 2,5ml de sosa 1N. Se añade 100ml de agua destilada.

Decarboxilación de aminoácidos. (Difco)

Fórmula (g/l):

Peptona	5
Extracto de levadura	3
Dextrosa	1
Púrpura de bromocresol	0,02

pH final aprox. 6,8

Preparación:

Resuspender 9g en 1 litro de agua destilada. Calentar para disolver. Añadir 5g de L-lisina, L-ornitina y L-arginina por cada litro de medio. Calentar otra vez hasta su disolución. La ornitina requiere el ajuste del pH con NaOH 1N. Autoclavizar 15 minutos a 121°C. Preparar la misma cantidad de medio base sin aminoácido como control.

Agua de peptona. (Difco)

Fórmula (g/l):

Peptona	10
Cloruro sódico	5

Preparación:

Resuspender 15g en un litro de agua destilada. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Caldo común con cloruro sódico.

Fórmula (g/l):

Caldo nutritivo deshidratado. (Difco)	20
Cloruro sódico. (Merck)	8,5

Preparación:

Disolver las cantidades arriba indicadas en 1 litro de agua destilada. Disolver por agitación. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Agar común con cloruro sódico.

Fórmula (g/l):

Caldo nutritivo deshidratado. (Difco)	20
Cloruro sódico. (Merck)	8,5
Agar	13

Preparación:

Disolver las cantidades arriba indicadas en un litro de agua destilada. Hervir hasta disolver. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Caldo nutritivo. (Difco)

Fórmula (g/l):

Extracto de carne	3
Peptona	5

pH final aprox. 6,8

Preparación:

Disolver 8 g en 1 l de agua destilada. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Infusión de cerebro y corazón (BHI). (Difco)

Fórmula (g/l):

Infusión de cerebros de ternera	200
Infusión de corazón de vacuno	250
Peptona proteasa	10
Cloruro sódico	2
Fosfato disódico	5

pH final aprox. 7,4

Preparación:

Disolver 37g en 1l de agua destilada. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Agar Mueller Hinton (MH). (Oxoid)

Fórmula (g/l):

Infusión de carne de vaca	300
Hidrolizado de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar n° 1	10

pH final aprox. 7,4

Preparación:

Resuspender 35g en 1l de agua destilada. Hervir hasta su disolución. Autoclavizar 15 minutos a 121°C.

Reactivo de Kovac

Fórmula

Alcohol isoamílico	150 ml
Paradimetilaminobenzaldehido	10 g
Acido clorhidrico	50 ml

Preparación:

Se disuelve el aldehido en alcohol y luego se echa poco a poco el ácido.

Reactivo de los nitratos

Fórmula:

A. Acido sulfanílico	8 g
Acido acético 5N	1000 ml
B. N,N Dimetil 1 Naftiamina	6 ml
Acido acético 5 N	1000 ml

Reactivo de cloruro férrico

Fórmula:

Cloruro férrico 0,5M

Reactivo del Voges Proskauer (Barrit)

Fórmula:

A. Alfa Naftol	5 g
Alcohol absoluto	100 ml
B. Hidróxido potásico	40 g
Agua	100 ml

RESULTADOS

1 BACTERIOFAGOS DE PROCEDENCIA SALVAJE.

1.1 Aislamiento de bacteriófagos salvajes.

1.1.1 Cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.

Las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis utilizadas para el aislamiento de bacteriófagos salvajes son las pertenecientes a los grupos Primero y Tercero, Subgrupo B (cepas no tipables por el esquema autóctono (133)). La distribución de las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis en grupos y su descripción viene expuesta en el apartado de Material y Métodos.

1.1.2 Muestras de agua.

Las 16 muestras de agua usadas para el aislamiento de bacteriófagos salvajes, fueron seleccionadas de entre todas las muestras remitidas por Laboratorios de Microbiología de distintas provincias Españolas. Dicha selección viene descrita en el apartado de Material y Métodos.

1.1.3 Aislamiento de bacteriófagos salvajes.

Las 16 muestras de agua seleccionadas constituyeron la base para el aislamiento de este tipo de bacteriófagos. Cada

muestra de agua se enfrentó a cepas del Grupo Primero y a las 5 cepas del Grupo Tercero, Subgrupo B, aislándose en este primer paso 1000 bacteriófagos con morfología diferente.

Este elevado número de aislamientos fue sometido a diferentes pruebas, que se explicarán a continuación, a lo largo de las cuatro selecciones que se hicieron hasta conseguir un grupo de bacteriófagos salvajes con características de marcador epidemiológico.

1.2 Selección de los bacteriófagos salvajes aislados.

1.2.1 Primera selección.

Se hizo a partir de los 1000 bacteriófagos salvajes aislados en el primer enfrentamiento entre las cepas y las muestras de agua.

1.2.1.1 Cepas Salmonella serotipo Enteritidis.

Para esta primera selección se usaron las cepas de los siguientes grupos: Primero y Tercero, Subgrupo B.

Se emplearon para el aislamiento y purificación de los bacteriófagos salvajes y, posteriormente, para fagotipia con

los bacteriófagos seleccionados.

Los 1000 bacteriófagos aislados fueron enfrentados en tres ocasiones a sus cepas propagadoras, de las cuales se aislaron, pertenecientes a los grupos Primero y Tercero, Subgrupo B.

1.2.1.2 Criterios de selección.

Esta primera selección se hizo atendiendo al criterio de estabilidad lítica de los bacteriófagos aislados.

Al enfrentar de nuevo los 1000 bacteriófagos aislados a sus cepas propagadoras se pudo apreciar que sólo 84 mostraban estabilidad en sus patrones líticos durante los tres enfrentamientos. Como consecuencia se rechazaron todos aquellos bacteriófagos que no mantenían su lectura. Los 84 bacteriófagos seleccionados fueron numerados correlativamente del 1 al 84. En la tabla 8 vienen reflejados los datos epidemiológicos de estos bacteriófagos seleccionados.

En este grupo de 84 bacteriófagos, algunos proceden de la misma muestra de agua y de la misma cepa propagadora, ya que una placa de lisis en ocasiones estaba producida por más de un bacteriófago. Esto se evidenció por medio de los tres pases de purificación.

Para explicar de forma más clara esta primera selección se expone a continuación, a modo de ejemplo, el trabajo realizado con las muestras de agua procedentes de Murcia. Se eligió esta provincia como modelo por presentar un elevado número de aislamientos.

En un principio, al enfrentar las dos muestras de agua procedentes de Murcia a las cepas del Grupo Primero y Tercero, subgrupo B, se aislaron y posteriormente purificaron un total de 600 bacteriófagos con morfología diferente. Muchos de ellos procedentes de la misma cepa y muestra de agua.

Para facilitar la exposición del largo proceso que condujo a la primera selección de bacteriófagos aislados en la provincia de Murcia, se tomó como modelo los aislamientos obtenidos al enfrentar la cepa del primer grupo 88825 a una muestra de agua (20ml) tomada en la entrada a la depuradora de la provincia de Murcia.

Al efectuar el primer pase de purificación de las placas de lisis aisladas que aparecieron tras este primer enfrentamiento, se visualizaron 5 nuevas placas con morfología diferente entre sí. Se las denominó con el número de la cepa propagadora y un número correlativo del 1 al 5 (Esquema 5).

A cada nueva placa de lisis se le practicó un segundo

pase de purificación, apareciendo en dos de ellas, la 88825-1 y la 88825-3, nuevas placas de lisis morfológicamente distintas.

De la placa 88825-1 se aislaron 5, que se designaron A,B,C,D y E. De la placa 88825-3 se aislaron 3 y se les designó F,G y H (esquema 6).

En el tercer pase de purificación se aislaron de nuevo 4 bacteriófagos más, procedentes de la placa 88825-1-A. Se les denominó: alfa, beta, gamma y delta (Esquema 7). El resto de las placas de lisis no presentaron modificaciones con respecto al pase anterior.

El esquema 8 muestra el estudio completo de la cepa 88825 enfrentada a la muestra de agua procedente de Murcia.

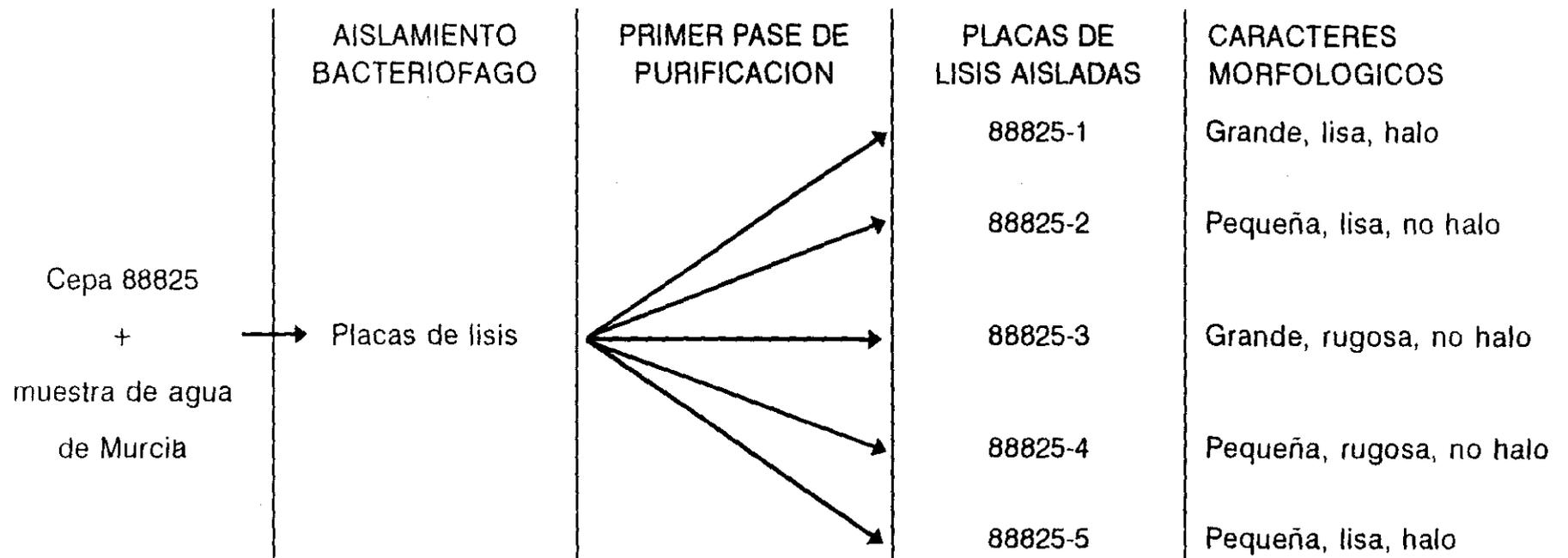
TABLA 8. PRIMERA SELECCION DE BACTERIOFAGOS SALVAJES. DATOS
EPIDEMIOLOGICOS.

BACTERIOFAGO	RTD	CEPA PROPAGADORA /AÑO	PROCEDENCIA MUESTRA DE AGUA
1	10 ⁻⁷	79279/85	Canarias
2	10 ⁻⁴	79279/85	Canarias
3	10 ⁻⁴	79279/85	Canarias
4	10 ⁻⁶	80041/86	Canarias
5	10 ⁻⁴	78041/85	Canarias
6	10 ⁻⁵	78041/85	Canarias
7	10 ⁻⁵	80253/86	Canarias
8	10 ⁻²	80253/86	Canarias
9	10 ⁻³	80238/86	Canarias
10	10 ⁻⁵	78881/85	Canarias
11	10 ⁻³	79133/85	La Rioja
12	10 ⁻⁶	79133/85	La Rioja
13	10 ⁻⁵	78299/85	La Rioja
14	10 ⁻⁴	78881/85	La Rioja
15	10 ⁻³	311/87	La Rioja
16	10 ⁻⁴	78099/85	La Rioja
17	10 ⁻⁴	78099/85	La Rioja
18	10 ⁻²	79678/85	La Rioja
19	10 ⁻⁶	361/87	La Rioja
20	10 ⁻³	2268/80	La Rioja
21	10 ⁻²	78041/85	La Rioja
22	10 ⁻⁴	79279/85	La Rioja
23	10 ⁻⁴	19/87	Pamplona
24	10 ⁻⁶	80041/86	Pamplona
25	10 ⁻⁵	89595/86	Pamplona
26	10 ⁻⁶	80238/86	Pamplona
27	10 ⁻⁴	89460/86	Pamplona
28	10 ⁻⁵	19/87	Pamplona

29	10^{-4}	89542/86	Pamplona
30	10^{-4}	80063/86	Pamplona
31	10^{-6}	80063/86	Pamplona
32	10^{-3}	89542/86	Pamplona
33	10^{-5}	89542/86	Pamplona
34	10^{-2}	2216/80	Murcia
35	10^{-5}	88825/86	Murcia
36	10^{-4}	88158/86	Murcia
37	10^{-3}	2268/80	Murcia
38	10^{-5}	80371/86	Murcia
39	10^{-5}	80441/86	Murcia
40	10^{-6}	136/87	Guadalajara
41	10^{-4}	89015/86	Guadalajara
42	10^{-3}	88736/86	Guadalajara
43	10^{-4}	89354/86	Guadalajara
44	10^{-4}	89043/86	Guadalajara
45	10^{-4}	88158/86	Guadalajara
46	10^{-4}	89459/86	Guadalajara
47	10^{-3}	89328/86	Guadalajara
48	10^{-5}	79678/85	Burgos
49	10^{-5}	80253/86	Burgos
50	10^{-9}	79279/85	Burgos
51	10^{-4}	78041/85	Burgos
52	10^{-6}	78299/85	Burgos
53	10^{-6}	80238/86	Burgos
54	10^{-5}	78863/85	Burgos
55	10^{-5}	79133/85	Burgos
56	10^{-5}	78881/85	Burgos
57	10^{-5}	79672/85	Burgos
58	10^{-6}	78099/85	Burgos
59	10^{-5}	89022/86	Burgos
60	10^{-n}	89043/86	Burgos
61	10^{-9}	89031/86	Burgos

62	10^{-4}	89015/86	Burgos
63	10^{-6}	80544/86	Burgos
64	10^{-7}	88736/86	Burgos
65	10^{-5}	86946/86	Burgos
66	10^{-6}	80441/86	Burgos
67	10^{-5}	88523/86	Burgos
68	10^{-4}	80523/86	Burgos
69	10^{-6}	80371/86	Burgos
70	10^{-3}	78041/85	Vizcaya
71	10^{-4}	78863/85	Vizcaya
72	10^{-4}	80041/86	Vizcaya
73	10^{-5}	80063/86	Vizcaya
74	10^{-5}	80253/86	Vizcaya
75	10^{-3}	80371/86	Vizcaya
76	10^{-4}	80441/86	Vizcaya
77	10^{-5}	80544/86	Vizcaya
78	10^{-4}	86946/86	Vizcaya
79	10^{-4}	88158/86	Vizcaya
80	10^{-5}	88523/86	Vizcaya
81	10^{-6}	88825/86	Vizcaya
82	10^{-4}	89015/86	Vizcaya
83	10^{-3}	89022/86	Vizcaya
84	10^{-5}	89033/86	Vizcaya

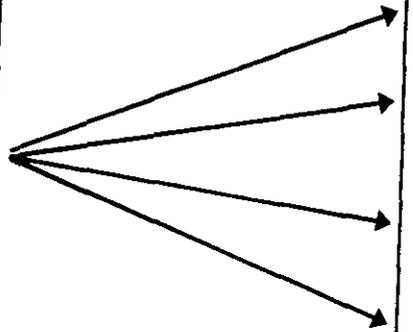
Esquema 5. AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS SALVAJES EN UNA MUESTRA DE AGUA DE MURCIA: PRIMER PASE DE PURIFICACION.



Esquema 6. BACTERIOFAGOS SALVAJES AISLADOS EN UNA MUESTRA DE AGUA DE MURCIA: SEGUNDO PASE DE PURIFICACION

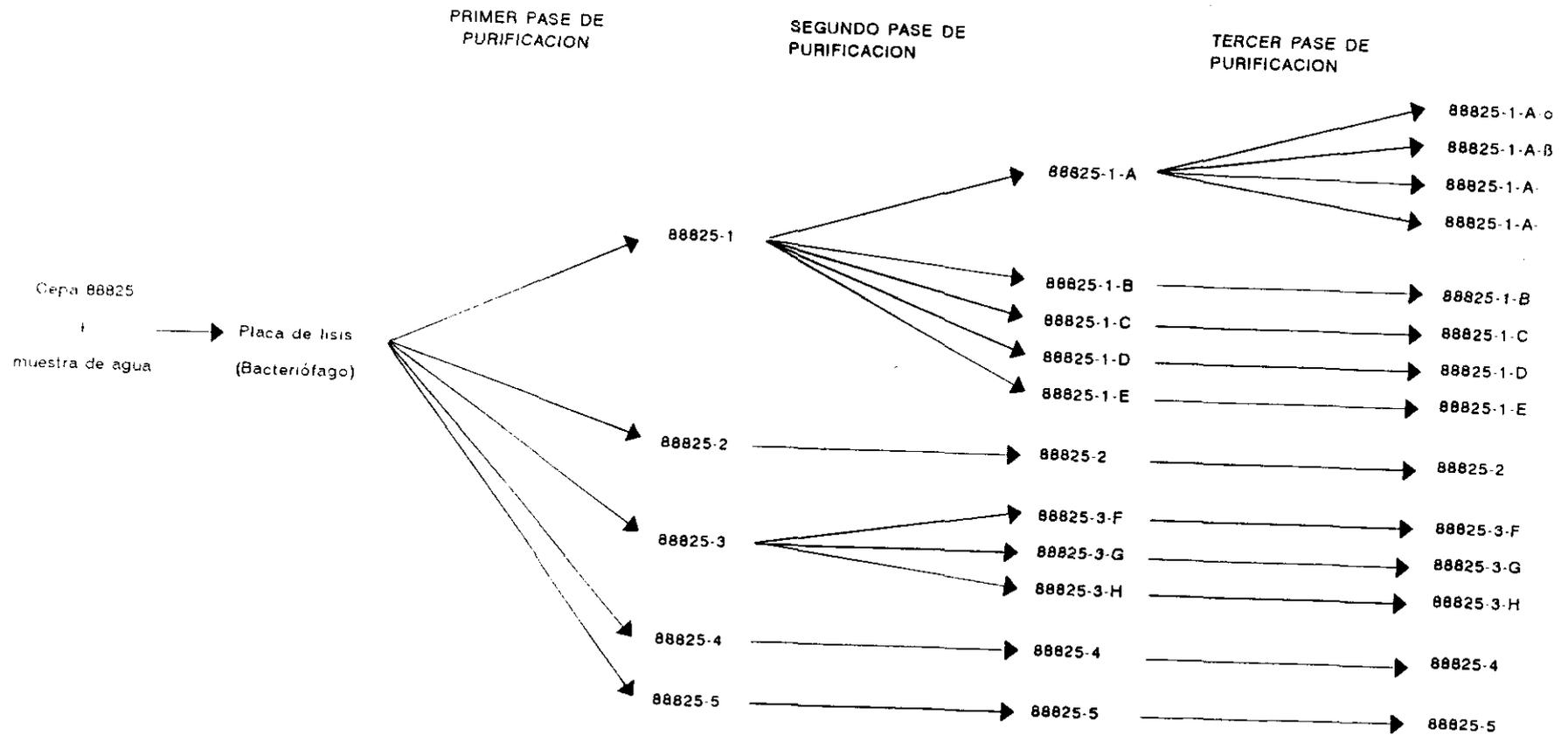
PLACAS DE LISIS PRIMER PASE	SEGUNDO PASE DE PURIFICACION	NUEVAS PLACAS DE LISIS AISLADAS	CARACTERES MORFOLOGICOS
88825-1		88825-1-A	Grande, rugosa, halo
		88825-1-B	Grande, lisa, halo
		88825-1-C	Pequeña, rugosa, no halo
		88825-1-D	Pequeña, rugosa, halo
		88825-1-E	Grande, lisa, no halo
88825-2		88825-2	Pequeña, lisa, no halo
88825-3		88825-3-F	Grande, rugosa, no halo
		88825-3-G	Pequeña, lisa, halo
		88825-3-H	Pequeña, rugosa, no halo
88825-4		88825-4	Pequeña, rugosa, no halo
88825-5		88825-5	Pequeña, lisa, halo

Esquema 7. BACTERIOFAGOS SALVAJES AISLADOS EN UNA MUESTRA DE AGUA DE MURCIA: TERCER PASE DE PURIFICACION.

PLACA DE LISIS SEGUNDO PASE	TERCER PASE DE PURIFICACION	NUEVAS PLACAS DE LISIS AISLADAS	CARACTERES MORFOLOGICOS
88825-1-A		88825-1-A-o	Grande, lisa, halo
		88825-1-A-β	Grande, rugosa, halo
		88825-1-A-.	Pequeña, rugosa, halo
		88825-1-A- .	Pequeña, rugosa, no halo

El resto de las placas de lisis conservaron su morfología en el tercer pase de purificación.

Esquema 8. BACTERIOFAGOS SALVAJES AISLADOS EN UNA MUESTRA DE AGUA DE MURCIA. ESTUDIO COMPLETO.



1.2.1.3 Fagotipia Grupo Primero y Tercero, subgrupo B

En un principio, como ya se ha indicado con anterioridad, se aislaron 600 bacteriófagos en la provincia de Murcia. Estos, al ser enfrentados tres veces a las cepas del Grupo Primero y Tercero, subgrupo B, mostraron estabilidad lítica 7. Estos fueron tan solo los bacteriófagos seleccionados (tabla 9).

TABLA 9. PRIMERA SELECCION DE BACTERIOFAGOS SALVAJES. PROVINCIA DE MURCIA.

BACTERIOFAGO	CEPA PROPAGADORA	RTD	PROCEDENCIA MUESTRA
1	88158	10^{-7}	Entrada depuradora
2	80441	10^{-7}	Alcantarillado urbano
3	2216	10^{-4}	Alcantarillado urbano
4	88825	10^{-4}	Entrada depuradora
5	88825	10^{-4}	Entrada depuradora
6	80371	10^{-6}	Alcantarillado urbano
7	89043	10^{-3}	Entrada depuradora

Todos estos pasos seguidos con las muestras de la provincia de Murcia, se hicieron de igual manera con cada una de las 16 muestras de las 8 provincias seleccionadas, dando como resultado un grupo de 84 bacteriófagos (tabla 8).

1.2.2 Segunda selección.

Se hizo a partir del grupo de 84 bacteriófagos obtenidos en la primera selección.

1.2.2.1 Cepas Salmonella serotipo Enteritidis.

Las cepas usadas en esta selección fueron las pertenecientes a los Grupos Primero y Tercero (subgrupos A y B).

Se emplearon fundamentalmente para la propagación y confirmación del RTD de los 84 bacteriófagos obtenidos en la primera selección y, posteriormente, para su fagotipia con los nuevos bacteriófagos seleccionados.

1.2.2.2 Criterios de selección.

La segunda selección se basa fundamentalmente en los criterios de reproducibilidad y conservación del RTD de los bacteriófagos.

Los 84 bacteriófagos previamente seleccionados fueron propagados y, posteriormente, se verificó su RTD en sus cepas propagadoras. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 16 bacteriófagos presentaban anomalías durante el proceso de propagación: 5 no eran reproducibles, morían en la propagación, 3 modificaban completamente su patrón lítico con respecto al que tenían antes de ser propagados y 8 presentaban un título muy bajo (menor de 10^7). Al no cumplir las condiciones de marcador epidemiológico, este grupo de 16 bacteriófagos fue rechazado. Dichos bacteriófagos fueron: 21, 26, 32, 36, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 61, 64 y 69.

- 12 bacteriófagos que en un principio presentaban buena capacidad de propagación y elevado RTD, fueron rechazados porque perdían título al ser conservados a 4°C para su uso posterior. Esto se comprobó enfrentando estos bacteriófagos a sus cepas propagadoras en tres ocasiones. Se pudo ver que la lectura disminuía considerablemente en cada enfrentamiento e incluso algunos no presentaban lisis en la tercera ocasión. Los bacteriófagos rechazados por este motivo fueron: 4, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 34, 51, 66, 67 y 68.

Tras esta segunda selección el número de bacteriófagos se vio reducido a 56.

1.2.3 Tercera selección.

Se hizo a partir del grupo de 56 bacteriófagos obtenidos de la selección anterior.

1.2.3.1 Cepas Salmonella serotipo Enteritidis.

Las cepas usadas en este paso fueron: Grupo Primero y Tercero, Subgrupo A.

Se emplearon fundamentalmente para fagotipia con los bacteriófagos resultantes de la selección anterior.

1.2.3.2 Criterios de selección.

Esta selección se basa en la diferencia de lectura de los resultados entre los distintos bacteriófagos seleccionados.

Los 56 bacteriófagos seleccionados se enfrentaron a sus cepas propagadoras tres veces consecutivas. Tras un análisis muy detallado de la lectura de los resultados, se comprobó que había bacteriófagos que presentaban características similares entre sí.

Para poder realizar un mejor estudio comparativo entre ellos se decidió reunir los bacteriófagos en grupos homogéneos. Finalmente, se establecieron tres grupos:

Grupo A: Bacteriófagos con patrón lítico estable.

Formado por 22 bacteriófagos reunidos, a su vez, en 8

grupos, cada uno de ellos incluyendo aquellos bacteriófagos que presentaban igual patrón lítico. De cada uno de los 8 grupos se seleccionó un bacteriófago, aquel que presentaba lectura más clara y RTD más alto. Este grupo viene reflejado en la tabla 10.

TABLA 10. TERCERA SELECCION DE BACTERIOFAGOS SALVAJES:

GRUPO A.

SUBGRUPOS	BACTERIOFAGOS	BACTERIOFAGO SELECCIONADO
1	1, 2, 15, 18	1
2	16, 22, 48, 52	16
3	25, 37	25
4	29, 30, 31	29
5	47, 56, 60	47
6	71, 72	72
7	79, 80	79
8	81, 83	81

GRUPO B: Bacteriófagos con lectura baja.

Formado por 19 bacteriófagos que presentaban un patrón lítico similar a otros, pero con lectura considerablemente más baja. Se comprobó su semejanza con otros bacteriófagos probando estos al 10 RTD (10 veces concentrada su dilución de uso). En estas condiciones, los bacteriófagos aumentaban su lectura siendo, como se preveía, similar a la de otros. Se comprobó también que, probados los bacteriófagos al 100 RTD (100 veces concentrada su dilución de uso) la lectura no sufría

modificaciones. A estos bacteriófagos se les denominó de baja sensibilidad. Fueron rechazados por no tener capacidad de discriminación. Estos bacteriófagos fueron: 9, 17, 20, 23, 24, 53, 54, 55, 57, 58, 62, 65, 70, 73, 74, 75, 77, 78 y 84.

GRUPO C: Bacteriófagos con lectura diferente.

Formado por 14 bacteriófagos con lectura totalmente diferente entre sí y a la de los bacteriófagos de los otros grupos. Estos bacteriófagos son: 3, 10, 12, 13, 19, 28, 33, 35, 39, 40, 59, 63, 76, y 82.

El número final de bacteriófagos que quedó tras esta tercera selección fue de 22, estando formado por 8 bacteriófagos del grupo A y 14 del grupo C. El grupo B fue enteramente rechazado. La tabla 11 muestra los bacteriófagos seleccionados.

TABLA 11. TERCERA SELECCION DE BACTERIOFAGOS SALVAJES.
BACTERIOFAGOS SELECCIONADOS.

BACTERIOFAGO	RTD	CEPA PROPAGADORA /AÑO
1	10^{-7}	79279/85
3	10^{-4}	79279/85
10	10^{-5}	78881/85
12	10^{-6}	79133/85
13	10^{-5}	78299/85
16	10^{-4}	78099/85
19	10^{-6}	361/87
25	10^{-5}	89595/86
28	10^{-4}	19/87
29	10^{-4}	89542/86
33	10^{-5}	89542/86
35	10^{-5}	88825/86
39	10^{-5}	80441/86
40	10^{-6}	136/87
47	10^{-3}	89328/86
59	10^{-5}	89022/86
63	10^{-6}	80544/86
72	10^{-4}	80041/86
76	10^{-4}	80441/86
79	10^{-4}	88158/86
81	10^{-6}	88825/86
82	10^{-4}	89015/86

1.2.4 Cuarta selección.

Se realizó a partir del grupo de 22 bacteriófagos seleccionados en el proceso anterior.

1.2.4.1 Cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.

Las cepas utilizadas en esta selección fueron las pertenecientes a los Grupos Tercero (Subgrupos A y B) y Cuarto.

Se emplearon para fagotipia con el grupo de bacteriófagos anteriormente seleccionados. La fagotipia se repitió tres veces.

1.2.4.2 Criterios de selección.

Se basan en la tipabilidad y poder discriminatorio de los bacteriófagos seleccionados.

Los resultados de la fagotipia se estudiaron detalladamente, repitiendo en ocasiones la fagotipia de aquellas cepas que presentaban fagotipos diferentes, para su comprobación definitiva. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 8 bacteriófagos presentaban, en las 1500 cepas, diferencias muy pequeñas en su lectura, (lecturas entre SCL y CL). Su poder discriminatorio no era bueno. Estos fueron: 1, 16, 29, 59, 72, 76, 79 y 81. Su lectura era semejante al bacteriófago 1 del juego autóctono (133).
- 3 bacteriófagos: 25, 33 y 82, presentaban lectura semejante al 3 pero más baja.
- 4 bacteriófagos presentaban lectura semejante al 10 pero mas baja. Estos fueron: 28, 39, 47 y 63. Su lectura, probados al 10 RTD, no variaba.

Todos estos bacteriófagos quedaron eliminados del juego final por no aportar mayor discriminación al grupo.

1.2.5 Selección final de bacteriófagos de procedencia salvaje

El juego de bacteriófagos de procedencia salvaje finalmente constituido consta de 7 bacteriófagos. Se les designó con números romanos correlativamente del I al VII. Esta selección final aparece reflejada en la tabla 12.

TABLA 12. SELECCION FINAL DE BACTERIOFAGOS SALVAJES.

NUMERO ANTERIOR	NUMERO ACTUAL	RTD	CEPA PROPAGADORA /AÑO
3	I	10^{-4}	79279/85
10	II	10^{-5}	78881/85
12	III	10^{-6}	79133/85
13	IV	10^{-5}	78299/85
19	V	10^{-6}	361/87
35	VI	10^{-5}	88825/86
40	VII	10^{-6}	136/87

2 BACTERIOFAGOS LISOGENICOS.

2.1 Inducción de bacteriófagos lisogénicos.

2.1.1 Cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.

Las cepas usadas para la inducción de bacteriófagos lisogénicos son las pertenecientes a los Grupos Primero y segundo.

Del Grupo Primero se indujeron 12 bacteriófagos. Del Grupo Segundo se indujeron 23. Todos ellos de una cepa diferente.

La cepa de la cual se indujo el bacteriófago pasó a ser su cepa propagadora.

2.1.2 Bacteriófagos lisogénicos inducidos.

En total se indujeron 48 bacteriófagos lisogénicos de 150 cepas estudiadas. Estos bacteriófagos fueron numerados correlativamente según se inducían, pero anteponiendo la letra L (de lisogénico) para diferenciarlos de los bacteriófagos salvajes.

Antes de ser purificados fueron de nuevo enfrentados a sus cepas propagadoras para comprobar si habían perdido sus propiedades lisogénicas y habían adquirido propiedades líticas.

Los resultados fueron los siguientes:

- 1.- 19 bacteriófagos, al ser inducidos, sufrieron algún tipo de mutación en su estructura genética confiriéndoles, por ello, propiedades líticas. Al ser de nuevo enfrentados a sus cepas propagadoras, les ocasionaron una lisis. Los datos epidemiológicos de estos bacteriófagos vienen representados en la tabla 13.
- 2.- Los 29 restantes no presentaron acción lítica. Al ser enfrentados a su cepas propagadoras, no ocasionaban en ellas placas de lisis; se incorporaban de nuevo a la estructura genética de la bacteria al no haber perdido su condición de bacteriófago lisogénico durante el

proceso de inducción. Sobre las cepas propagadoras de este grupo se efectuó una segunda inducción para forzar, en los bacteriófagos lisogénicos, una mutación que les convirtiera en fagos líticos. En esta segunda inducción los resultados fueron los mismos, ningún bacteriófago pasó a la forma lítica. Seguidamente se pensó en enfrentarlos, una vez inducidos, a otras cepas que no fueran las propagadoras para ver si frente a ellas sí poseían acción lítica. Para ello se tomaron como muestra 50 cepas de Salmonella serotipo Enteritidis pertenecientes al Grupo Cuarto. Los resultados fueron los siguientes:

- 20 bacteriófagos no presentaban ningún tipo de lisis en las 50 cepas.
- 2 ocasionaban lisis en algunas cepas pero, al ser enfrentados tres veces seguidas a dichas cepas, modificaban su patrón lítico, variando la lectura de una vez a otra.
- 7 ocasionaban igual lectura lítica en las 50 cepas y, al cabo de varios enfrentamientos, perdían su acción lítica.

Como resultado de estos hechos, este grupo de 29 bacteriófagos quedó rechazado.

TABLA 13. BACTERIOFAGOS LI SOGENICOS INDUCIDOS.

BACTERIOFAGO	RTD	CEPA PROPAGADORA /AÑO
L1	10^{-2}	10032/91
L2	10^{-2}	58/92
L3	10^{-5}	62/92
L4	10^{-5}	63/92
L5	10^{-5}	64/92
L6	10^{-5}	65/92
L7	10^{-4}	67/92
L8	10^{-4}	69/92
L9	10^{-6}	71/92
L10	10^{-6}	77/92
L11	10^{-5}	78/92
L12	10^{-5}	80/92
L13	10^{-3}	82/92
L14	10^{-6}	84/92
L15	10^{-5}	86/92
L16	10^{-5}	87/92
L17	10^{-5}	88/92
L18	10^{-6}	89/92
L19	10^{-4}	90/92

2.1.3 Primera selección de bacteriófagos lisogénicos.

Se hizo a partir del grupo de 19 bacteriófagos con acción lítica. Se les numeró correlativamente del 1 al 19 anteponiendo la letra L.

2.1.3.1 Cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.

Los grupos de cepas usadas este proceso de selección de bacteriófagos lisogénicos fueron: Grupo Primero, Grupo Segundo y Grupo Tercero (subgrupo B).

2.1.3.2 Criterios de selección.

Se aplicaron en este caso los criterios de estabilidad lítica y conservación de título.

Se efectuaron con el grupo de 19 bacteriófagos los tres pases de purificación, no presentando ninguna modificación morfológica de sus placas de lisis. Se consideró, por tanto, que de cada cepa solo se había inducido un bacteriófago. Una vez purificados se propagaron y titularon.

Seguidamente se enfrentaron, en tres ocasiones, a las 50 cepas del grupo primero, a las 100 cepas del Grupo Segundo y a las 9 cepas del grupo tercero (subgrupo B), mostrando los

siguientes resultados:

- 2 bacteriófagos (L6 y L17) mostraban gran inestabilidad en sus patrones líticos, presentando diferentes lecturas en cada enfrentamiento, motivo por el cual fueron rechazados.
- 2 bacteriófagos (L1 y L2) perdían título al conservarse en nevera a 4°C para su posterior uso. Fueron también rechazados.

El número inicial de bacteriófagos inducidos quedó reducido a 15. Esta selección viene reflejada en la tabla 14.

TABLA 14. BACTERIOFAGOS LISOGENICOS: PRIMERA SELECCION.

BACTERIOFAGO	RTD	CEPA PROPAGADORA /AÑO
L3	10^{-5}	62/92
L4	10^{-5}	63/92
L5	10^{-5}	64/92
L7	10^{-4}	67/92
L8	10^{-4}	69/92
L9	10^{-6}	71/92
L10	10^{-6}	77/92
L11	10^{-5}	78/92
L12	10^{-5}	80/92
L13	10^{-3}	82/92
L14	10^{-6}	84/92
L15	10^{-5}	86/92
L16	10^{-5}	87/92
L18	10^{-6}	89/92
L19	10^{-4}	90/92

2.1.4 Segunda selección de bacteriófagos inducidos:
Selección final

Se efectuó a partir del grupo de 15 bacteriófagos obtenidos en la selección anterior.

2.1.4.1 Cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.

Las cepas usadas en esta segunda selección de bacteriófagos lisogénicos fueron las pertenecientes a los Grupos Tercero (subgrupos A y B) y Cuarto.

2.1.4.2 Criterios de selección.

Se aplicó, en esta segunda selección, el criterio de mayor poder de discriminación.

El grupo de 15 bacteriófagos fue enfrentado a las cepas de los grupos anteriormente mencionados, en tres ocasiones. Los resultados fueron los siguientes:

- 10 bacteriófagos presentaban igual patrón lítico frente a todas las cepas estudiadas.
- 3 bacteriófagos presentaban igual patrón lítico que algún bacteriófago salvaje anteriormente seleccionado.

Finalmente, del grupo de 15 bacteriófagos fueron seleccionados dos porque eran los únicos que aportaban discriminación al grupo de bacteriófagos salvajes anteriormente seleccionados. Estos fueron el L10 y L11. Se les numeró correlativamente con los bacteriófagos salvajes seleccionados, pasando a ser los números VIII y IX. En la tabla 15 vienen reflejados sus datos epidemiológicos.

TABLA 15. BACTERIOFAGOS INDUCIDOS. SELECCION FINAL.

BACTERIOFAGO	NUMERO ACTUAL	RTD	CEPA PROPAGADORA /AÑO
L10	VIII	10^{-6}	77/92
L11	IX	10^{-5}	78/92

3 BACTERIOFAGOS DE JUEGOS ALTERNATIVOS.

3.1 Cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.

Las cepas usadas para la selección de bacteriófagos de juegos alternativos fueron las pertenecientes a los Grupos Primero y Tercero (subgrupos A y B).

3.2 Selección de bacteriófagos de juegos alternativos.

Los juegos de bacteriófagos alternativos probados en este trabajo pertenecen a esquemas de fagotipia para otros

microorganismos de características similares a Salmonella.

Estos son:

- Juego de bacteriófagos para fagotipia de Pseudomona.
- Juego de bacteriófagos para fagotipia de Serratia.
- Juego de bacteriófagos para fagotipia de Typhimurium.
- Juego de bacteriófagos para fagotipia de Salmonella serotipo Enteritidis autóctono de Hungría.

La descripción de estos juegos viene reflejada en el apartado de Material y Métodos.

El objetivo de la utilización de estos bacteriófagos era la posible incorporación de alguno de ellos a nuestro juego de bacteriófagos para aumentar su poder de discriminación.

Cada uno de estos juegos fue probado con los grupos de cepas seleccionadas. Los resultados fueron los siguientes:

- Los juegos para Serratia y Pseudomonas no producían lisis en las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis.
- El juego para Salmonella serotipo Typhimurium producía una lisis tipo CL en todas las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis estudiadas, salvo en las cepas del Grupo Tercero subgrupo A (no tipables por el esquema

autóctono), que tampoco eran lisadas por este juego de bacteriófagos.

- El juego autóctono de Hungría para Salmonella serotipo Enteritidis ocasionaba una lectura idéntica en todas las cepas, semejante al fagotipo A del esquema autoctono, pero con una lectura más baja. Sus bacteriófagos fueron nuevamente probados frente a las cepas seleccionadas, pero a una concentración mayor (10 RTD); la lectura fue la misma.

A la vista de los resultados se rechazó la incorporación de bacteriófagos de estos juegos al nuestro, ya que no mejoraban su eficacia y discriminación.

4 SELECCION DE BACTERIOFAGOS DEL JUEGO AUTOCTONO.

El juego de bacteriófagos autóctono para Salmonella serotipo Enteritidis elaborado en estudios anteriores en nuestro laboratorio fue la base para el desarrollo del nuevo esquema de fagotipia. Uno de los objetivos principales que se plantearon al inicio de este trabajo fue la incorporación de nuevos bacteriófagos al esquema autóctono, que aumentaran su poder de discriminación.

Una vez finalizados los procesos de selección de

bacteriófagos salvajes y lisogénicos explicados con anterioridad, se procedió a realizar una fagotipia conjunta a las cepas de los Grupos Primero y Tercero con el grupo de bacteriófagos formado por: los bacteriófagos del juego autóctono anterior y los nuevos bacteriófagos seleccionados.

Como en todos los demás casos, la fagotipia se repitió en tres ocasiones para confirmar la estabilidad de los resultados.

Los resultados fueron los siguientes:

- A.- El bacteriófago 1 del juego autóctono era el único que presentaba una lisis tipo confluyente en todas las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis. Ninguno de los nuevos bacteriófagos seleccionados presentaba esta característica.
- B.- El bacteriófago 2 del juego autóctono presentaba unos patrones líticos semejantes al bacteriófago III de los seleccionados en este trabajo, pero sus placas de lisis eran más claras y su RTD más elevado.
- C.- El resto de los bacteriófagos del juego autóctono presentaban unos patrones de lisis semejantes a alguno de los nuevos bacteriófagos seleccionados, pero su poder de discriminación y su RTD era más bajo.

En vista de estos resultados, se decidió:

- 1.- Seleccionar el bacteriófago número 1 del juego autóctono, que produce lisis en todas las cepas tipables de Salmonella serotipo Enteritidis.
- 2.- Seleccionar el bacteriófago número 2 del juego autóctono, por presentar mejores condiciones para la fagotipia que el bacteriófago III.
- 3.- Rechazar el resto de los bacteriófagos del juego autóctono que presentaran características comunes con algún bacteriófago de los nuevos, ya que el poder de discriminación y el RTD de estos eran mejores.

Finalmente, quedó estructurado un nuevo juego de bacteriófagos formado por los nuevos bacteriófagos seleccionados en este trabajo, salvo el número III, y la incorporación de dos bacteriófagos del juego autóctono.

Al bacteriófago número 1 del juego autóctono se le dio el número X y al número 2 se le dio el número III ya que era a éste al que sustituía. Los datos epidemiológicos de estos bacteriófagos vienen representados en la tabla 16.

TABLA 16. BACTERIOFAGOS DEL JUEGO AUTOCTONO SELECCIONADOS.

NUMERO ANTERIOR	NUMERO ACTUAL	RTD	CEPA PROPAGADORA /AÑO
1	X	10^{-7}	2215/80
2	III	10^{-8}	2267/80

5 JUEGO DE BACTERIOFAGOS SELECCIONADO.

Finalmente, el juego de bacteriófagos propuesto en este trabajo consta de 10 bacteriófagos:

- 6 bacteriófagos de origen salvaje.
- 2 bacteriófagos de origen lisogénico.
- 2 bacteriófagos del juego de bacteriófagos autóctono.

A los bacteriófagos del juego se les designó con números romanos del I al X. Todos estos bacteriófagos fueron propagados y titulados para ser usados posteriormente en la fagotipia de las cepas del Grupo Cuarto y el grupo de brotes.

En la tabla 17 aparece reflejado este juego de bacteriófagos, indicando su origen y su nuevo RTD.

En la tabla 18 aparecen las características morfológicas de las placas de lisis de cada bacteriófago.

TABLA 17. JUEGO DE BACTERIOFAGOS.

NUMERO ACTUAL	RTD	CEPA PROPAGADORA /AÑO	PROCEDENCIA
I	10^{-9}	79279/85	Salvaje
II	10^{-9}	78881/85	Salvaje
II	10^{-8}	2267/80	Juego autóctono
IV	10^{-6}	78299/85	Salvaje
V	10^{-5}	361/87	Salvaje
VI	10^{-7}	88825/86	Salvaje
VII	10^{-8}	136/87	Salvaje
VIII	10^{-5}	77/92	Lisogénico
IX	10^{-5}	78/92	Lisogénico
X	10^{-7}	2215/80	Juego autóctono

TABLA 18. JUEGO DE BACTERIOFAGOS: CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS PLACAS DE LISIS.

BACTERIOFAGO	CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS
I	rugosa, grande, halo
II	rugosa, pequeña, no halo
III	rugosa, grande, halo
IV	rugosa, grande, halo
V	rugosa, mediana, no halo
VI	lisa, pequeña, no halo
VII	lisa, mediana, halo
VIII	lisa, pequeña, no halo
IX	lisa, grande, halo
X	rugosa, grande, halo

6 ESQUEMA DE FAGOTIPIA.

Con el juego de 10 bacteriófagos finalmente constituido se fagotiparon las cepas pertenecientes al Grupo Cuarto, formado por 1500 aislados de cepas de Salmonella serotipo Enteritidis. Se repitió el proceso, como es habitual, tres veces, para confirmar la estabilidad de los resultados.

Finalmente, se confirmó la presencia de 10 fagotipos.

A cada fagotipo se le designó con un número, ordenados correlativamente del 1 al 10 según su frecuencia de aparición, de mayor a menor.

En la tabla 19 viene representado el patrón lítico del juego de bacteriófagos.

El número de cepas pertenecientes a cada fagotipo viene indicado en la tabla 20.

El porcentaje de cepas no tipables por este esquema fue muy bajo (0,77%).

TABLA 19. ESQUEMA DE FAGOTIPIA

BACTERIOFAGOS										
FAGOTIPO	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl
2	-	-	++	+++	-	scl	-	-	-	cl
3	-	-	-	-	-	scl	-	-	-	cl
4	-	-	++	scl	scl	-	-	-	-	cl
5	-	-	-	scl	-	scl	-	-	-	cl
6	-	-	++	-	-	scl	-	-	-	cl
7	-	-	-	-	-	-	-	cl	+++	cl
8	-	+	±	-	±	-	ol	+	-	cl
9	-	-	++	scl	scl	+++	-	-	-	cl
10	-	-	++	scl	-	-	-	-	-	cl
No tipable	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 20. DISTRIBUCION DE LAS CEPAS ESTUDIADAS POR FAGOTIPOS

FAGOTIPO	CEPAS TIPADAS	
	NUMERO	PORCENTAJE
1	960	61,60
2	440	28,20
3	80	5,10
4	40	2,50
5	10	0,60
6	4	0,25
7	3	0,19
8	3	0,19
9	2	0,12
10	2	0,12
No tipable	12	0,97

7 APLICACION DEL ESQUEMA DE FAGOTIPIA A BROTES.

Para comprobar la utilidad y eficacia del nuevo esquema de fagotipia, fue aplicado a un grupo de 8 brotes de gastroenteritis por Salmonella serotipo Enteritidis.

Se seleccionaron estos brotes por disponer, en cada uno de ellos, de muestras de enfermo del alimento contaminado y, en caso de existir, de muestras del portador asintomático causante del brote.

En la tabla 7 del apartado de Material y Métodos

aparecen reflejados los datos epidemiológicos de estos brotes.

Tras la fagotipia de las 42 cepas que componían el grupo de brotes, los resultados fueron los siguientes:

- Todas las cepas asociadas a un brote, ya hubieran sido aisladas de heces del enfermo, del portador o de una muestra del alimento contaminado, presentaban la misma lectura correspondiente a un fagotipo de nuestro esquema.
- De los 8 brotes estudiados, 7 pertenecían al fagotipo 1 y uno al fagotipo 3.

En la tabla 21 vienen representados los fagotipos de los 8 brotes.

TABLA 21. FAGOTIPOS DEL GRUPO DE BROTES.

BROTE	Nº DE CASOS	FAGOTIPO
1	12	1
2	36	1
3	5	1
4	49	3
5	40	1
6	15	1
7	9	1
8	56	1

DISCUSSION

1 FAGOTIPIA COMO MARCADOR EPIDEMIOLOGICO COMPLEMENTARIO.

Basándose en la eficacia de la fagotipia como marcador epidemiológico complementario para otros serotipos de Salmonella, tal es el caso de los serotipos Typhi y Typhimurium, se decidió configurar un esquema de fagotipia para Salmonella serotipo Enteritidis.

Un primer trabajo en este sentido dio como resultado la formación de un esquema autóctono de fagotipia (133). Tras ser probado durante 6 años con cepas de Salmonella serotipo Enteritidis remitidas a nuestro laboratorio para su estudio, se terminó de confirmar la fagotipia como un rápido y económico método de discriminación de estas cepas.

Este esquema autóctono presentaba una alta tipabilidad, pero el gran predominio de dos fagotipos (A y B) hizo que se siguiera trabajando en el aislamiento de nuevos bacteriófagos capaces de subdividirlos.

Basado en este primer esquema de fagotipia se ha configurado uno nuevo que ha mejorado la tipabilidad y discriminación del anterior.

Este nuevo esquema está formado por la combinación de los dos tipos de fagotipia: fagotipia directa (bacteriófagos salvajes) y fagotipia inversa (bacteriófagos lisogénicos).

Ambas fagotipias presentan una serie de ventajas y de inconvenientes pero, según se comprobó, juntas mejoran su eficacia.

La fagotipia directa tiene como ventaja la relativa facilidad en el aislamiento de bacteriófagos salvajes, pero tiene los inconvenientes de lo difícil de su purificación y el escaso poder de discriminación de estos bacteriófagos, por la altísima capacidad lítica que presentan.

La fagotipia inversa tiene, por el contrario, como ventajas la sencillez en la purificación de sus bacteriófagos, ya que de cada célula huésped solo se suele aislar uno, y su buen poder de discriminación; sin embargo, tiene como inconveniente que la inducción de bacteriófagos lisogénicos es muy difícil de conseguir, ya que estos bacteriófagos en raras ocasiones pierden su condición de lisogénicos.

Aprovechando las buenas condiciones de cada una de las dos fagotipias se pudo conseguir un esquema de fagotipia con alta tipabilidad y buen poder de discriminación.

2 BACTERIOFAGOS ADAPTADOS

Este tipo de bacteriofagos se emplean fundamentalmente para mejorar la tipabilidad de un esquema de fagotipia.

Al inicio de este trabajo se pensó en la posibilidad de incorporarlos si fuera necesario, pero una vez configurado el nuevo esquema de fagotipia y después de fagotipar las cepas de los 5 grupos expuestos en el apartado de Material y Métodos, se vio que su tipabilidad era muy buena (solo el 0,97 de las cepas estudiadas eran no tipables), no haciendo necesaria la incorporación de bacteriófagos adaptados.

En futuros estudios con el nuevo esquema de fagotipia incorporado a la rutina del Laboratorio, según se vayan fagotipando de forma habitual las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis recibidas para su estudio, se considerará la posible incorporación de bacteriófagos adaptados si el porcentaje de cepas no tipables aumentara.

3 VALORACION DEL PODER DE DISCRIMINACION DEL NUEVO ESQUEMA DE FAGOTIPIA.

El poder de discriminación de un esquema de fagotipia viene dado por el numero de fagotipos que es capaz de distinguir y el porcentaje de cepas pertenecientes a cada uno de ellos.

El nuevo esquema de fagotipia presenta una aceptable discriminación. El 99,0 de las cepas estudiadas fueron

distribuidas en 9 fagotipos diferentes.

Los fagotipos 1 y 2 son los mayoritarios; juntos representan el 89,80% de las cepas estudiadas (Tabla 20). Aunque este porcentaje es alto, mejora el poder de discriminación del esquema anterior, ya que los fagotipos A y B constituían el 94,3 de las cepas estudiadas.

Para confirmar el mayor poder de discriminación del nuevo esquema de fagotipia se realizó, en cepas del fagotipo A del esquema anterior, una fagotipia con los bacteriofagos del esquema nuevo. Los resultados fueron muy satisfactorios pues subdividía las cepas del fagotipo A en tres fagotipos del nuevo esquema. Estos fagotipos fueron el 2, 4 y 7.

Sin embargo el predominio de los fagotipos 1 y 2 hace necesario determinar si esta circunstancia se debe a un escaso poder de discriminación del esquema o a la presencia de cepas similares en España, como parece ser que sucede con otros esquemas autóctonos en otros países, como en Inglaterra con el fagotipo 4 y en USA con el fagotipo 8, según Ward (153).

Para aclarar esta circunstancia y poder seguir trabajando en la mejora del nuevo esquema de fagotipia sería necesaria la comparación con los esquemas de fagotipia vigentes en otros países, con objeto de elaborar uno de aplicación general que mejorara la vigilancia epidemiológica

de las gastroenteritis por este microorganismo.

4 TIPADO DE BROTES CON EL NUEVO ESQUEMA DE FAGOTIPIA.

Todas las cepas asociadas a un mismo brote pertenecían al mismo fagotipo (Tabla 21), lo que indica la probabilidad de que las cepas estudiadas pertenezcan al mismo brote. En el caso del brote numero 3 ocasionado por cepas pertenecientes a un fagotipo no mayoritario, la probabilidad de que todas las cepas estudiadas sean del mismo brote aumenta considerablemente.

5 VALORACION COMPARATIVA DE LOS BACTERIOFAGOS QUE COMPONEN EL NUEVO ESQUEMA DE FAGOTIPIA.

El nuevo esquema de fagotipia consta de 10 bacteriófagos, 6 de origen salvaje, 2 de origen lisogénico y 2 pertenecientes al esquema autóctono anterior (Tabla 17).

Del anterior esquema autóctono (133) se seleccionaron tan solo 2 bacteriofagos, ya que la práctica acumulada tras 6 años de fagotipar cepas de Salmonella serotipo Enteritidis con este esquema, demostró que el resto de los bacteriofagos no eran suficientemente estables.

Los 10 bacteriófagos que componen el nuevo esquema de fagotipia discriminan las cepas en 9 fagotipos por las diferentes lecturas que en ellas producen, pero se puede establecer un criterio de familiaridad entre alguno de ellos. Este criterio de familiaridad se ha establecido en razón a la semejanza en el tipo de lisis que presentan en determinados fagotipos. Estos bacteriófagos son:

- Bacteriófagos II y VII. Ambos bacteriófagos presentan lisis tan solo en las cepas del fagotipo 1 y del fagotipo 8. La lisis que producen en las cepas del fagotipo 1 es del tipo c1, mientras que la que presentan en las del fagotipo 8 es una lisis de lectura muy baja en el caso del bacteriófago I (+), y muy alta en el caso del bacteriófago VII (ol). Se probó el bacteriófago I al 10 RTD para ver si aumentaba su lectura en las cepas del fagotipo 8; al no presentar modificaciones, ambos bacteriófagos se consideraron diferentes (Tabla 22).

- Bacteriófagos VIII y IX. Ambos bacteriófagos son de procedencia lisogénica, presentan lisis tipo confluyente en las cepas del fagotipo 1 y del fagotipo 7 una lisis muy cercana ,tipo c1 para el bacteriófago VIII y +++ para el bacteriófago IX. La diferencia entre ellos radica en el fagotipo 8, ya que el bacteriófago VIII produce una lectura de + y el bacteriófago IX no provoca ninguna lisis. Para confirmar la diferencia entre ellos se probó el bacteriófago IX al 10 RTD sobre cepas del

grupo cuarto, no modificando su lectura. Ambos bacteriófagos se consideraron, por tanto, diferentes (Tabla 23).

El resto de los bacteriófagos presentan lecturas totalmente diferentes entre sí.

TABLA 22. VALORACION COMPARATIVA BACTERIOFAGOS II Y VII.

FAGOS	FAGOTIPOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
II	cl	-	-	-	-	-	-	+	-	-
VII	cl	-	-	-	-	-	-	ol	-	-

TABLA 23. VALORACION COMPARATIVA BACTERIOFAGOS VIII Y IX.

FAGOS	FAGOTIPOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
VIII	cl	-	-	-	-	-	cl	+	-	-
IX	cl	-	-	-	-	-	+++	-	-	-

6 VALORACION COMPARATIVA DE LOS FAGOTIPOS QUE COMPONEN EL NUEVO ESQUEMA DE FAGOTIPIA.

Como ya se ha expuesto en el apartado de resultados, todas las cepas de Salmonella serotipo Enteritidis estudiadas, excepto las no tipables, se pueden clasificar en 9 fagotipos distintos según el nuevo esquema de fagotipia.

Aunque entre estos fagotipos existen claras diferencias, se puede establecer un criterio de semejanza entre varios de ellos. Estos fagotipos son los 2, 4 y 9. El fagotipo 9 es el que presenta una lectura mas alta. Las cepas pertenecientes a los fagotipos 2 y 4 fueron fagotipadas con los bacteriófagos al 10 RTD para ver su cercanía al fagotipo 9. Su lectura no se modificó. Se consideraron, por tanto, 3 fagotipos diferentes. La tabla 24 refleja tanto la semejanza como la clara diferencia entre ellos.

Entre el resto de los fagotipos no se pudo establecer ningún tipo de valoración comparativa.

TABLA 24. VALORACION COMPARATIVA FAGOTIPOS 2, 4 Y 9.

FAGT.	BACTERIOFAGOS									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
2	-	-	++	+++	-	scl	-	-	-	cl
4	-	-	++	scl	scl	-	-	-	-	cl
9	-	-	++	scl	scl	+++	-	-	-	cl

7 VALORACION COMPARATIVA ENTRE LOS BACTERIOFAGOS DEL JUEGO DE FAGOTIPIA AUTOCTONO ANTERIOR Y EL NUEVO.

Como ya se indicó en el apartado de resultados, los bacteriófagos III y IX del nuevo esquema de fagotipia son bacteriófagos aportados por el juego autóctono anterior. Corresponden a los bacteriófagos 2 y 1, respectivamente.

A excepción de estos bacteriofagos, por tratarse de los mismos, se puede realizar un estudio comparativo entre varios bacteriofagos pertenecientes a ambos esquemas.

La relación que se ha establecido entre los bacteriófagos de ambos juegos se basa fundamentalmente en el tipo y número de placas de lisis que presentan en los distintos fagotipos. Dichos bacteriófagos son:

- Bacteriófagos III y 3: ambos bacteriófagos, salvo en los fagotipos 1 y A respectivamente en los que producen una lisis muy alta, en el resto de los fagotipos su lectura es de tipo ++ ó negativa (Tabla 25).
- Bacteriófagos IV y 4 : ambos bacteriófagos pasan de producir unas lecturas muy altas (tipo cl, scl y +++) en algunos fagotipos a no provocar ningún tipo de lisis en otros (Tabla 26).

TABLA 25. VALORACION COMPARATIVA BACTERIOFAGOS III Y 3.

		FAGOTIPOS									
BACT.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
III		cl	++	-	++	-	++	-	±	++	++

		FAGOTIPOS								
BACT.		A	B	C	D	E	F	G	H	I
3		scl	-	++	-	-	-	-	-	++

TABLA 26. VALORACION COMPARATIVA BACTERIOFAGOS IV Y 4.

		FAGOTIPOS									
BACT.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IV		cl	+++	-	scl	scl	-	-	-	scl	scl

		FAGOTIPOS								
BACT.		A	B	C	D	E	F	G	H	I
4		cl	scl	scl	+++	+++	±	cl	-	cl

8 VALORACION COMPARATIVA ENTRE LOS FAGOTIPOS DEL ESQUEMA AUTOCTONO ANTERIOR Y EL NUEVO.

Aunque entre todos los fagotipos pertenecientes a ambos esquemas ha sido comprobada en repetidas ocasiones su clara diferencia, se puede establecer un criterio de semejanza entre alguno de ellos. Los fagotipos implicados son:

- Fagotipos 1 y A: Ambos fagotipos podemos decir que son el mismo. Todas las cepas pertenecientes a ellos son lisadas por todos los bacteriófagos, con una lectura muy alta, tipo cl ó scl. Son, además, los fagotipos mayoritarios en los dos esquemas (Tabla 27).
- Fagotipos 3, B y H: Estos fagotipos presentan muy poca lectura, no en cuanto al tipo de lisis, que es muy alta,

tipo cl ó scl, sino al número de bacteriófagos que producen lectura, tan solo dos en el fagotipo 3 y uno en el fagotipo B (Tabla 28).

- Fagotipos 6, 10 y D: Ambos fagotipos presentan pocos bacteriófagos con lectura y variada. Las lisis oscilan entre ++ y cl (Tabla 29).
- Fagotipos 4, 9 y G: Estos fagotipos presentan lectura en la mitad de sus bacteriófagos. La lisis es variable, entre ++ y cl (Tabla 30).

TABLA 27. VALORACION COMPARATIVA FAGOTIPOS 1 Y A.

		BACTERIOFAGOS									
FAGT.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
1	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	cl	

		BACTERIOFAGOS					
FAGT.	1	2	3	4	5	6	
A	cl	scl	scl	cl	scl	scl	

TABLA 28. VALORACION COMPARATIVA FAGOTIPOS 3, B Y H.

BACTERIOFAGOS										
FAGT.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
3	-	-	-	-	-	scl	-	-	-	cl

BACTERIOFAGOS						
FAGT.	1	2	3	4	5	6
B	-	-	-	scl	-	-
H	-	-	-	-	-	scl

TABLA 29. VALORACION COMPARATIVA FAGOTIPOS 6, 10 Y D.

BACTERIOFAGOS										
FAGT.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
6	-	-	++	-	-	scl	-	-	-	cl
10	-	-	++	scl	-	-	-	-	-	cl

BACTERIOFAGOS						
FAGT.	1	2	3	4	5	6
D	-	-	-	+++	cl	+

TABLA 30. VALORACION COMPARATIVA FAGOTIPOS 9, 4 Y G.

BACTERIOFAGOS										
FAGT.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
4	-	-	++	scl	scl	-	-	-	-	cl
9	-	-	++	scl	scl	+++	-	-	-	cl

BACTERIOFAGOS						
FAGT.	1	2	3	4	5	6
G	-	+++	-	cl	-	scl

CONCLUSIONES

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

Basándose en estos datos se aprecia que Salmonella serotipo Enteritidis es el principal agente causal de gastroenteritis agudas en España, por lo que se hacía imprescindible un estudio epidemiológico más profundo para este serotipo.

Las nuevas metodologías han mejorado tanto la rapidez en el diagnóstico como la capacidad de realizar estudios epidemiológicos.

Un elemento clave de ambos procesos radica en la posibilidad de caracterizar el microorganismo y de determinar que este está asociado con la aparición de la enfermedad o brote epidémico, para lo que se requiere el conocimiento de aquellos atributos únicos que le distingue de los demás, este es el objetivo esencial que tienen los marcadores epidemiológicos.

Al no existir un único marcador epidemiológico complementario reconocido a nivel mundial para Salmonella serotipo Enteritidis se planteó el desarrollo de uno nuevo que subdividiera dicho serotipo y que permitiera hacer un mejor estudio epidemiológico de este microorganismo encaminado a una mayor prevención de las gastroenteritis tan

frecuentes en nuestro país.

En este sentido se eligió la fagotipia, ya que su eficacia ha sido sobradamente probada en otros serotipos de Salmonella tales como Salmonella serotipo Thyphi y Salmonella serotipo Typhimurium.

La fagotipia permite desarrollar un mejor sistema de control, tanto de las fuentes de infección, de la cadena de transmisión de la enfermedad y de la posible persistencia de determinadas cepas en individuos (portadores asintomáticos) y poblaciones.

Del trabajo presentado en la memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- El esquema de fagotipia desarrollado para Salmonella serotipo Enteritidis está formado por bacteriófagos salvajes y lisogénicos. Dicho esquema presenta una alta tipabilidad de las cepas estudiadas (99%) y poder de discriminación. Además es un marcador reproducible y sus bacteriófagos presentan buena capacidad lítica y elevado título.
- 2.- La mejor fuente de aislamiento de los bacteriófagos que componen el esquema de fagotipia son las aguas residuales. Esto puede ser un indicador de la posible presencia de Salmonellas sin que por ello se deduzca que

se encuentren en dosis infectivas. Como consecuencia se podría decir que la presencia de bacteriofagos puede ser un índice de contaminación de las aguas por Salmonella.

- 3.- La aplicación epidemiológica de este esquema de fagotipia demuestra que existen 2 fagotipos mas frecuentes (1 y 2), lo cual puede deberse a la presencia de 2 grupos de cepas mayoritarias en España productoras de toxiinfecciones alimentarias o al todavía escaso poder discriminatorio de este esquema de fagotipia. La comprobación de estas hipótesis se debería realizar en posteriores estudios mediante la comparación con otros métodos de tipificación.

- 4.- El esquema de fagotipia resultó especialmente eficaz en el estudio epidemiológico en los brotes de gastroenteritis aguda por Salmonella serotipo Enteritidis tras una toxiinfección alimentaria. En estos se pudo demostrar la relación epidemiológica entre las cepas aisladas de las distintas fuentes de infección (alimentos contaminados y/o portadores asintomáticos) y las cepas aisladas de los enfermos.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Eduards and Ewing's (1972). "The genus Salmonella".
In: Edwards, P.R. and Ewing, W.H. (eds). Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Pub. New York. 281-334.
- 2) Edelman, R., Levine, M.R. (1986). "Summary of an International workshop on typhoid fever". Rev. Infec. Dis. 8:329-349.
- 3) Germanier, R. (1984). "Typhoid fever". Bacterial Vaccines. Academic Press. New York. 130-137.
- 4) Kauffmann, F. (1930). "Serotypes of the genus Salmonella". Zentralbl. Bakteriol. J. Orig. 119-152.
- 5) Scheiber, W., Nathys, F.K. (1987). "Fiebre tifoidea". Infectio. Historia de las enfermedades infecciosas. Roche Basilea. Suiza. 139-141.
- 6) Milgrom, F., Flanagan, T.D. (1987). "Medical Microbiology". In Milgrom and Flanagan (eds). Churchill Livingstone, New York. 1:302-305.
- 7) Pedro Pons A. (1976). "Gastroenteritis por Salmonella". En Tratado de Patologia y Clinica Medica. Editorial Salvat. 6:292-295.
- 8) Arnon, S.S. et al (1978). "Intestinal infection and toxin

production by Clostridium as one cause of sudden infant death syndrome". Lancet. 1:1273-1277.

- 9) Ashkenazi, S. and Pickering, L.K. (1989). "Pathogenesis and diagnosis of bacterial diarrhea". Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8:203-206.
- 10) Hornick, R.B. (1986). "Infectious Diarrhea Salmonella". In: Sherwood L. Gorbach. Polackwell. Scientific Publications. Boston. 2-30.
- 11) Baquero, G. (1972). "Bacteriología clínica de la fiebre tifoidea y síndromes toxiinfectiosos alimenticios". Rev. San. Hig. Pub. 46:563-614.
- 12) Scgaechter, M., Medoff, G., Schlessinger, D. (1989). Mechanisms of microbiol diseases. Gardner JN, 1st, Williams and Wilkins (eds). Baltimore. 1:268-271.
- 13) Verger, G. (1989). "Enfermedades infecciosas". Ed. DOYMA 1st. Barcelona 128-133.
- 14) Sears, S.D., Ferreccio, C., Levine, M.M. (1986). "Sensitivity of moore sewer swabs for isolating Salmonella Typhi". Appl. Env. Microbiol. 51:4255-426.
- 15) Sears, S.D., Ferreccio, C., Levine, M.M., Cordan, A.M., Monreal, J., Black, R.E., D'Ottone, K., Rowe, B. (1984).

- Chilean typhoid Comitte. "The use of moore swabs for isolation of Salmonella Typhi from irrigation waler in Santiago Chile". J. Infect. Dis. **149**:640-642.
- 16) Nolan,C.H.M., White,P.C. (1978). "Tratamiento de los portadores tíficos con amoxicilina". JAMA **46**:433.
- 17) Alcántara Chacon, F. (1975). "Salmonelosis gastroentéricas y tifoparatíficas". Medicine 2° serie. N°16. Octubre 1978.
- 18) Hook,E.N., Gerrant,R. (1978). "Salmonella Infections". In: Principles of internal Medicine. Harrison's. 8°ed. Mac.Graw-Hill. Capter 14.
- 19) Grande,F., Carmena,R. (1979). "Respuesta metabólica al ayuno y a las enfermedades infecciosas". En: Enfermedades Metabólicas. Medicine 2° serie. **24**:1528.
- 20) Figueroa Egea, J. (1977). "Incidencia y evolución de las infecciones en un hospital de enfermedades infecciosas". Simposium de Enfermedades Hospitalarias. Antibióticos S.A. 333-343.
- 21) Aserkoff,G., Bennett,J.V. (1969). "Effect of antibiotictherapy in acute salmonelosis on the fecal excation of Salmonella". N. Engl. J. Med. **281**:636-640.

- 22) Chapan, P.Y., Mg, W.S., Ling, J., Arnold, K. (1981). "In vitro susceptibility of Salmonella to various antimicrobial agents including a new cephalosporin". Antimicrob. Agents. Chemother. 19:8-11.
- 23) Alos, J.R., Gonzalez Palacios, R., Sanchez Moreno, M.P. y Calderón, P. "Alta frecuencia de elevada resistencia a ampicilina en Salmonella Spp no Typhi". Medicina Clínica. Vol. 955 5:175-177.
- 24) Holmberg, S.D., Well, J.G., Cohen, M.L. (1984). "Animal to men transmission on antimicrobial resistant Salmonella". Investigations of us outbreaks 1975-1983. 225:833-835.
- 25) Mac Donald, K.L., Cohen, M.L., Magrett-Bean, N.T. et al (1987). "Changes in antimicrobial resistance of Salmonella isolated from humans in United States". JAMA. 58:1496-1499.
- 26) Cherubin, C.E., Timoney, J.F., Sierra, M.F., Ma, P., Marr, J., Shin, S.A. (1980). "Sedden decline in ampicilin resistance in Salmonella Typhimurium". JAMA 243:439-442.
- 27) Cherrubin, C.E. (1984). "Antibiotic resistance of Salmonella in Europe and USA". Rev. Infect. Dis. 3:1105-1126.

- 28) Mensa, J., Moreno, A., Segura, F. et al (1989). "Enteritis aguda por Salmonella: Influencia de Mecillinam y del Cotrimazol en el uso clínico y en el estado de portador fecal". Medicina Clínica. 93:161-163
- 29) Report of the Joint Committee on the use antibiotics in animals husbandry and Veterinary Medicine (Swann Report). London. Her Magesty's Stationery Office, November 1969. S.B.N. 10:1419007
- 30) Wholesomeness of irradiated food, Report of the Joint FAO\IAEA\WHO. Expert Committee. Genova 1977, WHO technical report series N° 604. FAO food and nutrition series N°6.
- 31) Food control laboratories, report on a conference. Copenhagen, 24-28 October 1977, Regional office for Europe. WHO Copenhagen 1978, ICP\FSP\00.
- 32) Report of a FAO\WHO Working Group on Microbiological criteria for foods, Genova 20-26 February 1979. WG\Microbial\79.
- 33) Health examination of food handling personnel report on a Working Group, Copenhagen 5-7 November 1979, WHO office for Europe, Copenhagen 1980, ICP\FSP\007.
- 34) Farthing, M.J.G., and Keusch, G.T. (1989). "Enteric Infection". Chapman and hall medical. London 441-451.

- 35) Taj Jadauj, M.D., Rabin, P., Humphreys, M.D. and Charles, G., Prober, M.D. (1985). "Brain abscesses in infants and children". *Pediatric Infect. Dis.* 4:394-398
- 36) Stanley, G., Rabino Witz, M.D. and N. Ros Maclead, M.D. (1972). "Salmonella Meningitis". *Amer. J. Dis. Child.* 123:259-262.
- 37) Paniker, C.K.S., George, K. (1965). "Orogenic brain cause by Salmonella Thyphimurium". *J. Indian Med.* 45:451-452
- 38) Mc Cracken, G.H. Jr., Threlkeld, N., Mize, S. et al (1984). "Noxa lactam therapy for neonatal meningitis due to gram negative enteric bacillus". *JAMA.*
- 39) Xavier, J., Saez-Llorens, M.D., Maria, A., Umana, M.D., and cols (1989). "Brain abscess in infants and children". *Pediatric Infect. Dis. J.* 8:449-4558.
- 40) Clifton, W.M., Werner, M. (1983). "Infection with Salmonella snipeslifer in childhood". *Am. J. Dis Child.* 55:553-558.
- 41) Croctanska, J., Kubicz, S., Padarowska, W. et al (1970). "Subdural empyema due to Salmonella enteritidis in a one year old child". *Pol. Tyg. Leck.* 25:856-857.
- 42) David, W., Dunn, M.D., Jonelle Mac Allister, M.D., and

- J., Carl, Caft, M.D. (1984). "Brain abscess and empyema caused by Salmonella". *Pediatric Infect. Dis.* 3:54-57
- 43) Davis, C.R. (1981). "Salmonella sepsis in infancy". *Am. J. Dis. Child.* 135:1096-1098.
- 44) Nelson, S.J., Granoff, D. (1982). "Salmonella gastroenteritis in the first three months of life". *Clin. Pediatric.* 1:702-709.
- 45) Robert, R., Winttler, M.D. and James W., Bas MDMPH. (1989). "Nontyphoidal Salmonella enteric infections and bacteriemia". *Pediatric. Infect. Dis. J.* 8:364-367.
- 46) Loren, G., Jamamoto, M.D.MPH, and Melinda, J. Aston, M.D. (1988). "Salmonella infections in infants in Hawaii". *Pediatric. Infenct. Dis. J.* 7:000-000.
- 47) Sayomporn Sirinavin M.D., Panida Jayanetra M.D., Somsac Lolekha M.D. PHD. and Tnanarat Layang Kulmd (1988). "Predictors for extraintestinal infection in Salmonella enteritis in Thailand". *Pediatric. Infect. Dis. J.* 7:44-48.
- 48) Meadow, W.L., Schneider, H., Beern, M.O. (1985). "Salmonella enteritidis bacteriemia in childhood". *The J. Infect. Dis.* 152:185-189

- 49) Ranoher, H.S., Eichenfielt, A.H., Hodes, H.L. (1983). "Treatment of Salmonella gastroenteritis in infants". Clin. Pediatric. 22:601-604
- 50) Hyams, J.S., Durvin, W.A., Grand, R.S., Goldman, D.A., (1980). "Salmonella bacteriemia in first year of life". J. Pediatric. 96:57-59
- 51) Scott, M.B., Cosgrove, M.D. (1977). "Salmonella infection and genitourinary system". J.Urol. 118:64-68
- 52) Rigg, K.M., Sainsbury, J.R.C., (1986). "Salmonella perinephria abscess". Br. J. Hosp. Med. 36:284-285.
- 53) Adam, D., Dascher, F. (1973). "Relapse in chronic urinary tract infection in a child dire to Salmonella Bradenburg". J. Infect. 1:126-128
- 54) Hagood, P.G., Steinhardt, G.F. (1988). Salmonella urinary tract infection associated with ureteropelvic junction obstruction". J.Urol. 140:351-352
- 55) Kaneti, J., Hertzanu, Y., (1987). "Renal abscess owing to Salmonella septicemia percutaneous drainage". J.Urol. 1938:395-396
- 56) Chen, R.A., Geraci, J.E., Dearing, W.H. et al (1964). "Salmonellosis observations on 94 patients". MAYO Clin.

- 57) Mac Cready, R.A., Reardon, J.P., Saphra, I., (1957),
"Salmonellosis in Massachusetts". N.Engl. J. Med.
256:1121-1128
- 58) Sommers, H.M., Youmans, G.P., Peterson, P.Y. eds (1985).
"Infection diarrhea". Sommers H.M. The biologic and
clinical basis of infectious disease 3rd.ed.
Philadelphia. Sanders 469-523
- 59) Jeh, F., Pildes, R.S., (1977). "Transplacental
aminophylline toxicity in a neonato" The Lancet 910
- 60) Topley and Wilson's. "Principles of bacteriophagy
virology and immunity". Vol. 3 Bacterial Diseases. Ed.
7th.
- 61) Van Schothorst, M., and Naterman's, S., (1980). "Food
borne diseases associated with poultry". Mead G.C. and
Freedman B.M. eds. Meat quality in poultry and game
birds. British poultry science Ltd. Edimburg 79-90
- 62) Williams, J.E. and Whittemore, A.D. (1979). "Serological
response of chickens to Salmonella Thompson and
Salmonella Pullorum infections". J. Clin. Microbiol.
9:108-114

- 63) Hobbs, B.C., and Gilbert, R.J. (1978). "Food Poisoning and Food Hygiene" 4 th. ed. Edward Arnold. London
- 64) Adler, H.E., Willers, E.H., and Levine, M., (1951). "Incidence of Salmonella in apparently healthy dogs". J. Amer. Vet. Med. Assocn. **118**:300-304
- 65) Prost, E., and Riemann, H., (1967). "Food borne salmonellosis". Anna. Rev. Microbiol. **21**:495-528
- 66) Hubbert, W.T., Mc. Culloch, W.F. and Schnurrenberger, P.R., (1975). "Disseases transmitted from animals to man". 6th.ed. Charles and C. Thomas Springfield. Illinois. USA **33**:91
- 67) Carmelo Monzón, Leopoldo O'Shanahan, M^a Aurora Echeita, M.A. Usera y Michel Y. Popoff. (1993). Nuevo serotipo de Salmonella: Gran Canaria. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **11**: 228-229.
- 68) Feachem, R.G., Morgan, R.C., Merson, M.H., "Diarrheal disease control". Reviews of potential interventions. Bulletin WHO 1983. **61(4)**:637-640
- 69) Perales, I., Andicana, A., (1988). "Salmonella Enteritidis and eggs". The Lancet 1133
- 70) Abdusalam, M., (1980). "Problems of foodborne diseases

in developing countries, die fleischwirtschaft" H.G.
5:1151-1154

- 71) Nabbut, N., Jamal, H., Fakhoury, K., (1968). "The Salmonella serotypes in cattle of Lebanon and neighbouring countries" MAGON. Agricultural reseach Institute. Lebanon Publication. 19:1-15
- 72) Nassir Al-Hindawi, Rihab Rished (1979). "Presence and distribution of Salmonella species in some lococal food from Baghdad City". Iraq Journal of food protection. 42. 11:877:880.
- 73) D.Aonst, J.Y., Aris, B.J., Thisdele, P., Durante, A., Brisson, N., Dragon, D., Lachapelle, G., Johnston, M., Laidley, R., (1975). "Salmonella eastbourne outbreak asociated with chocolate". Can. Inst. Food Technol. J. 8:181-184.
- 74) Linton, A.H., (1981). "Salmonellosis in pigs". Pig new and information 2(1):25-28.
- 75) Wray, C., and Sijka, (1977). "Reviews of the progress of daily science: bovine Salmonellosis". Dairy Res. 44:383-425.
- 76) Report of the WHO\WAVFH. Round table conference on the present status of the Salmonella problem (prevention and

- control). Bilthoven, The Netherlands 1980. (Unpublished document WHO\VPH\81,27).
- 77) International commission on microbiological specifications for foods (1974). Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. University of Toronto Press.
- 78) Rowe, B., et al. Reports received from centres participating in the WHO programme. Salmonella Servillance Central. Public Health Laboratory. Colindale. United Kingdom. 1986.
- 79) Rodriguez, D.C., Tauxe, R.V., and Rowe, B: (1990). "International increase in Salmonella Enteritidis: A new pandemic". *Epidemiol Infect.* 1055:21-27.
- 80) Deirdre Manson and Gail Vines (1988). "Eggs and the fragile food chain". *New Scientist* 10-11.
- 81) Rampling, A., Upson, R., Ward, L.R., Anderson, J.R., Peters, E. Rowe, B. (1989). "Salmonella Enteritidis Phagetype 4 infection of broiler chickens: A hazard to public health". *The Lancet.* 436-438
- 82) Coyle, E.F., Ribero, C.D., Howard, A.J., Palmer, S.R., Jones, H.I., Ward, L., Rowe, B., (1988). "Salmonella

Enteritidis phage type 4 infection: Association with hen's eggs". The Lancet 1295-1296

- 83) Feng-Ying,C., Lin,J., Glenn Morris Jr. et al (1988). "Investigation of an outbreak of Salmonella enteritidis gastroenteritis associated with consumption of eggs in a restaurant chain in Maryland". American Journal Epidemiology 28(4):839-844.
- 84) Editorial 1981. "Tipificación de salmonellas" B.E.S. (Boletín Epidemiológico Semanal).1493:217-218.
- 85) Editorial 1982. "Tipificación de salmonellas". Vigilancia Epidemiológica en 1981. B.E.S. 1533:69-71.
- 86) Editorial 1984. "Tipificación de salmonellas". Vigilancia Epidemiológica en 1983. B.E.S. 1654:265-267.
- 87) Editorial 1985. Información procedente de otros Boletines. Vigilancia Epidemiológica. B.M.S.(Boletín Microbiológico Semanal), 19:1-2.
- 88) Editorial 1987. Información Epidemiológica y Microbiológica procedente del Laboratorio de Enterobacterias del C.N.M.V.I.S. B.M.S.
- 89) Editorial 1989. "Tipificación de salmonellas". Vigilancia Epidemiológica en 1988. B.M.S. 551-52.

- 90) Echeita, M.A., and Usera, M.A. (1989). "Prevalence of Salmonella serotypes isolated in Spain from human and non human sources (1983-1987)". Microbiológica. SEM 5:95-103.
- 91) Le Minor, L., Veron, M., Popoff, M., (1982). "Taxonomía de Salmonella". Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 133B:223-243
- 92) Le Minor, L., Veron, M., Popoff, M., (1982). "Proposition pour une nomenclature des Salmonella". Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 133B:245-254.
- 93) Kauffmann, F., (1956). "Serotypes in Salmonella". Act. Pathol. Microbiol. Scand. 39:299-304.
- 94) Le Minor, L. and Popoff, M., (1987). "Designation of Salmonella enterica S.P. nev. nom. rev. as the type and only species of the genus Salmonella". International Journal Systematic Bacteriology 357: 465-468.
- 95) Le Minor, L. Popoff, M.Y., Laurent, B., Hermant, D., (1986). "Indivilualisation d'une septieme sous especie de Salmonella: Cholerasuis, subsp. Indica, subsp. nov." Ann. Inst. Pasteur (Microbiol.) 137B:211-217.
- 96) Krieg, N.R., Holt, J.G., (1984). Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Barbara Tansill, Williams and Wilkins. Baltimore. 1:427-457.

- 97) Escamilla, J., Florez-Ugarte, H., Kilpatrick, M.E., (1986). "Evaluation of blood clot cultures for isolation of Salmonella Typhi, Salmonella Paratyphi A and Brucella Mellitense". J. Clin. Microbiol. 24:388-390.
- 98) Reeves, M.W., Evin, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D., Farmer III, J.J., (1989). "Clonal nature of Salmonella Typhi and its genetics, relatedness to other Salmonella as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of Salmonella Bongori, comb. nov." J. Clin. Microbiol. 27:313-320.
- 99) Luderitz, O., Jannk, and Wheat, P., (1968). "In: Compr. Biochem" M. Florin and E.H. Stutz eds. Elsevier. Amsterdam. 26A:105-228.
- 100) Luderitz Wetsphal, O., Stanb, A.M. and Nikido, H. (1971). "Isolation and Chemical and Immunological characterisation of bacterial lipopolysaccharides". G. Wimbaum., S. Kadisand, and S. Ajl. Microbial Toxins. Academic Press. New York. 4:145-224.
- 101) Jann, K., Wetsphal, O., (1975). "Microbiol Polysaccharides". The Antigens. In M. Sela. Academic Press. New York. 1-42.
- 102) Maketa, P.H., Stoker, B.A.D. (1969). "Genetics of Polysaccharide biosynthesis. Ann. Rev. Genet. 3:291-322.

- 103) Ewing, W.H. (1986). The genus *Salmonella*. In: Edwards, P.R. and Ewing, W.H. (eds). Identification of Enterobacteriaceae, pp.182-245. Elsevier Science Pub. B.V. Amsterdam.
- 104) Stokes, B.A.D., and Maketa, P.H., (1971). "In Microbiol Toxins". Wimbaum, G., Kadis, S., and Ajl, S.J. (eds). New York. Academic Press. 4 :369-438.
- 105) Hellrquist et al. (1969). "Serotypes in *Salmonella*". B. Acta Chemical. Escandinavia. 23:1588.
- 106) Le Minor, L., Richard, C.L., Mollaret, H.L., Bercovier, H., et Alonso, J.M. (1982). Enterobacteriaceas. In: Le Minor et Michel Veron. Bacteriologie Medicale Flammarion. Medicine Sciences. 240:315.
- 107) Edwards and Ewing (1972). Taxonomy and Nomenclature. In: Identification of Enterobacteriaceae. Edwards, P.R. and Ewing, W.H. (eds). Elsevier. New York. 1-25.
- 108) Le Minor, L., (1988). "Typing of *Salmonella* species". Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis. 7:214-218.
- 109) Le Minor, L., Popoff, M.Y., (1988). "Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 5th revision WHO. Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Inst. Pasteur. Paris.

- 110) Le Minor, L., Le Minor, S., Grimont, P.A.D., (1985). Repport quadriennal du Centre National des salmonellas sur l'origine et la repartition en serotypes des souches isoleés en France Continentale an cours des annees 1980-1983. Rev. Epidem. et Santé Publ. 33:13-21.
- 111) Ryder, R.W. et al (1980). "Increase in antibiotic resistance among isolates of Salmonella in the United States 1967-1975". The J. Infect. Dis. 142:4.
- 112) Chan, P., et al (1981). "In vitro suceptibility of Salmonella to varions antimicrobiol agents including a new Cephalosporin". Antimimicrobial Agents and Chemoterapy 8-11.
- 113) Phol, P. (1980). "Detection et identification rapides de certains plasmides du grupe incompatibiliti H. infectant des seuches de Salmonella Typhimurium epidemiques. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 131A:315-319.
- 114) Roussel, A.F., and Bourgen, P., (1978). "Taxonomy and Epidemiology of gram negative bacterial plasmids studied by DNA-DNA filtres hibridization infornamide". J. Gen. Microbiol. 104:69-80.
- 115) Kado, C.I. and Liu, S.T. (1981). "Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid". J. Bacteriol. 145:13655-1373.

- 116) Birboin, H.C., and Doly, J., (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acid. Res.* 7:1513-1523.
- 117) Nakamura, M., Sato, S., and Ohya, T., (1985). "Possible relations of a 36 Megadalton *Salmonella Enteritidis* plasmid to virulence in mices". *Infec. Immun.* 47:831-833
- 118) Luján, R., Echeita, A., Usera, M.A., Martínez-Suárez, J.V., Alonso, R., Saez-Nieto, J.A., (1990). "Plasmid profiles as an epidemiological marker for *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* foodborne outbreaks". *Microbiologia SEM.* 6:45-50.
- 119) Wachsmuth, K. (1986). "Molecular epidemiology of bacterial infection: Examples of methodology and of investigation of outbreaks". *Reviews of Infection diseases.* 8(5):682-690.
- 120) Schaberg, D.R., Tompkins, L.S., Falkow, S., (1981). "Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli". *J. Clin. Microbiol.* 13:1105-1108.
- 121) Fitts, R., Diamont, M., Hamilton, C., Neri, M., (1983). "DNA-DNA hibridation assay for detection of *Salmonella* Spp in foods ". *Appl. Environ. Microbiol.*

- 122) Chart, H., Threlfall, E.J., and Rowe, B., (1989). "Virulence of *Salmonella enteritidis* phage type 4 is related to possession of a 38 MD. plasmid". *FEMS Microbiology Letters* 58:299-304.
- 123) Tomkins, L.S., Troup, N., Labigne-Rousel, A., Cohen, M. (1986). "Cloned random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species". *The J. Infect. Dis.* 54(1):156-162.
- 124) Altwegg, M., Hickman-Brener, F.W., Farmer III, J.J., (1989). "Ribosomal RNA genes restriction patterns provide increase sensivity for typing *Salmonella* Typhi strains". *J. Infect. Dis.* 160:145-149.
- 125) Reeves, M.W., Ewins, 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 multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella* Bongori comb. nov.". *J. Clin. Microbiol.* 27:313-320.
- 126) Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A., Nusser, J.M., (1990). "Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fever". *Infect. Immun.* 58:2262-2275.

- 127) Prieto,A., (1971). "Fiebre tifoidea y saneamiento en España". Ministerio de la Gobernación Dirección General de Sanidad, Madrid. 1:11-68.
- 128) Casjens,S., Hendrix,R., "Control Mechanims in the DNA Bacteriophage assembly". In The Bacteriophages , Richard Calendar (eds). New York. London. 15-91.
- 129) Yarmolinsky,M.B., Stemberg,N., "Bacteriophage Pi". In The Bacteriophages, Richard Calendar (eds.), New York, London. 1:291-438.
- 130) Craigie,J., and Yen,C.H., (1938). "The demostration of types of B typhosus by means of preparations of type II Vi phage. I principles and tecnique". Can. J. Public Health. 29:448-484.
- 131) Anderson,E.S., (1962). "The genetic basis of bacteriophage typing". Brit. Med. J. 18:64-68
- 132) Anderson,E.S., and Felix,A., (1953). "The Vi type-determining phages carried by Salmonella Typhi" J. Gen. Microbiol. 9:65-88.
- 133) Alonso,R., Echeita,A., Espinosa,P., Usera,M.A., (1987). "Attemps to establish phage typing as an epidemiological marker for Salmonella Enteritidis". Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138:579-585.

- 134) Gersman, M., (1976). "Phage typing system for Salmonella Enteritidis applied and environmental microbiology". American Society for Microbiology. 1:190-191.
- 135) Parisi, J.T., Li Meng, (1988). "Rapid method for isolation of bacteriophages from lisogens". Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 11:121-123.
- 136) Parisi, J.T., Talbot Jr., H.W., (1974). "Improved resolution of bacteriophage from lysogenic bacteria". Appl. Microbiol. 28:503.
- 137) Gersman, M., (1977). "Single phage-typing set for differentiating Salmonellae". J. Clin. Microbiol. 5:302-314.
- 138) Gersman, M., and Markowsky, G., (1983). "Reduced set of phages for typing Salmonellae". J. Clin. Microbiol. 17:240-244.
- 139) Bernstein, A., Maureen, E., Wilson, J., (1963). "An analysis of the Vi phage typing scheme for Salmonella Typhi". J. Gen. Microbiol. 32:349-373.
- 140) Adams, M.H., (1950). "Bacterial virus" In Meth Med. Res. 2. Chicago years. Book Publishers.
- 141) Adams, M.H., (1959). "Bacteriophages". In Interscience

Publisher Inc. New York.

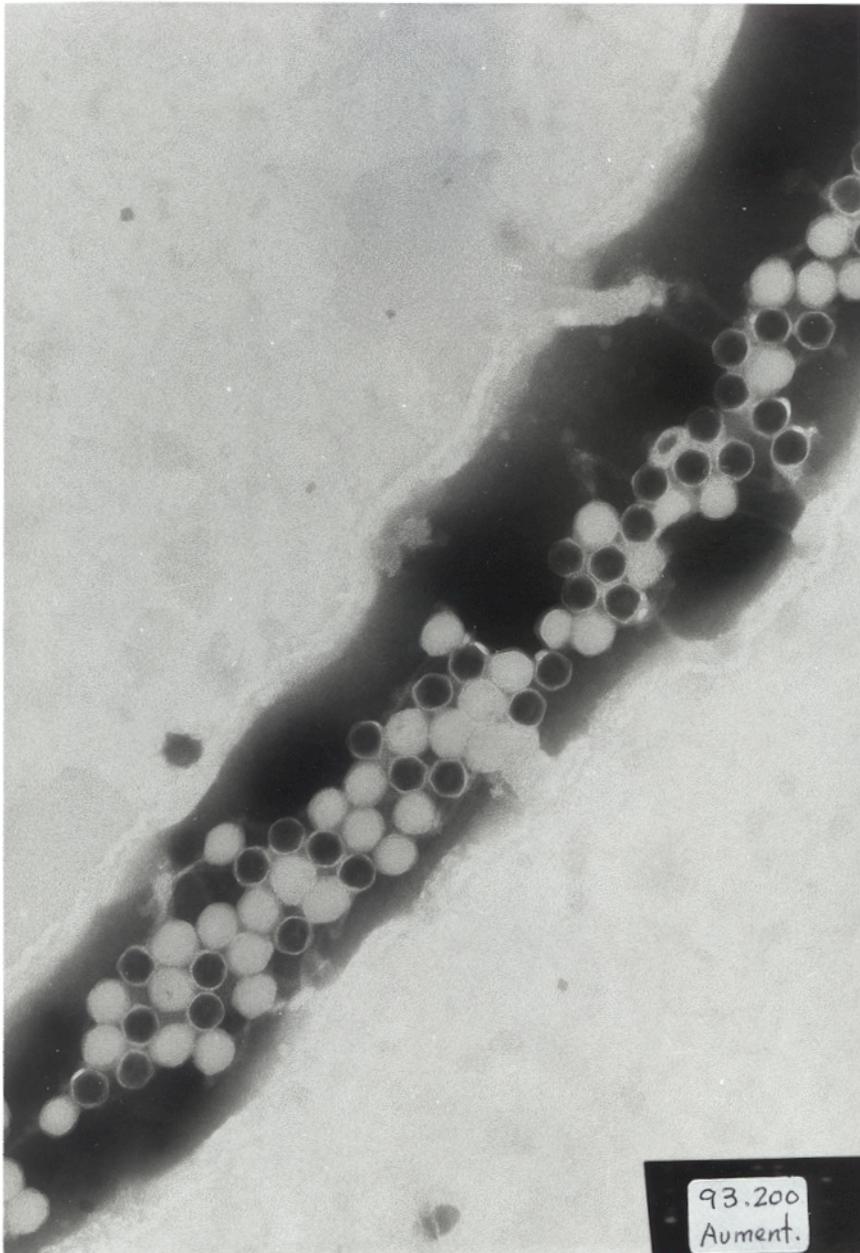
- 142) Hickman-Brener, F.W., Stubbs, A.D., Farmer III, J.J., (1991).
"Phage typing of Salmonella Enteritidis in United States". J. Clin. Microbiol. 28:17-2823.
- 143) Mc. Faddin, J.F., (1980). "Biochemical tests for identification of medical bacteria". In Williams and Wilkins (eds), 2 nd. edition, Baltimore. 1:1-526.
- 144) Johnson, J.G., Zunz, L.J., Barron, W., Erwing, W.H., (1966).
"Biochemical differentiation of the Enterobacteriaceae with the acid Lysine-Iron-Agar". Appl. Microbiol. 14:212-217.
- 145) Ewing, W.H., (1986). "Identification of bacteriaceae".
Elservier. 4th. edition, New York. 181-318.
- 146) Shipp, C.H.R., Rowe, B., (1980). "A mechanised microtechnique for Salmonella serotyping". J. Clin. Pathol. 33:595-597.
- 147) Anderson, E.S., (1964). "Phage typing of Salmonella other than S. Typhi. The world problem of Salmonellosis".
Junt. The Hague, The Netherland. In Van Oye (ed). 89-110
- 148) Centre for diseases Control 1990. Salmonella surveillance report, 1989. Centers for diseases control,

Atlanta.

- 149) De Saxe, M.J., Notley, C.M., (1978). "Experience with typhoid of coagulase-negative Staphylococci and micrococci". Zbl. Bakt. Hyg. 241:46-59
- 150) Swanstrom, M., Adams, M.H., (1951). "Agar layer method for production of high titer phage stock proc. soc. exp. Biol. Med. 7:372-375.
- 151) Anderson, E.S., and Williams, R.E.O., (1956). "Bacteriophage typing of Staphylococcus". J. Clin. Path. 9:94.
- 152) WHO (1980). Health examination of food handling personnel. Report on a Working Group. Copenhagen 5-7 November 1979.
- 153) Ward, L.R., De Sa, J. and Rowe, B., (1987). "A phage-typing scheme for Salmonella Enteritidis". Epidemiol. Infect. 99:291-294.

FOTOGRAFIAS

**BACTERIOFAGO SALVAJE AISLADO DE UNA
MUESTRA DE AGUA**



BACTERIOFAGO LI SOGENICO INDUCIDO

DE UNA CEPA DE SALMONELLA SEROTIPO ENTERITIDIS

