

Subtipificación molecular de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en el período post epidémico

Mayerling Ríos R^{1a}, Pamela Araya R^{1b},
Alda Fernández R^{2c}, Javier Tognarelli^{1b},
Juan Carlos Hormazábal², Jorge Fernández O^{1e}.

*Molecular subtyping of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in a post epidemic period*

Background: In the last two decades, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis has become one of the main agents causing food borne diseases worldwide. This agent is transmitted mainly by contaminated meat and poultry. **Aim:** To determine the genetic subtypes of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, circulating in Chile between 2001 and 2003, a post epidemic period. **Material and methods:** One hundred ninety three isolates coming from human samples, prepared foods and animal products for human consumption, were analyzed by pulsed field electrophoresis, using PulseNet standardized protocol. **Results:** Thirteen subtypes of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis were identified, that had between 0 and 13 bands. A predominant subtype was identified in 172 strains (88%) that came from human isolates, prepared foods and animal products for human consumption. Other four subtypes, found in prepared foods and animal products for human consumption, were also found in human isolates. Most subtypes were tightly interrelated Subtypes II, VIII and XI were also found in the 1994 epidemic. **Conclusions:** Subtyping of bacterial strains by pulsed field electrophoresis is useful for the surveillance of food borne diseases (Rev Méd Chile 2009; 137: 71-5).

(Key words: Electrophoresis, gel, pulsed field; Enterocolitis; *Salmonella enterica*)

Recibido el 6 de marzo, 2008. Aceptado el 28 de octubre, 2008.

Financiamiento: Instituto de Salud Pública de Chile

Genética Molecular¹, Bacteriología Clínica², Instituto de Salud Pública de Chile.

^aQuímico Laboratorista

^bBioquímico

^cTecnólogo Médico

^ePhD y Licenciado en Biología

Las enfermedades originadas por el consumo de alimentos contaminados, han surgido como una causa importante de morbimortalidad a nivel

mundial¹. En América Latina las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) representan alrededor de 70% de los casos de enfermedad diarreica aguda según datos de OMS¹⁻³. En Chile, los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados son de notificación obligatoria, a través de una red de vigilancia de laboratorio.

Correspondencia a: Dr. Jorge Fernández Ordenes. Genética Molecular, Departamento Laboratorios de Salud, Instituto de Salud Pública de Chile. Maratón 1000, Ñuñoa, Santiago de Chile. Fax: 3507573. E mail: jfernand@ispch.cl

Salmonella enterica serotipo Enteritidis es uno de los principales agentes bacterianos que producen enfermedades transmitidas por alimentos. La infección por *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis se asocia principalmente a la ingesta de menudencias crudas de aves y alimentos preparados a partir de huevos^{4,5}. Hasta el año 1993, los casos de salmonelosis producidas por *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en Chile eran esporádicos, en 1994 se inició la epidemia en el norte del país con cifras que implicaron un aumento sobre los casos registrados históricamente⁶.

Para la subtipificación de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis se han empleado diferentes métodos moleculares, los cuales incluyen análisis de patrones plasmidiales, huella genética utilizando el elemento de inserción IS200, análisis de genes plasmidiales de virulencia (*spvA*, *spvB*, *spvC*), ribotipificación, análisis de secuencias nucleotídicas, polimorfismo de fragmentos de restricción, amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD-PCR) y electroforesis de campo pulsado (PFGE)⁷⁻¹¹.

El Centro para el Control de las Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica (CDC) ha desarrollado una red de subtipificación molecular para la vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos denominada PulseNet, la cual utiliza electroforesis de campo pulsado como base de subtipificación^{12,13}. Este trabajo tiene como objetivo subtipificar molecularmente los aislados de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis recolectados entre los años 2001 y 2003, para desarrollar una base de datos nacional, la cual podría constituir una herramienta útil para fortalecer la vigilancia de las ETA en Chile a través de reconocimiento de clones circulantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas. En este estudio se analizaron 195 cepas chilenas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, las cuales fueron recolectadas de diferentes zonas del país por el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias del Instituto de Salud Pública de Chile entre los años 2001 y 2003. El número de cepas por zonas se obtuvo por muestreo secuencial del total de cepas recolectadas entre los años 2001 y 2003, utilizando el procedimiento de *weighted cluster sampling*¹⁴. El 37,4% de las cepas (73 cepas) correspondieron a la zona

norte del país, de las cuales 66 cepas fueron de origen humano y 7 de origen en alimentos preparados. El 47,7% de las cepas (93) correspondieron a la zona central del país, 66 fueron de origen humano, 5 de origen en alimentos preparados y 19 de origen en tejido animal para el consumo. En la zona sur del país se recolectaron 14,9% de las cepas (29 cepas), 27 fueron de origen humano y 2 de origen en tejido animal para el consumo.

Las cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas descritas por Edwards and Ewing¹⁵ y serotipificadas por el esquema de Kauffmann-White¹⁶.

Electroforesis de campo pulsado. La extracción del ADN cromosomal se realizó según protocolo estandarizado de PulseNet, utilizando la cepa estándar *Salmonella* Braenderup H9812¹⁷. Los aislados fueron cultivados en placas de agar Mueller Hinton por 16 horas a 35°C, las células bacterianas fueron resuspendidas en tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) con 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y mezcladas con agarosa para campo pulsado 1% y SDS 1%. Una vez formados los moldes de agarosa se incubaron con tampón de lisis (0,5 mM EDTA, 1% lauril sarcosina pH 8,0) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) durante 2 h a 55°C con agitación. Los moldes fueron lavados tres veces con agua destilada estéril y tampón TE por 15 min a 55°C. Un trozo de 2 mm de los moldes de agarosa fue digerido con 10 U de la enzima de restricción *Xba* I durante 4 h. El gel fue sometido a electroforesis a 6 V/cm con pulso inicial de 2,2 s hasta 63,8 s final por 23 h con un ángulo de 120° en tampón TBE 0,5% (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA) a 14°C. Los patrones de digestión de campo pulsado fueron detectados en sistema documentación de geles Gel DOC 2000 de BioRad.

Análisis filogenético. Los subtipos fueron comparados mediante el coeficiente de Dice. El agrupamiento fue realizado utilizando el algoritmo UPGMA (*unweighed pair group matching analysis*), contenido en el programa Bionumeric versión 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

RESULTADOS

Se analizaron 195 cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis recolectadas entre los años 2001 y 2003, correspondientes al periodo post-

epidémico en Chile. Estas cepas fueron aisladas desde fuentes humanas, de alimentos preparados y de tejido animal para el consumo (Tabla 1).

Se identificaron 13 subtipos de entre 10 y 13 bandas correspondiente a *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis. El subtipo predominante denominado arbitrariamente II, se identificó en 172 (88,2%) de las cepas y fue predominante en las tres zonas del país. El subtipo I se identificó en 5 (2,6%) cepas y el subtipo VIII en 3 (1,5%) cepas, mientras que en 15 (7,7%) de las cepas restantes se identificaron 10 subtipos denominados III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI, XII y XIII.

En la zona norte del país se identificaron 7 subtipos diferentes (I, II, III, IV, VI, VII y IX), de los cuales los subtipos III, VII y IX no fueron observados en otras zonas del país. En la zona centro del país, se identificaron 9 subtipos (I, II, V, VI, VIII, X, XI, XII y XIII) de los cuales los subtipos V, X, XI, XII y XIII no fueron observados en otras zonas del país. En la zona sur, se identificaron 4 subtipos I, II, IV y VIII, todos presentes en otras zonas del país.

El subtipo II, que fue predominante en este estudio, se identificó en cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis aisladas desde muestras clínicas humanas, de alimentos preparados y de tejido animal para consumo. Los subtipos I y III se identificaron en cepas aisladas desde humanos y de alimentos preparados. En cambio, los subtipos IV y

VIII se identificaron en cepas aisladas desde humanos y de tejido animal para el consumo. A su vez, los subtipos V y XIII, sólo fueron identificados en cepas aisladas desde tejido animal para el consumo. Los otros subtipos sólo fueron identificados en cepas aisladas desde humanos.

Mediante el análisis bioinformático realizado a los subtipos encontrados durante el periodo post epidémico, se identificaron 4 agrupamientos (Figura 1). El subtipo II predominante se relacionó en 94% similitud con los subtipos II, I, III, VI, IX (agrupamiento B). Los subtipos VIII XII y XI se agruparon con 95,5% de similitud (agrupamiento C). Los subtipos incluidos en los agrupamientos B y C están estrechamente relacionados y en conjunto dan cuenta de 94,3% de las cepas estudiadas.

El subtipo XIII, identificado sólo en una cepa aislada desde tejido animal para el consumo, está más distante filogenéticamente de los otros subtipos identificados.

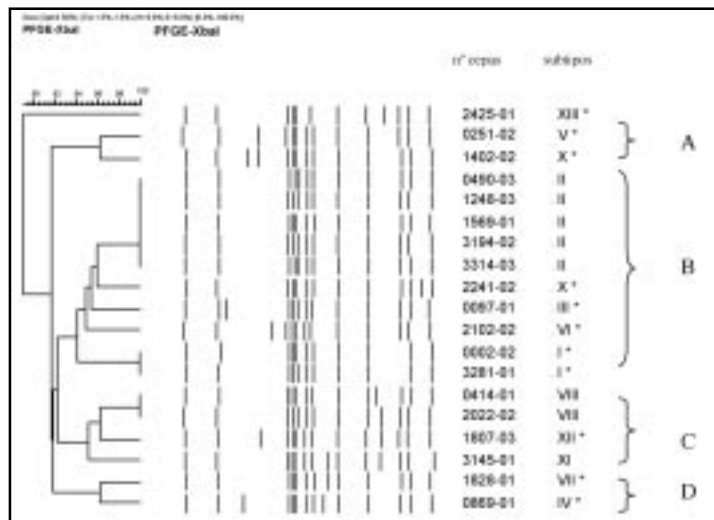
Al comparar los subtipos identificados en el periodo post epidémico con aquellos observados en la preepidemia y epidemia, se observó que los subtipos II, VIII y XI formaron parte de los subtipos que produjeron la epidemia en el año 1994 en Chile (Figura 1). Los otros 10 subtipos son exclusivos de la postepidemia, sin embargo sólo representan 7,2% de las cepas estudiadas.

Tabla 1. Aislamiento de cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis según fuente de origen

	Tipo de aislamiento	Cuadro Clínico	Nº
Origen humano	Deposición	Síndrome diarreico	241
		Síndrome febril	2
	Sangre	Síndrome diarreico	1
		Síndrome febril	1
		Septicemia	2
		s/a	9
		Orina	s/a
Secreción herida	s/a	1	
Origen en alimentos preparados	Alimentos preparados		13
	Huevos		2
Origen en tejido animal para el consumo	Aves de producción		21
Total cepas			195

s/a: Sin antecedentes; nº: número de cepas

Figura 1. Análisis filogenético de las cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis. *Subtipos nuevos identificados en este estudio.



DISCUSIÓN

En la Región Metropolitana se detectan anualmente alrededor de 300 brotes de infecciones transmitidos por alimentos, siendo afectadas aproximadamente 1.500 personas. El manejo y la vigilancia de los brotes por alimentos se llevan a cabo según el Decreto N°158 de Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria, del año 2004.

Diversos estudios han demostrado que *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis se encuentra presente en 7% de las carnes de aves y en 1/1.000 huevos. Esta última cifra no es menor si consideramos que la población consume una cantidad de huevos superior a los 6.000.000 de unidades diariamente⁴⁻⁶.

Este es el primer estudio de subtipificación molecular de cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis circulantes durante la postepidemia. El análisis de los resultados demostró que el subtipo II predominó en la zona norte, centro y sur del país, abarcando 88,2% de las cepas estudiadas. Este subtipo fue predominante en las muestras de origen humano, de alimentos preparados y de tejidos animales para el consumo.

El subtipo predominante se identificó en nuestro país por primera vez en un número reducido de cepas en el período preepidémico entre 1990 y 1992⁷. Sin embargo, durante la epidemia este subtipo se expandió y fue predominante en este período, situación similar a lo observado en el período postepidémico. Los subtipos VIII y XI descritos en este estudio, también fueron observados en el período

epidémico. En cambio, los otros 10 subtipos identificados en este estudio no fueron detectados en el período preepidémico y tampoco en el período epidémico, siendo exclusivos del período postepidémico entre los años 2001 y 2003. Sin embargo, estos subtipos representan sólo 9,2% de las cepas estudiadas y 7 de ellos representan aislamientos únicos.

La mayoría de los subtipos identificados en el período postepidémico entre los años 2001 y 2003, están estrechamente relacionados al subtipo II, encontrándose algunos subtipos característicos en cada zona del país, aunque en la mayoría de los casos estos subtipos son únicos.

El análisis de los subtipos también permitió establecer una probable fuente de origen para las infecciones en humanos por *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, ya que algunos subtipos fueron identificados en humanos, en alimentos preparados y en tejidos animales para el consumo.

El amplio uso de PFGE en la subtipificación de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, ha demostrado que este agente infeccioso tiene un alto grado de estabilidad genética, lo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro país, donde la mayoría de los subtipos está estrechamente relacionado y son similares a los que se han reportado en otros lugares del mundo, lo cual indicaría un origen común¹⁸⁻²⁰.

Los resultados obtenidos nos demuestran que es importante fortalecer la vigilancia de laboratorios para *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, tanto en su componente clínico-humano, epidemiológico

y ambiental, para obtener muestras de mayor representatividad en términos temporales y geográficos. Este fortalecimiento permitirá definir con mayor certeza el rol de los diversos subtipos genéticos, determinar los nexos entre casos y fuentes y hacer un adecuado seguimiento de los clones circulantes a nivel nacional, en especial aquellos asociados a infección en humanos.

El uso de PFGE y el programa Bionumeric, estandarizado a través de la red PulseNet, permitirá desarrollar y mantener una base de datos con

los subtipos que circulan en nuestro país. A su vez, al pertenecer a la red PulseNet internacional se podrá realizar intercambio de información con otros laboratorios regionales y de otras partes del mundo, entregando alertas de brotes de ETA y nuevos subtipos hipervirulentos a nivel mundial.

Agradecimiento

A la técnico María Ibáñez, del laboratorio Genética Molecular, por el apoyo en la técnica de electroforesis de campo pulsado.

REFERENCIAS

1. TAUXE R. Emerging Foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 425-34.
2. OLEA A. Red Pulsenet en América latina para la vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos. *Boletín de vigilancia de Salud Pública el Vigía* 2003; 19. <http://epi.minsal.cl/epi/html/elvigia/vigia19/VIGIA1909.pdf>
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION 2007. Water-related diseases: typhoid and paratyphoid enteric fevers. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/typhoid/en/
4. FICA A, ALEXANDRE M, PRAT S, FERNÁNDEZ A, FERNÁNDEZ J, HEITMAN I. *Salmonella Enteritidis* un patógeno emergente en Chile. *Rev Méd Chile* 1997; 125: 544-51.
5. ALEXANDRE M, POZO C, GONZÁLEZ V, MARTÍNEZ MC, PRAT S, FERNÁNDEZ A ET AL. Detección de *Salmonella Enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. *Rev Méd Chile* 2000; 128: 1075-83.
6. FICA A, ALEXANDRE M, PRAT S, FERNÁNDEZ A, FERNÁNDEZ J, HEITMANN I. Cambios epidemiológicos de las Salmoneosis en Chile. Desde *Salmonella Typhi* a *Salmonella Enteritidis*. *Rev Chil Infectol* 2001; 18: 85-93.
7. FERNÁNDEZ J, FICA A, EBENSPERGUER G, CALFULLÁN H, PRAT S, FERNÁNDEZ A ET AL. Analysis of Molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and Bacteriophage typing. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1617-22.
8. STANLEY J, GOLDSWORTHY M, THRELFALL E. Molecular Phylogenetic Typing of Pandemic Isolates of *Salmonella* Enteritidis. *Fems Microbiology* 1992; 69: 153-60.
9. LAMPEL KA, KEASLER SP, HANES DE. Specific Detection of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Using the Polymerase Chain Reaction. *Epidemiol Infect* 1996; 116: 137-45.
10. LIN AW, USERA MA, BARRET TJ, GOLDSBY RA. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strain of *Salmonella* Enteritidis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 870-6.
11. LINDSTEDT B, HEIR E, VARDUND T, KAPPERUD G. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. Enterica serovars and comparison with pulsed field gel electrophoresis typing. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1623-7.
12. SWAMINATHAN B, BARRETT T, HUNTER S, TAUXE R. Pulse Net: The Molecular Subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 328-89.
13. SALVE A, PICHEL M, WIESNER M, HIDALGO M, TERRAGNO R, ALVAREZ A ET AL. Molecular Subtyping of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from Colombia and Argentina. *Foodborne Pathog and Dis* 2006; 3: 142-52.
14. Who/CDS/TB/2003.320. Guideline for surveillance of drug resistance in tuberculosis. World Health Organization. Geneva. 2003.
15. EWING WH, EDWARDS AND EWING'S. *Identification of Enterobacteriaceae*. 1986. 4th ed. Elsevier, New York.
16. POPOFF M. *Antigenic Formules of the Salmonella serovars*. 2001. 8th ed. Institut Pasteur, France.
17. HUNTER S, VAUTERIN P, LAMBERT-FAIR MA, VAN DUYN MS, KUBOTA K, GRAVES L ET AL. Establishment of a Universal Size Standard Strain for use with the Pulse Net Standardized pulse field gel electrophoresis protocols: Converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1045-50.
18. ADESIYUN A, CARSON A, McADOO K, BAILEY C. Molecular Analysis of *Salmonella* Enteritidis isolates from the Caribbean by Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Rev Panam Salud Pública* 2000; 8: 342-7.
19. BERGHOLD C, KORNSCHÖBER C, LEDERER I, ALLERBERGUER F. Occurrence of *Salmonella* Enteritidis phage type 29 in Austria: and opportunity to assess the relevance of chicken meat as source of human *Salmonella* infection. *Euro Surveill* 2004; 9: 31-4.
20. TASSIOS P, MARKOGIANNAKIS A, VATOPOULOS A, KATSANIKOU E, VELONAKIS E, KOUREA-KREMASTINOY J, LEGAKIS N. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7-years period in Greece. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1316-21.