



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



“Evaluación del riesgo asociado a la presencia de bacterias patógenas en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León”

Memoria de Tesis Doctoral



Elsa Iglesias Collar

León, 2013

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Doctor **Andrés Otero Carballeira**, director de esta tesis, por haberme integrado en su grupo de investigación, así como, por todo el apoyo tanto académico como personal, ya que no ha habido un solo día en el que no haya estado pendiente de mi trabajo y mi formación, consiguiendo siempre que lo difícil se convirtiera en fácil.

Agradecer al Doctor **Jose M^a Rodríguez-Calleja**, codirector de esta tesis, su inestimable ayuda durante cinco años, por su apoyo para resolver todos los conflictos científicos que se nos han puesto por delante.

A los Doctores **María Luisa García López** y **Jesús Ángel Santos Buelga**, que siempre han estado a mi lado para cualquier duda, brindándome sus conocimientos científicos y las oportunas indicaciones.

A **Aurelia, Rosa, Dolores y Araceli**, un gran apoyo en los momentos que lo ves todo negro y que son capaces de sacarte una sonrisa, aparte de su valiosa ayuda en cualquier asunto técnico y administrativo.

A **Benjamín Rabanal** por compartir conmigo su dominio de las técnicas moleculares.

A la **Doctora Remacha** del Hospital de León por su inestimable colaboración con el proyecto.

Al **Instituto Nacional de la Salud Carlos III** (Majadahonda, Madrid), siempre dispuestos a compartir experiencias que nos ayudaron a solucionar los problemas a los que tuvimos que hacer frente durante el desarrollo de esta tesis.

A mis chicas, **Vero, Elena y Luisina**, que han sido mi apoyo y mi fuerza para seguir cada día, porque hicieron que venir a trabajar fuera fácil desde el primer momento.

A mis **padres**, sin cuya ayuda no hubiera llegado hasta aquí, porque me han dado todo lo que tenían para convertirme en la persona que soy. Ambos son unos luchadores en la vida y eso lo llevo muy dentro. Y como dice mi padre hay que soñar porque a veces los sueños se hacen realidad.

A **Sebi**, la persona que ha estado conmigo en los buenos momentos pero mucho más en los malos, la persona que trata día a día de cambiarme el chip y que contra todo pronóstico se ha convertido en una de las más importantes de mi vida y ojala nunca me falte.

A **María García Velasco**, mi amiga del alma, que me enseñó que estar a 9079 kilómetros no es nada para nosotras.

A mis mejores amigos, "**Davizin**", "**Makulina**", "**Pelli**", **Eros** y **Sergio**, sin los cuales me hubiera costado tener la fuerza suficiente para mirar hacia delante, por su apoyo incondicional y por hacerme sentir especial día tras día, porque como les digo muchas veces no hace falta tener la misma sangre para considerarlos mi familia.

A **Paula Alacer**, por ayudarme a descubrir que "la vida son dos mambos..." y que un café puede ser el comienzo de algo bueno.

Agradecer, por último, pero no menos importante a todas las personas que a lo largo de mi vida han aportado su granito de arena para ser lo que soy. No quiero olvidarme de nadie, pero tengo muy claro que todos saben a quién me refiero.

FINANCIACIÓN

Para llevar a cabo esta Tesis Doctoral, la doctoranda fue beneficiaria de una beca enmarcada en el programa para la contratación de personal investigador de reciente titulación de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (ORDEN EDU/1933/2008).

Este trabajo se ha financiado con el proyecto CONSOLIDER - Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016).

Esta Tesis Doctoral está dedicada a una estrella que me cuida desde el cielo y aunque lo perdí muy pronto no hay día que no esté a mi lado.

A Pepín...

ÍNDICE

- **Capítulo I.** Justificación, planteamiento y objetivos.....1
- **Capítulo II.** Incidencia de *Aeromonas* en carnes y productos cárnicos, aproximación a la evaluación de su patogenicidad y comparación genética con cepas de origen clínico del mismo hábitat geográfico.....11
- **Capítulo III.** Incidencia de *Campylobacter* en carnes frescas y productos cárnicos y comparación genética con cepas de origen clínico.....57
- **Capítulo IV.** Incidencia de *Salmonella* y *Yersinia* en carnes y productos cárnicos listos para el consumo y estimación de su patogenicidad.....97
- **Capítulo V.** Incidencia de *E. coli* productor de toxinas Shiga y *E. coli* Enteropatógeno y evaluación comparativa con cepas de origen clínico.....151
- **Capítulo VI.** Caracterización del riesgo asociado a la presencia de *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli* Enteropatógeno en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León.....195
- **Anexo**.....219
- **Índice de tablas y figuras**.....220

Capítulo I. Justificación, planteamiento y objetivos

1. LA CARNE Y LOS PRODUCTOS CÁRNICOS. SU CONSUMO EN ESPAÑA.

La carne y los productos cárnicos son alimentos básicos para la población española. Así, se estima que en España anualmente se consumen por término medio 164 gramos de carne (incluyendo embutidos) por persona y día, de los que 11,17 gramos, 23,74 gramos y 18 gramos por persona y día corresponden respectivamente a carne fresca de pollo, carne fresca de cerdo y a productos cárnicos de origen porcino listos para el consumo (AESAN, 2011).

2. LA INDUSTRIA CÁRNICA.

Por otra parte, la industria cárnica (incluidos los mataderos) constituye un sector industrial de gran importancia económica España. Así, se estima que su cifra de negocio supone en torno al 2% del producto interior bruto (a precios de mercado) y del 14% del producto interior bruto de la rama industrial (García, 2013).

3. LOS RIESGOS SANITARIOS ASOCIADOS A LAS CARNES Y A LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.

La carne y los productos cárnicos pueden ser vehículo de diferentes agentes patógenos, de naturaleza física, química o biológica, que pueden ser causa de enfermedades en los consumidores. Tal circunstancia, además del problema sanitario puntual, tiene graves consecuencias colaterales de gran impacto económico, al verse afectada la confianza de los consumidores y, en consecuencia, serlo también el consumo bien de las carnes en general, bien de algún tipo particular o, en ocasiones, el de algún producto cárnico concreto. El ejemplo paradigmático de tales consecuencias fue la conocida coloquialmente como “crisis de las vacas locas” y el importante impacto en el consumo de carne de vacuno en España que siguió a la detección del primero y sucesivos casos de Encefalopatía Espongiforme Bovina a partir de noviembre del año 2000 (Balfagón et al., 2001).

4. LOS RIESGOS DE ORIGEN BIOLÓGICO Y LAS PARTICULARIDADES DE ALGUNOS RIESGOS ASOCIADOS A LA CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS DE LAS CARNES Y DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.

Del conjunto de riesgos sanitarios asociados al consumo de carnes y productos cárnicos, los de origen biológico son objeto de una especial atención. Tal circunstancia se debe, por un lado, a la gran distribución de algunos de los peligros biológicos y, por otro, a la complejidad que para la gestión del riesgo supone que algunos de ellos (en particular la mayoría de las bacterias patógenas y los mohos toxigénicos) sean capaces de multiplicarse en el sustrato cárnico y, en consecuencia, se magnifique (en términos sanitarios) la consecuencia de una mínima contaminación bien de las materias primas alimenticias bien de los propios productos listos para la comercialización.

5. LA IMPORTANCIA DE LOS ALIMENTOS COMO VÍA DE TRANSMISIÓN DE LOS PELIGROS.

En términos de salud pública y para delimitar el ámbito en el que deben centrarse los esfuerzos de gestión del riesgo, es importante considerar la importancia de la vía de transmisión del agente (si lo es única o principalmente alimentaria y si se asocia a uno o a varios tipos de productos alimenticios). Así, se ha estimado (Mead et al., 1999) que la transmisión es exclusivamente o mayoritariamente alimentaria para *Salmonella* (especies no tifoideas), con un 95% de ocasiones en que la transmisión del agente se lleva a cabo por esta vía, *Campylobacter* (80%), la intoxicación estafilocócica (100%), *Yersinia enterocolitica* (90%), *Escherichia coli* verocitotoxigénicas (85%) y *Listeria monocytogenes* (99%) entre otros. Ha de reconocerse, sin embargo, que esas estimaciones de la importancia de la vía alimentaria como mecanismo de transmisión de estos agentes no son compartidas por todos los expertos que se han pronunciado sobre las mismas (Biohazard Panel, 2008), si bien, aún con variaciones en el valor absoluto, hay un razonable consenso científico en la gran importancia de la vía alimentaria para la transmisión de los agentes biológicos antes señalados (Biohazard Panel, 2008).

6. LA DIMENSIÓN DE LOS PROBLEMAS SANITARIOS: LOS AGENTES ETIOLÓGICOS MÁS RELEVANTES.

Para evaluar la importancia sanitaria de los diferentes agentes de transmisión alimentaria, es habitual recurrir a dos fuentes primarias, por un lado los resultados de la investigación epidemiológica de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos y por otro las estadísticas sanitarias relativas al diagnóstico de casos en los centros hospitalarios.

En España, se dispone de un sistema organizado de análisis e informe de los brotes de infecciones e intoxicaciones de origen alimentario desde el año 1976 y el mismo se incluye en el sistema de enfermedades de declaración obligatoria desde el año 1982. Un año más tarde (1983) inició su funcionamiento el Sistema de Información Microbiológica (SIM), como sistema de vigilancia complementario del de enfermedades de declaración obligatoria, si bien el SIM, que recoge los datos de diagnósticos hospitalarios de determinadas enfermedades infecciosas, tiene carácter voluntario y, en el momento actual, se estima que recoge la información del 30% de la población española (Servicio de Información Microbiológica, 2013).

La investigación de los brotes ha puesto de manifiesto que la carne y los productos cárnicos se han involucrado en más del 7 % de los brotes de enfermedades de transmisión alimentaria, excluidos los brotes hídricos, [en los que se identificó el producto alimenticio responsable] registrados en nuestro país en el período 2004-2007 (Martínez et al., 2008). De estos brotes asociados al consumo de carne y productos cárnicos, el 59,33 % correspondían a productos alimenticios diferentes de la carne de pollo (Martínez et al., 2008).

En relación con los agentes responsables de los brotes, también considerando el período antes señalado (2004-2007), en más de la tercera parte de los mismos no se estableció asociación epidemiológica con ningún agente concreto (en las estadísticas figuran como “agente desconocido”, Tabla 1) siendo, con gran diferencia los diferentes serotipos de *Salmonella* (en particular los no tifoideos y no específicos de hospedador) los agentes responsables de la mayor parte de los brotes en los que se identificó el agente (más de un 70%, Tabla 1), ocupando, asimismo, lugares relevantes otras bacterias patógenas (Tabla 1).

Tabla 1. Agentes causales de los brotes de enfermedades de transmisión alimentaria (no hídrica) registrados en España durante los años 2004-2007*

Agente	% de brotes
<i>Salmonella</i> spp	48,1
Desconocido	35,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,2
Norovirus	3,2
Tóxicos naturales (alimentos de origen animal)	1,8
<i>Clostridium perfringens</i>	1,6
Tóxicos naturales (alimentos de origen vegetal)	1,4
<i>Campylobacter</i> spp.	0,8
<i>Bacillus cereus</i>	0,6
<i>Trichinella spiralis</i>	0,4
<i>Brucella</i> spp	0,4
<i>Escherichia coli</i> (no enterohemorrágica)	0,4
<i>Shigella</i>	0,3
Virus de la Hepatitis A	0,3
Sustancias químicas	0,3
<i>Clostridium botulinum</i>	0,1
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	0,1
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	0,1
Otros	2,0

* Adaptada de Martínez et al. (2008).

En relación con los datos relativos a los diagnósticos realizados en los hospitales españoles, si bien hay que considerar que los datos reflejados no proceden de todas las Comunidades Autónomas españolas, sino de sólo de un número determinado de laboratorios de referencia (por ejemplo, en el año 2011 proporcionaron datos un total de 76 hospitales correspondientes a 12 Comunidades Autónomas, Servicio de Información Microbiológica, 2013), los microorganismos causantes de infecciones gastrointestinales son principalmente *Campylobacter*, *Salmonella*, Rotavirus, *Yersinia* y *Cryptosporidium* (Servicio de Información Microbiológica, 2013).

Así, para los años 2010 y 2011, las cifras que recoge dicho sistema son respectivamente para cada uno de los años y las bacterias antes señaladas: *Campylobacter* (6334 y 5469), *Salmonella* (4420 y 3786) y *Yersinia* (324 y 265).

Si bien para las bacterias del género *Aeromonas* el Servicio de Información Microbiológica no recoge datos posteriores al año 2008, en los años anteriores se situaba como cuarto agente de los casos de infecciones gastrointestinales recogidos en

dicho sistema de información sanitaria (454 y 421 casos en los años 2007 y 2008 respectivamente). Por otra parte, su creciente importancia como agentes patógenos, no sólo de individuos inmunodeprimidos o de corta edad, sino también de pacientes inmunocompetentes (Hänninen et al., 1995), hace de este microorganismo un importante objeto de estudio. El hecho de que se encuentren especies de *Aeromonas* en productos alimenticios, particularmente en la carne que se comercializa, ha sido recogido en varios estudios realizados en distintas partes del mundo (Yadav et al., 1998).

Por lo que respecta a *Escherichia coli* enterohemorrágica, si bien su prevalencia en los casos de infecciones gastrointestinales diagnosticados en los hospitales españoles es reducida (37 y 12 casos en los años 2010 y 2011 respectivamente, Servicio de Información Microbiológica, 2013), su importancia deriva tanto de la elevada patogenicidad de determinadas cepas pertenecientes principalmente al serotipo O157:H7, como de su reducida dosis infectiva y del gran número de afectados en la mayor parte de los brotes (Varios, 2001).

7. EL PODER PATÓGENO DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS.

El aislamiento en un determinado producto alimenticio de una cepa que se adscriba taxonómicamente a un determinado grupo habitualmente patógeno (p.e., aislamiento de una cepa de *Salmonella*) constituye la primera aproximación al establecimiento de la posible peligrosidad del producto en cuestión. Sin embargo, la variabilidad en el arsenal patogénico de los diferentes agentes etiológicos y la multiplicidad de factores de virulencia de cada uno de ellos (Doyle y Beuchat, 2013), obliga a ir más allá para establecer el nivel real de riesgo. De las diferentes alternativas posibles para lograr tal aproximación una de las más elementales consiste en la comparación (genética) de las cepas aisladas de los alimentos y de las cepas aisladas de los casos clínicos. El carácter idéntico (en términos genéticos) de cepas de uno y otro origen prueba una ruta de transmisión concreta (Kass y Riemann, 2006). La mayor o menor similitud (también en términos genéticos) entre unas y otras constituye una de las primeras aproximaciones para valorar la peligrosidad real de las primeras (Kass y Riemann, 2006).

8. LOS AGENTES ETIOLÓGICOS SELECCIONADOS PARA ESTE TRABAJO.

Del conjunto de bacterias patógenas de posible transmisión por la carne y los productos cárnicos, este trabajo se centra en cinco de ellas: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Yersinia* y *Escherichia coli* por su importante presencia en las estadísticas sanitarias y por constituir el intestino animal su hábitat primario. Si bien por importancia sanitaria y por la trascendencia que la multiplicación en el sustrato cárnico tiene para el desarrollo del proceso patológico otras como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum* merecerían igualmente una gran atención, la participación del grupo de investigación en que se integra la autora de esta tesis doctoral en un proyecto múltiple (el proyecto denominado CARNISENUSA, financiado por el programa Consolider-Ingenio 2010, del entonces Ministerio de Educación y Ciencia), que conllevó un reparto de tareas entre los diferentes equipos integrantes, y la circunstancia de que algunas de dichas bacterias hubieran sido objeto de atención en etapas previas por el grupo de investigación del que forma parte la autora de esta tesis doctoral (González-Fandos et al., 1994, Encinas et al., 1999; Santos et al., 1998) justifican la elección realizada.

9. LA IMPORTANCIA DE LOS DATOS PARA LA GESTIÓN DE LOS RIESGOS.

Si bien son múltiples los factores condicionantes de las infecciones de transmisión alimentaria, es indudable que la frecuencia de presentación de los distintos agentes (peligros) en los productos alimenticios en el momento del consumo (probabilidad de exposición al peligro) es uno de los más importantes a la hora de caracterizar los riesgos de aparición de estas infecciones y, en su caso, de las enfermedades derivadas (CESFPC, 1998). La necesidad de datos fiables acerca de la prevalencia de los peligros en las porciones de los productos alimenticios listos para el consumo es puesta constantemente de manifiesto por las entidades encargadas de la evaluación del riesgo (SCF, 1997; EFSA, 2008; AESAN, 2008).

La presencia de bacterias patógenas en los productos de consumo de origen cárnico (sean adecuados o no para su consumo sin preparación culinaria) importa no sólo a los efectos de la posible persistencia de estos peligros en los productos a

consumir (en cantidades suficientes para desencadenar infecciones y/o enfermedades), sino también como posible fuente de contaminación en los lugares de preparación de las comidas. La importancia de la contaminación cruzada, así como de los fallos en la preparación de las comidas y en la conservación de éstas o sus materias primas (manipulaciones inadecuadas), como factores causales contribuyentes en buena parte de los brotes de enfermedades de transmisión alimentaria declarados en nuestro país está claramente establecida (Martínez et al., 2008).

10. OBJETIVOS.

En este contexto se planteó la realización de esta Tesis Doctoral cuyos objetivos fueron:

- Objetivo general: Aportar datos significativos que permitan una evaluación cuantitativa del riesgo para la salud asociado a la ingesta de bacterias patógenas con los productos alimenticios de origen cárnico.
- Objetivos concretos:
 - ✓ Establecer la prevalencia de las principales bacterias patógenas (géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Yersinia*, así como *Escherichia coli* verotoxigénica) en los productos alimenticios de origen cárnico en el momento de su comercialización en los centros de venta en la ciudad de León.
 - ✓ Establecer la correlación entre la prevalencia [en los productos alimenticios de origen cárnico en el momento de su comercialización] de dichas bacterias patógenas y la de los principales genes marcadores de virulencia asociados a cada una de ellas.
 - ✓ Evaluar la similitud genética entre las cepas (de los grupos patógenos antes indicados) aisladas de los productos alimenticios antes mencionados y las aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.
 - ✓ Realizar una evaluación de la exposición, por el consumo de productos cárnicos, a las bacterias patógenas anteriormente indicadas por determinadas carnes frescas y ciertos consumidores de la ciudad de León.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. AESAN [Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición] 2008. Informe del Comité Científico de la AESAN, en relación con una petición planteada por el Director Ejecutivo de la Agencia acerca del establecimiento de un criterio microbiológico para *Salmonella* en los huevos destinados al consumo directo. Revista del Comité Científico de la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), 7, 31-44.
2. AESAN (2011). ENIDE (Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española). Disponible http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/datos_consumo/ENIDE.pdf, último acceso en Septiembre del 2013.
3. Balfagón, P. J., & Ramoneda, M. (2001). La encefalopatía espongiforme bovina: un problema de salud pública que genera alarma social. *Enfermedades Emergentes*, 3(2), 78-87.
4. Biohazard Panel of the EFSA (2008). Overview of methods for source attribution for human illness from food-borne microbiological hazards – Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal*, 208 (764), 1-43. Disponible en http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902012958.htm. Último acceso Mayo de 2013.
5. CESFPC [Committee to Ensure Safe Food from Production to Consumption, Institute of Medicine, National Research Council] (1998). *Ensuring safe food from production to consumption*. National Academy Press, Washington DC, USA.
6. Doyle, M.P. & Beuchat, L.R. (2013). *Food microbiology. Fundamentals and frontiers* (4ª ed.) ASM Press, Washington DC, USA.
7. EFSA [European Food Safety Authority] (2008). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Commission on a quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat: source attribution for human salmonellosis from meat. *The EFSA Journal* (2008), 625, 1-32.
8. Encinas, J.P., J.J. Sanz, M.L. García-López & A. Otero (1999). Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *International Journal of Food Microbiology*, 46 (2), 167-172.
9. García, C. (2013). La industria cárnica española y su fortalecimiento por las investigaciones de CARNISENUSA. En “Avances en la producción de elaborados cárnicos seguros y saludables” Ordóñez Pereda, J.A., Jiménez Colmenero, F. y Arnau Arboix, J. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Barcelona. pp. 13-18.
10. González-Fandos, E., M.L. García-López, M. Sierra, & A. Otero (1994). Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and thermonuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic. *Journal of Applied Microbiology*, 77 (5), 549-552.
11. Hänninen, M., & Siitonen, A. (1995). Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiology and Infection*, 115(1), 39-50.

12. Kass, P.H. y H.P. Riemann (2006). Epidemiology of foodborne diseases. In “Foodborne infections and intoxications” (3ª Ed.) Riemann, H.P. & Cliver, D.O. Elsevier, Amsterdam. pp. 3-26.
13. Martínez, E.V., Varela, M.C., Cevallos, C., Hernández-Pezzi, G., Torres, A. & Ordóñez, P. (2008). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en España, 2004-2007 (excluye brotes hídricos). Boletín Epidemiológico Semanal 16 (21), 241-252. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid).
14. Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Breese, C. Shapiro, P.M., Griffin & R.V. Tauxe (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5 (5), 607-625.
15. Santos, J.A., M.D. Collins & A.K. East (1998). Characterization of the genes encoding the botulinum neurotoxin complex in a strain of *Clostridium botulinum* producing type B and F neurotoxins. *Current Microbiology*, 37 (5), 312-318.
16. SCF [Scientific Committee on Food] (1997). Opinión de 13 de junio de 1997 sobre los principios para la realización de la evaluación del riesgo asociado a peligros microbiológicos cuando sea necesaria para el desarrollo de la Directiva de higiene de los productos alimenticios (Directiva 93/43/CEE). List of Reports of the Scientific Committee for Food (1974-1997), Forty-four Series (2000), páginas 5-22. Disponible en http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_44.pdf , último acceso septiembre 2013.
17. Servicio de Información Microbiológica (2013). Informes generales del Sistema de Información Microbiológica. Disponible en <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/sistema-informacion-microbiologica.shtml>, último acceso en Septiembre de 2013.
18. Varios [Instituto Municipal de Salud Pública del Ayuntamiento de Barcelona, Delegación Territorial de Sanidad de Barcelona y Dirección General de Salud Pública del Departamento de Sanidad y Seguridad Social] (2001). Brote de gastroenteritis por *E. coli* O157:H7 en diferentes escuelas de Cataluña. Boletín Epidemiológico Semanal, 9 (20), 213-216.
19. Yadav, A., & Verma, S. (1998). Occurrence of enterotoxigenic *Aeromonas* in poultry eggs and meat. *Journal of Food Science and Technology*, 35(2), 169-170.

Capítulo II. Incidencia de *Aeromonas* en carnes y productos cárnicos, aproximación a la evaluación de su patogenicidad y comparación genética con cepas de origen clínico del mismo hábitat geográfico

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. *Aeromonas* como agente de gastroenteritis humanas.

En España, *Aeromonas* spp. ha ocupado el cuarto lugar como agente microbiológico causal de las enfermedades gastrointestinales según los datos recogidos cada año por el Servicio de Información Microbiológica durante el periodo de 1997 a 2006 (Pablos et al., 2009). Si bien en cuanto a *Aeromonas* no existen datos posteriores al año 2008, su creciente importancia como agentes patógenos, no sólo de individuos inmunodeprimidos o de corta edad, sino también de pacientes inmunocompetentes (Altwegg et al., 1991; Hänninen et al., 1995; Janda et al., 1996; Janda et al., 1998), acompañado de su capacidad para crecer a bajas temperaturas y ser ligeramente halotolerantes (Kirov et al., 2003), hacen de este microorganismo un importante objeto de estudio.

En el género *Aeromonas* se incluyen bacterias de origen acuático que inicialmente pueden ser aisladas de lagos, ríos, estuarios, aguas residuales, aguas subterráneas, aguas potables y una amplia gama de alimentos crudos (Galindo et al., 2007). Debido a su gran ubicuidad y a pesar de no ser un habitante común en el tracto gastrointestinal en humanos, pueden encontrarse en múltiples alimentos cuya ingestión desencadena su aislamiento en heces de animales y humanos (Demarta et al., 2000; Rodríguez-Calleja, et al. 2006).

1.2. Descripción del género *Aeromonas*.

Según la 9ª edición del “Bergey’s manual of determinative bacteriology” (Bergey et al., 1994) se divide el género en dos grupos: (i) el grupo de las *Aeromonas* psicrófilas inmóviles está formado por una única especie, *A.salmonicida*, un patógeno obligado de peces, el cual es el responsable de la forunculosis sistémica en salmónidos (Janda et al., 1991), que no se aborda más a fondo en esta tesis (ii) el grupo de las *Aeromonas* mesófilas móviles (con un flagelo polar único), que están emergiendo como importantes patógenos en humanos, causando gran variedad de infecciones gastrointestinales y extraintestinales.

Se han aislado 30 especies, 12 subespecies (Euzéby, J.P., 2013), dos biovars y mediante pruebas de hibridación se ha confirmado la existencia de 17 grupos de hibridación (HGs) (Carnahan et al., 2005; Pablos et al., 2009). De las 30 especies, *A. hydrophila* (HG1, HG2 y HG3), *A. caviae* (HG4) y *A. veronii* bv. *sobria* (HG8/10) han sido las más comúnmente aisladas de infecciones en humanos, representando un 85% de los casos clínicos con *Aeromonas* como agente etiológico (Janda, 1991). *A. caviae*, en particular, es la especie más representativa en enteropatogenicidad pediátrica (Namdari et al., 1990; Longa et al., 2005). Uno de los problemas asociados al estudio de *Aeromonas* como agente patógeno humano radica en la dificultad para clasificar los aislados a nivel de especie ya que las fenoespecies no se corresponden con un grupo de hibridación único (Abbott et al., 2003). También lo dificulta el hecho de que no exista un buen modelo animal para llevar a cabo investigaciones sobre las consecuencias de la infección (Parker et al., 2010).

Las especies del género *Aeromonas* son bacilos Gram negativos mesófilos, fermentadores de la glucosa, oxidasa positivos, y resistentes al compuesto vibriostático O/129. En los medios de aislamiento, las colonias son circulares, de borde regular, translúcidas, de aspecto liso y, en agar sangre, betahemolíticas. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 22-35°C. La de las cepas clasificadas como psicrófilas se sitúa entre los 22-25°C (Castro-Escarpulli et al., 2002), pero pueden llegar a crecer en el intervalo entre 5-35°C, y la de las cepas mesófilas es de 28°C, pero pueden llegar a crecer en el rango entre 0-45°C (Mateos et al., 1993).

Aeromonas spp. son predominantemente patógenas para animales poiquilotermos, incluyendo anfibios, peces y reptiles (Carnahan et al., 1996). Sin embargo las *Aeromonas* mesófilas se encuentran actualmente implicadas como agentes etiológicos en numerosos casos clínicos, principalmente casos de gastroenteritis (Altwegg et al., 1991; Hänninen et al., 1995). En dichos casos, las tres especies más comúnmente identificadas son *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria*. Además, las dos últimas se asocian a la “diarrea del viajero”. Esta infección afecta tanto a individuos inmunocomprometidos como inmunocompetentes y se manifiesta en tres formas: una aguda autolimitada con diarrea acuosa; otra disentería, con mucosidad y diarrea con sangre y por último, diarrea crónica (Burke et al., 2010; Parker et al., 2010).

1.3. Taxonomía e importancia sanitaria.

La primera observación de *Aeromonas* spp. tuvo lugar en 1890 por Zimmermann que los consideró *Bacillus*. En 1891, Sanarelli aisló una cepa en sangre de rana y la denominó *Bacillus hydrophilus fuscus*. Varios años más tarde, en 1936, Kluver y Van Neil le dieron el nombre de *Aeromonas* (del griego “aer-monas”: unidades productoras de gas).

El género *Aeromonas* ha sufrido una serie de revisiones taxonómicas y de la nomenclatura en los últimos 20 años. Aunque originalmente fue colocado en la familia *Vibrionaceae*, donde también se incluyen los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*, investigaciones posteriores demostraron que la filogenética del género *Aeromonas* no está estrechamente relacionada con los vibrios sino que más bien forma una unidad monofilética en el subgrupo γ -3 de la clase Proteobacteria (Abbott et al., 2003). Debido a estas conclusiones se propuso la exclusión de *Aeromonas* de la familia *Vibrionaceae* y su transferencia a una nueva familia, la *Aeromonadaceae* (Abbott et al., 2003). La taxonomía actual se basa en los análisis de hibridación DNA-DNA y las secuencias del 16S rRNA. Sin embargo, existen ciertas discrepancias entre sus resultados debido al alto grado de conservación de las secuencias del 16S rRNA (97,8-100%) y la posible existencia de polimorfismos en su genoma, especialmente en *A.media* y *A.veronii* (Morandi et al., 2005). Las investigaciones recientes han empezado a utilizar otro tipo de secuencias para identificar dichas bacterias a nivel de especie, tales como *rpoB*, *gyrB* (Yáñez et al., 2003), *dnaJ* (Nhung et al., 2007) y *recA* (Sepe et al., 2008).

La primera vez que *Aeromonas* spp. fue considerado como un patógeno humano fue en 1954 en el que se aisló de la sangre, los pulmones, el hígado, el bazo, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), y partes necróticas de algunos músculos estriados de una mujer inmunodeprimida. La mujer murió como resultado de la infección (Caselitz et al., 1996). En los años siguientes se han producido muchos más casos confirmados de infección por *Aeromonas* en los seres humanos, con mayor o menor gravedad, pero la forma más común es la gastroenteritis (Parker et al., 2010).

El papel de *Aeromonas* como importantes patógenos humanos en situaciones relacionadas con los desastres naturales se ha reforzado recientemente por el tsunami que afectó a Tailandia en diciembre de 2004. En un estudio de 305 sobrevivientes del

tsunami sobre la piel y tejidos blandos, *Aeromonas* fue clasificado como el patógeno más frecuente, representando más del 20% de los 641 aislamientos identificados (Dixon et al., 2008).

1.4. Mecanismos de patogenicidad de las bacterias del género *Aeromonas* y posibles marcadores de virulencia.

Diversos estudios de patogenicidad bacteriana han permitido la comprensión de parte de las complejas interacciones entre patógenos y sus hospedadores a nivel celular y molecular. La variedad de manifestaciones clínicas observadas en las infecciones provocadas por *Aeromonas* spp. concuerda con la idea de que la patogenicidad de este microorganismo es multifactorial. Estudios recientes apoyan esta hipótesis, además se ha observado que la virulencia en este género es dependiente de la cepa bacteriana, de la ruta de infección y del animal utilizado como modelo (Yu et al., 2005).

Los principales mecanismos de patogenicidad descritos hasta la fecha y los marcadores de virulencia asociados se presentan a continuación.

1.4.1. Factores de virulencia asociados a la célula.

- Invasinas, cuya existencia se demuestra gracias a la visualización de la bacteria en el interior de las células mediante microscopía electrónica, pero no existen aún evidencias de un gen que codifique para ellas (Naharro et al., 2011).
- Proteínas de membrana que están involucradas en la adherencia de *Aeromonas* spp. al hospedador (Naharro et al., 2011).
- Lámina S es una matriz proteica de naturaleza paracristalina que forma una envoltura externa sobre la pared celular. Las láminas S bacterianas hacen de interfase entre la célula y el medio, y su papel patogénico se relaciona con un aumento de la capacidad de adhesión y colonización de mucosas, su actividad antifagocitaria, sus propiedades antigénicas, el constituir un lugar de anclaje en exoenzimas hidrolíticas y ser un lugar de recepción de bacteriófagos, entre otros (Beveridge et al., 1997). Las especies de *Aeromonas* mejor estudiadas que poseen lámina S son *A. salmonicida* (cuya lámina S es comúnmente conocida como lámina A) y *A. hydrophila* (Dooley et al., 1988; Trust et al., 1980), aunque también se ha descrito la lámina S en *A. veronii* bv. *sobria* (Kokka et al., 1990). Ambas *Aeromonas* mesófilas que poseen lámina S pertenecen al serogrupo O:11

(Sakazaki et al., 1984), serogrupo frecuentemente asociado con infecciones humanas (Kokka et al., 1990), aunque es posible que otras *Aeromonas* spp. mesófilas también la produzcan.

Se han identificado los genes que codificaban para ambas láminas, siendo el *vapA* en el caso de *A.salmonicida* y el *ahsA* en *A.hydrophila* y *A.veronii* bv. *sobria* de serogrupo O:11. Tanto en un grupo como en el otro la pérdida de dicha lámina está asociada a una disminución de la virulencia (Gavin et al., 2003).

- Adhesinas. Kirov y col. (1993) describieron la adhesión como un factor de virulencia esencial en las *Aeromonas* que infectan a través de las mucosas o causan gastroenteritis, ya que dichas moléculas permiten al microorganismo adherirse a receptores específicos que se encuentran en la superficie de células eucariotas. Entre las especies del género que presentan mayores valores de adhesión a cultivos de líneas celulares humanas o de otros mamíferos, *A.veronii* bv. *sobria* se ha descrito como la más adhesiva (Kirov et al., 1993) y más del 30% de los aislados clínicos de *A.caviae* son también adherentes (Namdari et al., 1991; Neves et al., 1994). La especie menos eficiente a nivel de adhesión de entre las tres más frecuentes en infecciones humanas es *A.hydrophila* (HG1, HG2 y HG3). (Kirov et al., 1993)

Se han descrito dos clases de adhesinas en *Aeromonas* spp. mesófilas, las que están asociadas a apéndices filamentosos (fimbrias o pili) y las que se asocian con proteínas de la membrana externa. De este último grupo, podemos decir que la principal adhesina se puede considerar la lámina S descrita anteriormente (Atkinson et al., 1987). Además, diversos estudios han propuesto que las porinas de *A.hydrophila* actúan como adhesinas tipo lectina por la unión de dicha cepa a las superficies ricas en carbohidratos como los eritrocitos y posiblemente al intestino humano (Kirov et al., 1993; Quinn et al., 1994).

- Cápsula. La cápsula es un polisacárido extracelular que envuelve a la bacteria mientras permanece fijado a la misma y que actúa de prominente antígeno, desempeñando importantes papeles en la patogenicidad de muchas bacterias. La cápsula contribuye a la resistencia a la acción bactericida del complemento y a la fagocitosis (Merino et al., 1997b; Zhang et al., 2002). Además, favorece la adherencia a otras bacterias y/o tejidos del huésped y actúa como barrera frente a

moléculas hidrofóbicas tóxicas. Sin embargo, la información genética acerca de la misma es muy reducida. (Zhang et al., 2002)

- Sideróforos. Las *Aeromonas*, como otras bacterias patógenas, secretan sideróforos, ligandos específicos de Fe (III) de bajo peso molecular, para obtener sus suplementos de hierro, aunque algunos sideróforos pueden ser inactivados por diferentes componentes del suero. Algunas *Aeromonas* también adquieren el hierro *in vivo* por contacto directo entre proteínas secuestradoras de hierro del huésped y alguna proteína de unión de la bacteria (Stintzi et al., 2000). Otro mecanismo alternativo para obtener hierro sin la intervención de sideróforos es el uso del grupo hemo como fuente de hierro, sobre todo en forma de hemoglobina. Este mecanismo requiere de la destrucción hemolítica de las células huésped para acceder al hierro del grupo hemo (Gavin et al., 2003).
- Flagelo y movilidad. Las especies mesófilas de *Aeromonas* son normalmente móviles mediante un flagelo polar y sin vaina responsable de la natación en medio líquido. A pesar de que la especie psicrófila *A. salmonicida* ha sido definida dentro del género como no flagelada y no móvil, algunos estudios sugieren que algunas cepas de *A. salmonicida* expresan con baja frecuencia un flagelo polar sin vaina (Umelo y Trust, 1997). McIntoch y Austin (1991) han descrito que la incubación de *A. salmonicida* a temperaturas supraóptimas (de 30 a 37°C) y en medio líquido con alta viscosidad resulta en la generación de movilidad por la expresión de un flagelo polar en un 1% de las células observadas.

Ciertas cepas de *Aeromonas* son capaces de producir flagelos laterales cuando se cultivan sobre superficies sólidas (Shimada et al., 1985), pero sólo el 50-60% de las especies comúnmente aisladas de diarreas de *Aeromonas* mesófilas son capaces de expresar este segundo tipo de flagelo, que tampoco tiene vaina (Kirov et al., 2002).

La producción de flagelo comprende la expresión de más de 50 genes y es además muy costosa en términos de recursos y energía para las bacterias (Macnab et al., 1996), por lo tanto es ventajoso para la célula poder sintetizar el flagelo sólo cuando lo necesita. Además, el poseer dos sistemas flagelares distintos, polar y lateral, es relativamente poco común (Gavin et al., 2003).

El gen *lafA* codifica para el flagelo lateral, que mejora la motilidad de la bacteria y por tanto la colonización intestinal del hospedador (Kirov et al., 2002).

- Pili. Son apéndices de superficie que actúan como factores de adhesión a la célula y han sido descritos por Hokama en 1997 en *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria*.
- El lipopolisacárido (LPS) está presente en todas las bacterias Gram negativas y consiste en un complejo glucolipídico localizado en la membrana externa. La única porción fosfolipídica, el lípido A, es una estructura altamente conservada y ligada de manera covalente al complejo polisacárido, el antígeno O (Ag-O), el cual se extiende hacia el exterior celular y se compone de unidades oligosacáridicas repetidas que varían entre especies (Reeves et al., 1996).
El género *Aeromonas* se ha clasificado en 96 serogrupos, 44 basados en el antígeno O del LPS (Sakazaki et al., 1984) y el resto en un nuevo esquema extendido por Thomas et al., (1990). Los serogrupos O:11, O:16 y O:34 tienen especial importancia en infecciones humanas (Janda et al., 1996).

1.4.2. Factores de virulencia extracelulares.

- Lipasas. Las más importantes son las fosfolipasas que están asociadas con lesiones intestinales, actuando como hemolisinas o como glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasas. Además, actúan como factores de virulencia por su interacción con los leucocitos humanos o bien afectando a diversas funciones del sistema inmunitario mediante los ácidos grasos libres generados a través de su actividad lipolítica (Kirov et al., 1997).
- Proteasas. Se han identificado tres tipos de proteasas para *Aeromonas* spp.: una serina termolábil y dos metaloproteasas, ambas termoestables pero una sensible y otra insensible al EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Estas proteasas contribuyen a la patogenicidad causando lesiones en los tejidos, provocando activación proteolítica de toxinas, potenciando la invasión y también colaboran en el establecimiento de la infección al ayudar a superar las defensas del huésped (Leung et al., 1988).
- Glicerofosfolípido colesterol acil-transferasa. Su acción fue descrita en *A. salmonicida* pero existe una enzima de características similares en *A. hydrophila*. Es capaz de hidrolizar fosfolípidos aunque su función en la infección en humanos no ha sido descrita (Brumlik et al., 1996).

- Superóxido dismutasa. Se ha descrito en *A. hydrophila* con una función equivalente a la superóxido dismutasa cobre/zinc de *E.coli*. (Leclère et al., 2004)
- Secreción de exotoxinas y/o enzimas hidrolíticas que desempeñan un papel fundamental en los procesos diarreicos.

- Exotoxinas.

- a) Enterotoxinas.

- Citotóxica (aerolisina). Produce un importante daño en el epitelio. Esta molécula tóxica posee actividades hemolíticas y citotóxica además de enterotóxica (Chopra et al., 1993). Sin embargo, también se han aislado de *Aeromonas* moléculas con actividad hemolítica o citotóxica únicamente (Chakraborty et al., 1984). Esta toxina forma poros o canales discontinuos en las membranas plasmáticas, conduciendo a la muerte celular. El gen que codifica para dicha toxina es el *aerA* (Gavin et al., 2003).

- Citotónicas: No producen daños en el epitelio. Son homólogas a la toxina colérica (CT), a pesar de poseer diferentes pesos moleculares y reactividad variable frente a la antitoxina colérica. Pueden ser termolábiles (gen *alt*) o termoestables (gen *ast*) (Gavin et al., 2003).

- b) Hemolisinas. Además de la enterotoxina citotóxica con actividad β -hemolítica (aerolisina), las *Aeromonas* producen otra β -hemolisina que provoca la formación de agujeros en las membranas celulares dando lugar a lisis osmótica y destrucción completa de los eritrocitos. Sin embargo, no muestran homología génica con la aerolisina descrita previamente. La β -hemolisinas de *Aeromonas* son termolábiles (56°C durante 5 minutos), probablemente debido a la inactivación de alguna proteasa necesaria para su activación (Kirov et al., 1997). El gen que codifica este tipo de toxina es el *hlyA*. Otro tipo de hemolisinas del género es la α -hemolisina que produce efectos citotóxicos reversibles y una lisis incompleta de los eritrocitos. (Gavin et al., 2003)

Varios estudios demuestran que la presencia de factores de virulencia en las cepas de *Aeromonas* (Granum et al. 1998, Handfield et al. 1998, Kirov et al., 1993) y la expresión de dichos factores se puede observar a temperaturas de refrigeración (Kirov et al. 1993, Krovacek et al. 1991) por lo que es posible la producción de exotoxinas por parte de *Aeromonas* spp. en mezclas diluidas de alimentos almacenadas en refrigeración.

Por su previsible mayor importancia en el desarrollo de los cuadros entéricos, la búsqueda de genes de virulencia en las cepas objeto de este trabajo se centró en los que codifican para la aerolisina (gen *aerA*), la hemolisina (gen *hlyA*), enterotoxina citotóxica termolábil (gen *alt*) y enterotoxina citotóxica termoestable (gen *ast*).

Además de los genes citados, se evaluó la presencia del gen *lafA* (Gavin et al., 2003) que codifica para el flagelo lateral, cuya importancia radica en la producción de un aumento de virulencia por mejora de la motilidad bacteriana y por lo tanto, de la interacción con el hospedador (Kirov et al., 2002).

1.4.3. Otros factores.

Aparte de los factores anteriormente descritos, cabe destacar la existencia de estudios que proponen la posibilidad de que ciertas cepas de *Aeromonas* hayan adquirido la capacidad de producir toxinas similares a las toxinas Stx1 y Stx2 aisladas de *Shigella*, aisladas de pacientes que sufrieron una infección extraintestinal que cursaba con diarrea (Haque et al., 1996; Snowden et al., 2006). Las toxinas Shiga producen diarrea y en casos remotos pueden desembocar en colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Parker et al., 2010).

1.5. Objetivos.

Dentro del objetivo general tendente a aportar datos significativos que permitan una evaluación cuantitativa del riesgo para la salud asociado a la ingesta de bacterias patógenas del género *Aeromonas* con los productos alimenticios de origen cárnico, los objetivos concretos del trabajo presentado en este capítulo fueron:

- Establecer la prevalencia de *Aeromonas* spp. en los productos alimenticios de origen cárnico en el momento de su comercialización en los centros de venta en la ciudad de León.
- Determinar la prevalencia de las cepas de *Aeromonas* portadoras de los genes de virulencia más frecuentemente asociados a los mecanismos patogénicos de enteritis en los mismos productos alimenticios.
- Evaluar la importancia sanitaria de las cepas de *Aeromonas* aisladas de carnes y productos cárnicos mediante la estimación de su similitud genética con las cepas aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos, así como con las cepas procedentes de otros orígenes (agua, pescado y carne de conejo).

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Toma de muestras.

2.1.1. Muestras de alimentos. Se analizaron 336 muestras procedentes de diversos productos cárnicos (carnes frescas de diversas especies, productos listos para el consumo) adquiridas en varios supermercados de la ciudad de León cuyos productos tenían un origen (suministrador) diferente. Se llevaron a cabo muestreos regulares (toma de muestras semanal) en dos periodos de tiempo; uno durante la campaña 2008-2009 y otro durante la campaña 2009-2010. En cada estación del año se analizaron un total de seis lotes correspondientes a tres supermercados, distribuidos en dos zonas distintas de la ciudad de León (en el anexo se adjunta un mapa localizador de los puntos de venta analizados en el informe). De cada lote se tomaron muestras de cinco tipos de productos cárnicos listos para el consumo (jamón cocido, pechuga de pavo, mortadela, chorizo, salchichón) y dos tipos de carnes frescas (pechuga de pollo y lomo de cerdo). Se adquirieron tanto productos preenvasados como no preenvasados.

De manera adicional, se realizó un segundo muestreo durante los meses de octubre y noviembre del año 2011, en el que se analizaron 72 muestras de la misma manera que en el caso anterior a excepción de que la toma de muestras únicamente se realizó sobre productos frescos, pechuga de pollo y lomo de cerdo. La toma de muestras se realizó siempre los lunes. Los productos se adquirían, como si de un consumidor habitual se tratase, en los supermercados seleccionados. Se introdujeron en una nevera portátil (7°C) en la que se mantuvieron hasta su análisis, que se realizó dentro de las tres horas siguientes a su compra.

2.1.2. Muestras procedentes de pacientes de Hospital de León. Se aislaron 65 cepas de *Aeromonas* spp. a partir de muestras procedentes de pacientes con gastroenteritis cedidas por el Hospital de León en el periodo comprendido entre marzo y mayo del año 2011, ambos inclusive. Las muestras nos fueron enviadas en placas Columbia agar con 5% de sangre ovina (Becton Dickinson, Sparks MD, USA).

2.2. Detección y aislamiento de *Aeromonas*.

2.2.1. De muestras de alimentos. A partir de 25 g del alimento, se realizaron homogeneizados en bolsa de Stomacher con 225 ml de agua de peptona al 0,1% y se realizó una siembra directa en Rojo Fenol Agar base (Difco, Lawrence, KS 66044-8130, USA) suplementado con 10 gramos (g) de almidón (almidón de patata, Panreac Química SA. Barcelona, España) y 10 miligramos (mg) de ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH USA) por litro de medio (Rodríguez-Calleja et al. 2006a).

2.2.2. A partir de muestras de pacientes de Hospital de León. Se enriqueció una porción representativa de la masa bacteriana presente en la superficie de las placas recibidas en *Nutrient Broth* (Oxoid, Basingstoke Hampshire, RG24 8PW, United Kingdom) durante 24 horas a 37°C y a continuación, el aislamiento se realizó en el medio descrito en el punto anterior siguiendo el mismo procedimiento (Rodríguez-Calleja et al. 2006a).

2.3. Identificación de las cepas aisladas. De cada medio de cultivo se escogieron varias colonias típicas (colonias amarillas con halo de aclaramiento por hidrólisis del almidón tras inundar la placa con yodo) para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas (Harrigan, 1998) y mediante el sistema miniaturizado de identificación API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Las pruebas bioquímicas llevadas a cabo para la identificación de *Aeromonas* fueron las siguientes:

- Tinción de Gram: Es un tipo de tinción diferencial, útil en el laboratorio como prueba para un rápido diagnóstico presuntivo de agentes infecciosos. Las bacterias se califican como Gram + o Gram -, en función de las diferencias en la composición de su pared y arquitectura celular. Para llevarlo a cabo se suspendieron las colonias de un cultivo joven en una gota de agua miliQ estéril sobre un portaobjetos y se dejó secar. Se mezcló con una solución de cristal violeta durante un par de minutos y se lavó con agua; a continuación, se aplicó una solución de lugol que actúa como mordiente formando compuestos insolubles con colorantes determinando su fijación a

las bacterias. Se decoloró con etanol hasta que el portaobjetos estuvo limpio y se cubrió finalmente con una solución de safranina durante dos minutos y posteriormente, se observó al microscopio. Las bacterias Gram positivas son de color violeto intenso ya que el etanol no las decolora, mientras que las Gram negativas (como las *Aeromonas*), muestran una coloración rosa-rojiza.

- Oxidasa y catalasa. La catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, mientras que la reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

Para la prueba de la oxidasa se pusieron en contacto las colonias de nuestro microorganismo con una solución acuosa de clorhidrato de dietil- o tetrametil-p-fenilendiamina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) al 1% (p/v) que se preparaba diariamente. Las colonias que poseían oxidasas tomarán un color púrpura en 5-10 segundos.

Para la prueba de la catalasa utilizamos como reactivo peróxido de hidrógeno (Panreac) al 30% (v/v) y si el microorganismo tenía dicha actividad enzimática, se producía la liberación de oxígeno libre que se visualizaba en forma de burbujas.

Las *Aeromonas* spp. son oxidasa y catalasa positivas.

- Resistencia al agente O129. Se emplearon discos de papel de filtro estériles impregnados en 150 µl de O129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropil pteridina fosfato, Oxoid) en una solución de acetona al 0,1%. Se inocularon placas de Nutrient Agar (Oxoid, Basingstoke, UK) mediante un asa de cultivo a partir de colonias purificadas en *Tryptone Soya Agar* (TSA, Oxoid) y se colocaron los discos sobre las estrías realizadas. Se incubaron las placas a 30°C durante 24 horas. La aparición de una zona de inhibición alrededor del disco nos indicó que el microorganismo era sensible al agente O129 y en el caso contrario, nos indicó la resistencia al mismo. Las *Aeromonas* spp. son resistentes al agente O129 lo cual nos permite distinguir las de *Vibrio* spp., que son sensibles.
- Fermentación del manitol e inositol. Se inoculó el microorganismo sobre tubos de hemólisis, con caldo *Purple Broth Base* (Difco) que poseían una

solución al 1% (p/v) de manitol (Difco) e inositol (Difco) respectivamente, por duplicado (uno se mantuvo en condiciones de aerobiosis y otro se cubrió con vaselina para crear anaerobiosis). Se incubaron durante 24 horas a 30°C y se observaron los resultados por el cambio de color producido, del morado al amarillo si el microorganismo es capaz de fermentar el azúcar. Los microorganismos buscados (*Aeromonas*) son fermentadores del manitol pero no del inositol.

- Hidrólisis de la esculina. Se inocularon tubos de hemólisis con un medio compuesto de peptona bacteriológica, esculina al 0,1% (p/v), citrato férrico y agua destilada (Harrigan et al., 1998). Para cada cepa se emplearon dos tubos, uno de ellos se mantuvo en aerobiosis y el otro se cubrió con vaselina para crear condiciones de anaerobiosis. Se incubaron durante 7 días a 30°C y se observó el color tras la incubación. Los microorganismos capaces de provocar la hidrólisis de la esculina producen un cambio de color en el medio que va del amarillo al negro. Las *Aeromonas* spp. hidrolizan la esculina.
- Reacciones de capacidad de fermentación y oxidación de carbohidratos. Se empleó el *OF Basal Medium* (Oxidation-Fermentation Basal Medium, Difco) Al mismo, se incorporaron glucosa (Panreac), sacarosa (Panreac) y salicina (Sigma-Aldrich Chemie), en todos los casos a una concentración del 1% (p/v). Si el microorganismo es capaz de utilizar el azúcar produce ácidos y por tanto, vira el indicador de pH del medio de cultivo (azul de bromotimol) a color amarillo. Se inocularon dos tubos por picadura y uno de ellos se cubrió con vaselina líquida que permite la incubación en condiciones de anaerobiosis. Si el microorganismo tiene un metabolismo oxidativo sólo vira el color del tubo sin vaselina, pero si tiene un metabolismo fermentativo el color vira en ambos tubos. Se incubaron a 30°C durante 24 horas. *Aeromonas* spp. nos dio un perfil de utilización de dichos azúcares que nos permite adscribirlos a una especie concreta (Rodríguez-Calleja et al., 2006).
- Producción de gas. Se utilizó un caldo Nutrient Broth (Oxoid) con una concentración de glucosa (Panreac) del 1% (p/v) depositada en un tubo de ensayo con una campana de Durham. Se inoculó el microorganismo, se incubó 24 horas a 30°C y se observó la producción de gas en la campana.

- API 20E (BioMérieux). Es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram -. Se compone de una serie de pruebas estandarizadas y miniaturizadas, y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo se corresponde con una prueba bioquímica distinta (ONPG: orto-nitro-fenil- β -D-galactopiranosido; ADH: arginina dehidrolasa; LDC: lisina descarboxilasa; ODC: ornitina descarboxilasa; CIT: uso del citrato; H₂S: producción de ácido sulfhídrico; URE: ureasa; TDA: triptófano desaminasa; IND: prueba del indol; VP: Voges-Proskauer; GEL: gelatinasa; GLU: prueba de la glucosa; MAN: fermentación/oxidación del manitol; INO: fermentación/oxidación del inositol; SOR: fermentación/oxidación del sorbitol; RHA: fermentación/oxidación de la ramnosa; SAC: fermentación/oxidación de la sacarosa; MEL: fermentación/oxidación de la melobiosa; AMY: fermentación/oxidación de la amigdalina; ARA: fermentación/oxidación de la arabinosa). La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira.

A partir de colonias purificadas en TSA (Oxoid), con una asada de las mismas se creó una suspensión de bacterias en solución salina al 0,85% (p/v). A partir de esa solución (una vez estandarizada en una escala de McFarland) se inocularon con una pipeta los pocillos, rellenando unos de ellos únicamente el pocillo, otros el pocillo y la cúpula (CIT, VP y GEL) y otros completando la cúpula con vaselina para crear anaerobiosis (ADH, LDC, ODC, H₂S y URE). Se incubaron durante 24 horas a 30°C.

Tras la incubación de la tira API, se valoraron los resultados en función del cambio de color que se produce en los pocillos. Los resultados conforman un código numérico que se introdujo en la base de datos (BioMérieux, 2013) y que se traduce en un perfil bioquímico que indica en porcentaje la similitud de nuestra cepa problema con los microorganismos incluidos en dicha base de datos.

2.4. Búsqueda de los principales genes marcadores de virulencia asociados a *Aeromonas*.

a) Extracción de ADN. Se depositaron en un tubo *ependorf* colonias purificadas en TSA (Oxoid), al que se añadió 1 mililitro (ml) de tampón PBS (*Phosphate buffered saline*, Oxoid), realizando varios lavados con dicho tampón para eliminar los restos de medio de cultivo. Entre lavados se centrifugaron los tubos durante 3 minutos a 13000g, se eliminó del sobrenadante y se resuspendió el pellet resultante. Finalmente, se resuspendía en una mezcla de 450 μ l de agua destilada miliQ y 50 μ l de tritón X-100 (Sigma-Aldrich Chemie) al 1% (p/v). Se lleva a cabo la ruptura celular mediante ebullición a 99°C durante 10 minutos sin agitación en un baño *Thermomixer compact* (*Eppendorf-Netheler-Hinz, GmbH, Hamburg, Germany*).

b) Determinación de genes marcadores de virulencia. Utilizando métodos basados en la técnica de PCR se investigó, en las cepas previamente identificadas, la presencia de genes asociados a la patogenicidad (*aerA*, *hlyA*, *alt*, *ast* y *laf*) en *Aeromonas* (Pablos et al., 2009).

Se llevó a cabo la reacción en volúmenes finales de 50 μ l por muestra que contenían:

- 20 μ l Master Mix (5PRIME, VWR International Eurolab S.L. Barcelona, España).
- 1 μ l cebador 1 (a una concentración de 250 nM). (XX Integrated DNA Technologies Inc, Belgium).
- 1 μ l cebador 2 (a una concentración de 250 nM). (XX Integrated DNA Technologies Inc, Belgium).
- 23 μ l agua destilada miliQ.
- 5 μ l de la solución de ADN bacteriano.

Una vez preparada la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador (*Mastercycler Eppendorf-Netheler-Hinz*) para realizar la amplificación. Esta reacción se desarrolló mediante la repetición de varios ciclos con temperaturas y tiempos distintos en función del fragmento que se quiere amplificar. El paso más importante es el anclaje de los cebadores que se produce

a temperaturas concretas reflejadas en la tabla 1 para cada uno de los genes investigados. El resto de condiciones de la amplificación empleadas son las que se señalan en la correspondiente referencia de la Tabla 1 para cada gen buscado.

Tabla 1. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en las pruebas para la detección de los genes marcadores de virulencia en *Aeromonas* spp.

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	Unión al cebador (°C)	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
<i>aerA</i>	GC(A/T) GA(G/A) CCC (A/G)TC TAT CC(A/T) G TTT CTC CGG TAA CAG GAT TG	52°C	252	Wong et al. (1998)
<i>hlyA</i>	GGC CGG TGG CCC GAA GAT ACG GG GGC GGC GCC GGA CGA GAC GGG	62°C	597	Wong et al. (1998)
<i>alt</i>	CCA TCC CCA GCC TTT ACG CCA T TTT CAC GCA GGT GAC GCC GT	63°C	300	Chopra et al. (1993)
<i>ast</i>	ATG CAC GCA CGT ACC GCC AT ATC CGG TCG TCG CTC TTG GT	66°C	260	Chopra et al. (1993)
<i>lafA</i>	GGT CTG CGC ATC CAA CTC GCT CCA GAC GGT TGA TG	60°C	550	Gavin et al. (2003)

Aparte de las muestras de ADN de *Aeromonas* procedentes de alimentos o casos clínicos, se utilizaron tres controles:

- Control positivo. Bacteria previamente identificada poseedora de los genes de virulencia buscados. Utilizamos dos cepas clínicas procedentes de la colección de cepas del grupo de investigación, la H1 poseedora de los genes *aerA*, *hlyA* y *ast* y la H14 que tiene los genes *alt* y *laf* (Pablos et al., 2011).
- Control negativo. Bacteria previamente identificada que no posee los genes que buscamos y sirve para comprobar la especificidad de la reacción. Se utilizó la cepa de colección CECT4315 de *Yersinia enterocolitica*.
- Blanco de reacción. Se sustituyó la muestra de ADN por agua destilada miliQ realizando el protocolo de la forma habitual. De este modo, se pretendía comprobar que no se producía contaminación con material genético durante la preparación y el desarrollo de la reacción.

Los fragmentos amplificados en la PCR se visualizaron tras su separación electroforética en un gel de agarosa al 1,5% gelificada en un tampón TAE 1X (Tris 242g/l, EDTA 0,05M pH 8, ácido acético glacial 57,1 ml/l). Se cargaron 5µl del producto de la amplificación por pocillo acompañados de 3 µl de colorante naranja G (Sigma-Aldrich Chemie). Se cargó siempre un patrón de peso molecular, para comprobar el tamaño de los fragmentos amplificados. En cada gel, junto con el referido patrón, se cargaron el control positivo, el negativo, el resto de muestras y por último, el blanco de reacción.

Sobre el gel se realizó una electroforesis (Bio-Rad Laboratories S.A. Barcelona, España) en cubetas horizontales (Scie-plas Ltd. Cambridge, UK) aplicando un voltaje de 99 v, durante unos 45-50 minutos. Dicho voltaje provoca la migración del ADN del polo positivo al negativo. La posición alcanzada tras la migración se observó al teñir los geles por inmersión en bromuro de etidio a una concentración de 1µg/ml (Sigma) durante 15 minutos. Una vez teñidos, se observó el gel en un transiluminador (Bio-Rad) de luz ultravioleta (302nm). Comprobamos que nuestro control positivo nos ofrecía una banda que se correspondía con el tamaño de fragmento que estábamos buscando, que el control negativo no amplificaba para dicho fragmento y que el blanco era negativo para la reacción. Si todo esto era correcto se procedía a fotografiar el gel con una cámara Kodak 1D 3.6 DC290 Zoom Digital Camera (Eastman Kodak Company. Rochester, New York, U.S.A.).

2.5. Evaluación de la similitud genética entre las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de los productos alimenticios antes mencionados, de los procedentes de otros orígenes alimenticios y de casos de gastroenteritis diagnosticados en hospitales de la misma localidad de venta que los alimentos

Para este estudio de comparación genética de diferentes cepas de *Aeromonas*, además de las 125 cepas aisladas de carnes y productos cárnicos y las 65 procedentes de casos de gastroenteritis diagnosticadas en el año 2011 (apartado 2.1.2.), se utilizaron 13 procedentes de muestras de agua potable (Pablos et al., 2009), 5 de muestras de pescado (Herrera et al., 2006), 13 de muestras de carne de conejo (Rodríguez-Calleja et al., 2006) y otras 32 procedentes asimismo de pacientes del Hospital de León recogidas en años anteriores a este trabajo (Pablos et al., 2011). Estas cepas fueron adscritas al género *Aeromonas* según lo descrito por Abbott et al., en 2003, y Pablos et al., en 2010.

Su caracterización fenotípica se puede encontrar en los trabajos llevados a cabo por Herrera et al. (2006), Pablos et al. (2009, 2010) y Rodríguez-Calleja et al. (2006).

Se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), cuyo protocolo se encuentra descrito en la página de Pulsenet International, en la dirección web <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>, con ciertas modificaciones que se describen a continuación.

Se partió de placas de TSA con un cultivo fresco de *Aeromonas* spp. cuyas colonias se transfirieron mediante un hisopo a tubos de 15 ml (VWR International, USA) con 2 ml de *Cell Suspension Buffer* (CSB, 100mM Tris:100mM EDTA, pH 8,0) y se resuspendieron. Se ajustó la concentración de la suspensión celular (diluyendo con CSB o añadiendo células) utilizando un espectrofotómetro en una longitud de onda de 610 nanómetros (nm), hasta que se alcanzó una absorbancia de entre 0,8 y 1. Se transfirieron 400 µl de dicha solución a un tubo *ependorf* al que se añadió 20 µl de Proteínasa K (Amresco, AMRESCO LLC 6681 Cochran Road Solon, OH 44139-0098 USA). Para preparar el *plug* se añadieron a este tubo *ependorf* 400 µl de *Seakem Gold Agarose* (al 1,5% en TE Buffer, 10mM Tris:1mM EDTA pH 8,0). Se dispuso dicha mezcla en los pocillos correspondientes evitando la formación de burbujas y se dejó solidificar 15 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos a 4°C. Se transfirieron los *plugs* una vez solidificados a tubos de 50 ml (VWR International, USA) con 5 ml de *Cell Lysis Buffer* (50mM Tris: 50mM EDTA, pH 8.0 + Sarcosyl al 1%) y 25 µl de Proteínasa K. Se colocaron los tubos en un baño a 55°C en agitación de 150 revoluciones por minuto (rpm) durante dos horas. Tras este periodo de tiempo, se realizaron cinco lavados de los *plugs*, dos veces con agua y tres veces con *TE Buffer* y entre los lavados se mantuvieron los tubos en agitación a 55°C durante 10 minutos.

A continuación, se realizó la restricción del ADN en dichos *plugs* en tubos *ependorf* de 2 ml con 3 µl de enzima *XbaI* (FastDigest *XbaI*, Fermentas GMBH, España), 30 µl de 10X *FastDigest Green Buffer* (Fermentas GMBH, España) y 267 µl de agua miliQ. La digestión se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C a 400rpm en un bloque térmico *Thermomixer compact* (*Eppendorf-Netheler-Hinz*, GmbH, Hamburg, Germany).

Por último, se preparó un gel con *Seakem Gold Agarose* al 1% en 150 ml de TBE 0,5X (Tampón TBE 5X pH 8,3; Scharlau, 08181 Sentmenat, Barcelona, España), se anclaron los *plugs* en el peine fijándolos con dicha agarosa y se dejaron solidificar

durante unos 45 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, se rellenó la cubeta de electroforesis Chef-DR III System (Bio-Rad) con dos litros de TBE 0,5X y se conectó el módulo de frío (Bio-Rad) a 14°C. Las condiciones de la electroforesis son las siguientes:

Tabla 2. Resumen de las condiciones de trabajo de la técnica PFGE realizada en las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas tanto de muestras de alimentos como de muestras de pacientes del Hospital de León

<i>Initial Switch Time</i>	2,2 s
<i>Final Switch Time</i>	54,2 s
Voltaje	6
<i>Included Angle</i>	120°
<i>Run Time</i>	19 horas

Tras las 19 horas se tiñó el gel en bromuro de etidio a una concentración de 1µg/ml (Sigma) durante una hora, se observó el gel en un transiluminador (Bio-Rad) de luz ultravioleta (302nm) y se sacó una foto, se destiñó 15 minutos y se tiñó otros 30 minutos y fue tomada una segunda foto.

Se analizaron los resultados con el software Gel Compar II (Versión 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), que nos ofrece la posibilidad de agrupar las cepas en un dendrograma utilizando el coeficiente de Dice y el procedimiento de agrupación UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages. Sneath et al., 1973)

2.6. Prueba de resistencia a antibióticos. Se utilizó el método de referencia establecido por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, Wikler et al., 2007) mediante discos de difusión de cantidades conocidas de antibióticos. En el caso de *Aeromonas* spp., el antibiograma se llevó a cabo estudiando la susceptibilidad de las cepas a trece antimicrobianos cuyo nombre y concentración se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de la batería de antimicrobianos utilizados en el análisis de posibles resistencias de cepas de *Aeromonas*

Antimicrobiano	Abreviatura	Concentración (por disco en µg)
Ampicilina	AMP	10
Amoxicilina + Ácido clavulánico	AMC	30
Cefalotina	CEF	10
Ácido nalidíxico	NA	30
Tetraciclina	TE	30
Gentamicina	CN	10
Kanamicina	K	30
Compuestos sulfonamidas	S3	300
Estreptomicina	S	10
Ciprofloxacino	CIP	5
Cloranfenicol	C	30
Cefotaxima	CTX	30
Trimetoprima-sulfametoxazol	STX	25

Los antibióticos fueron suministrados por BioRad en formatos de 200 discos (4x50) por antibiótico.

Para llevar a cabo el antibiograma, se realizó una suspensión de cada una de las cepas en tubos con 5 ml de solución salina al 0,85% hasta conseguir una turbidez equivalente a 0,5 de Escala de McFarland. Con un hisopo impregnado en dicha solución se sembró en césped una placa Petri de 15 mm de diámetro con Agar Müller-Hinton (Oxoid). Sobre dicha siembra colocamos los discos de los antibióticos en condiciones de esterilidad, a una distancia que evitara que los halos de inhibición de crecimiento se solapasen y poder medirlos con exactitud. Se incubaron las placas a 30°C durante 18 horas y a continuación se midieron los halos producidos con la ayuda de un calibre (Comecta S.A.).

Para evaluar la posible resistencia o sensibilidad de cada cepa a cada antimicrobiano se utilizaron los límites establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* para enterobacterias, que se reproducen en la tabla 4.

Tabla 4. Criterios para evaluar el carácter de resistencia a antimicrobianos para enterobacterias establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Wikler et al., 2007).

Antimicrobiano	Resistente*	Intermedio*	
Sensible* Ampicilina	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicilina + Ácido clavulánico	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefalotina	≤ 14	15-17	≥ 18
Ácido nalidíxico	≤ 13	14-18	≥ 19
Tetraciclina	≤ 11	12-14	≥ 15
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamicina	≤ 13	14-17	≥ 18
Compuestos sulfonamidas	≤ 12	13-16	≥ 17
Estreptomicina	≤ 11	12-14	≥ 15
Ciprofloxacino	≤ 15	16-20	≥ 21
Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
Cefotaxima	≤ 14	15-22	≥ 23
Trimetoprima-sulfametoxazol	≤ 10	11-15	≥ 16

*Diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Identificación de las cepas aisladas. Adscripción a género y especie.

De las 408 muestras de alimentos analizadas, se aislaron 125 colonias con morfología típica de *Aeromonas* en el medio SAA (Oxoid). De cada una de las 65 muestras de casos clínicos analizados, se aisló una cepa con dicha morfología en el medio citado.

Todas ellas fueron confirmadas como pertenecientes al género *Aeromonas* siguiendo el esquema que se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Pruebas fisiológicas y bioquímicas diferenciales entre grupos taxonómicos relacionados con el género *Aeromonas*. (Adaptada de Palumbo et al., 2001)

Prueba	Grupo Taxonómico					
	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	
Oxidasa	+	+	+	+	-	
Fermentación de la glucosa	+	+	+	-	+	
Sensibilidad a O129 (10µg/150µ)	S/S	R/R	S/S	No aplicable	No aplicable	
Crecimiento en TCBS ¹	+	-	-	-	-	
Crecimiento en cloruro sódico	0%	-	+	+	No aplicable	+
	3%	-	+	+/-	No aplicable	-
	6%	+	-	+	No aplicable	-
Ácido de inositol	-	-	+	No aplicable	No aplicable	

TCBS¹ = Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar

Mientras que la adscripción a género de las cepas de *Aeromonas* es relativamente fácil, empleando el esquema señalado en la tabla 4, la identificación a nivel de especie es más dificultosa por la existencia de un número elevado de taxones, la continua incorporación de nuevas especies y en la falta de claridad en cuanto a los datos fenotípicos de referencia para poder distinguir unos grupos de otros (Janda et al., 2010) Como primera aproximación para la adscripción a especie de las cepas de *Aeromonas* empleamos el sistema miniaturizado API 20E. Con este sistema 99 de las 125 cepas procedentes de alimentos fueron adscritas a alguna de las especies de este género que incluye la correspondiente base de datos (BioMérieux, apiwebTM). Por el contrario, las

otras 26 daban perfiles inaceptables con el género *Aeromonas*, pero todas ellas tenían perfiles bioquímicos que se corresponden con dicho género cuando se realizaron las pruebas de identificación de manera independiente, es decir, a escala macroscópica. Ante las limitaciones del sistema API 20E para adscribir de una manera general nuestras cepas a una especie nos vamos a basar en las características que se describen a continuación.

Tabla 6. Características bioquímicas que permiten adscribir las cepas a una especie concreta de *Aeromonas* (González Rodríguez et al., 2002).

Prueba	Especie				
	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.veronii-sobria</i>	<i>A.schubertii</i>
Glucosa	+	+	+	+	+
Gas Glucosa	+	-	+	+	-
Sacarosa	+	+	+	+	+
Salicina	+	V*	-	V*	-
Esculina	+	+	-	-	-

(V* resultados variables)

Las pruebas bioquímicas empleadas para la identificación se eligieron en función de estudios previos (Abbott et al., 2003; González Rodríguez et al., 2002), ya que se demuestra, por ejemplo, que todas las especies de *Aeromonas* son capaces de fermentar el manitol y no el inositol. Sin embargo, también ha sido descrita la posibilidad de que aparezcan reacciones atípicas, como por ejemplo en la sensibilidad al agente O129 en el estudio de Abbott et al., en el año 2003, donde se indicó que dos cepas de *A.eucrenophila* y una de *A.veronii* subgrupo *veronii* sufrieron inhibición del crecimiento en presencia de dicho agente.

Empleando el esquema indicado en la tabla 6, se realizó la adscripción a especie de las 125 cepas aisladas de alimentos y de las 65 procedentes de casos clínicos, tal y como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Adscripción a especie de cepas de *Aeromonas* procedentes de carnes, productos cárnicos y casos de gastroenteritis humanas.

ESPECIE	Origen	
	Muestras de Alimentos	Muestras Clínicas
<i>A.hydrophila</i>	118	56
<i>A.caviae</i>	3	4
<i>A.veronii-sobria</i>	4	5
Número total cepas	125	65

3.2. Incidencia de *Aeromonas* spp. en carnes y productos cárnicos.

De un total de 408 muestras procedentes de carnes y productos cárnicos, se aislaron 81 muestras (19,85%) sospechosas de contener *Aeromonas* en el medio SAA (Oxoid). De dichas muestras se consiguieron aislar 125 presuntas cepas. Todas ellas presentaron el siguiente perfil fenotípico: tinción de Gram -, oxidasa y catalasa +, resistencia al agente O129, fermentación del manitol pero no del inositol, hidrólisis de esculina +. Además, todas estas cepas menos 10 presentaban al menos uno de los genes asociados a patogenicidad investigados.

En la Tabla 8 se presenta la distribución de las cepas de *Aeromonas* en función del producto alimenticio del que fueron aisladas y del periodo del año en que se tomaron las muestras. Las cepas de *Aeromonas* identificadas fueron contaminantes del 19,85% de las muestras, siendo las pechugas de pollo (46,91%) y los lomos de cerdo (48,15%) los principales productos portadores. La incidencia de *Aeromonas* spp. fue superior en las carnes frescas que en los productos listos para el consumo, esto puede explicarse ya que los productos listos para el consumo durante su procesado han sufrido una serie de procesos que disminuyen la carga microbiana, por ejemplo en el caso del chorizo que sufre un proceso de curación o en el del jamón cocido que se somete a tratamiento térmico. Sin embargo, también debemos tener en cuenta que las carnes frescas al ser cocinadas alcanzarán temperaturas que inactivarán a esas bacterias (Condón et al., 1992), por lo que cabe destacar que puede tener mayor importancia la existencia de una carga pequeña de *Aeromonas* spp. en un producto listo para el consumo que en carne fresca que es de suponer que va a ser cocinada.

En nuestros resultados las cuatro cepas que fueron aisladas de productos cárnicos listos para el consumo presentaron el perfil bioquímico indicado anteriormente, pero tres de ellas no poseen genes de virulencia estudiados y sólo una de esas tres se identificó adecuadamente con el sistema API 20E.

Tabla 8. Cepas de *Aeromonas* spp. aisladas en diferentes muestras de carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo

Producto (n=n° muestras)	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
Jamón cocido (n=48)	0	0	0	0
Pechuga cocida de pavo (n=48)	1 (1*)	1 (1*)	0	0
Mortadela (n=48)	1 (1*)	0	0	0
Chorizo (n=48)	1 (1*)	0	0	0
Salchichón (n=48)	0	0	0	0
Pechuga de pollo (n=84)	23 (6*)	10 (6*)	7 (4*)	22 (22*)
Lomo fresco de cerdo (n=84)	13 (7*)	8 (6*)	14 (5*)	24 (21*)

* Número de muestras de las que proceden los aislados

Ante estos resultados la dificultad radica en intentar proponer un origen coherente de dichas cepas. La principal fuente de contaminación sugerida sería el agua, ya que es un microorganismo fundamentalmente de origen acuático pero existen ciertos estudios que determinan que la distribución de *Aeromonas* spp. entre el agua de bebida, el pollo y la carne picada es diferente, sugiriendo que la contaminación de la carne no procede del agua (Hänninen et al., 1995). Podemos tener en cuenta otras fuentes de contaminación como puede ser el cuchillo de degüello, la piel del animal, el tracto gastrointestinal, las manos de los manipuladores, nódulos linfáticos del animal, manejo de las cámaras de almacenamiento y como más importante los recipientes contenedores no estériles que sirven de almacén de las piezas de carne (Jay et al. 2005).

Los porcentajes de aislamiento de cepas de *Aeromonas* en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo son variables, oscilando entre un 33 y un 74% (Sierra M., 1992). Hudson et al., en el año 1992, indicó que un 23,2% de las muestras de productos “*ready to eat*” estaban contaminados con *Aeromonas* spp. (Hudson et al., 1991).

En 1993, Gobat et al., estudió la distribución de *Aeromonas* spp. mesófilas en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo, y aisló *Aeromonas* en el

38,2% y 12,9% de las muestras de jamón cocido y mortadela, respectivamente. Dentro de las cepas aisladas, un 61,2% se adscriben a la especie *Aeromonas hydrophila*, 22,5% a *A. caviae* y 16,3% a *A. sobria* (Gobat et al., 1993).

Por otra parte, otros autores en el año 2001, aislaron *Aeromonas* spp. en un 70% de las muestras de carne frescas de cerdo y carne procedente de pollo (Neyts et al., 2001).

Los resultados mostrados en la Tabla 8 sugieren una mayor incidencia de *Aeromonas* en invierno y en otoño. Mientras que la incidencia fue similar en primavera y verano. Los datos proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional (datos del observatorio de la Virgen del Camino, León) mostraron una importante diferencia de temperatura entre las estaciones de primavera y verano, por lo que, es previsible que las condiciones de control de temperatura durante el procesado, el almacenamiento y la comercialización de los productos, minimicen la influencia de la variabilidad climatológica.

Varios estudios han demostrado que el aislamiento de cepas de *Aeromonas* procedentes de muestras fecales aumenta en los meses más cálidos del año, en concreto en verano (Parker et al., 2010). Este aumento es debido a que las *Aeromonas* mesófilas crecen de manera óptima cuando el agua se encuentra a elevadas temperaturas, lo cual provoca que aumente la concentración de dichos microorganismos tanto en ambientes de agua dulce como en los suministros de agua potable (Janda et al., 2010).

La adscripción a especie de las muestras de alimentos mostró que todas las cepas aisladas de productos cárnicos listos para el consumo fueron adscritos a la especie *A. hydrophila*, salvo la procedente de chorizo que lo fue a *A. caviae*.

De las 121 cepas aisladas de carnes frescas, 115 fueron adscritas a *A. hydrophila* (51,31 % pollo, 48,69 % cerdo), 2 a *A. caviae* (50 % pollo, 50 % cerdo) y 4 a *A. veronii-sobria* (50 % pollo, 50 % cerdo).

Las cuatro cepas adscritas a *A. veronii-sobria* fueron aisladas dos en invierno, una en verano y una en primavera. Las cepas *A. caviae* dos en invierno (chorizo y pollo) y una en otoño (cerdo).

3.3. Potencialidad patogénica de *Aeromonas*. Frecuencia de genes asociados a virulencia.

La frecuencia de genes asociados a virulencia en las cepas aisladas de productos cárnicos listos para el consumo es nula en los genes *hlyA*, *alt*, *ast* y *laf*. En lo que respecta al gen *aerA*, está presente en una de las cepas aisladas de pechuga de pavo. En la tabla 9 se presenta la distribución de genes de virulencia en las cepas de *Aeromonas* aisladas de carnes frescas y de casos clínicos de gastroenteritis humanas.

Tabla 9. Distribución de genes de virulencia en *Aeromonas* procedentes de carnes frescas y de casos de gastroenteritis humanas.

Origen	Especie	Nº cepas	Gen de virulencia (%*)				
			<i>aerA</i>	<i>hlyA</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	<i>laf</i>
Pechuga de pollo	<i>A.hydrophila</i>	59	89,83	84,74	89,83	23,73	13,56
	<i>A.caviae</i>	1	100	100	0	0	0
	<i>A.veronii-sobria</i>	2	100	100	100	0	0
Lomo de cerdo	<i>A.hydrophila</i>	56	78,57	83,92	89,28	30,36	7,14
	<i>A.caviae</i>	1	0	0	100	0	0
	<i>A.veronii-sobria</i>	2	100	100	0	0	0
Pacientes con gastroenteritis	<i>A.hydrophila</i>	56	23,21	12,50	80,35	3,57	7,14
	<i>A.caviae</i>	4	0	0	100	0	0
	<i>A.veronii-sobria</i>	5	0	20	100	0	40

(* Porcentaje de cepas que poseen el gen de virulencia)

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran las frecuencias de presentación de las combinaciones de genes de virulencia halladas en las cepas de *Aeromonas* procedentes de carnes frescas de pechuga de pollo y lomo de cerdo, así como en las cepas procedentes de casos clínicos de gastroenteritis humanas, respectivamente.

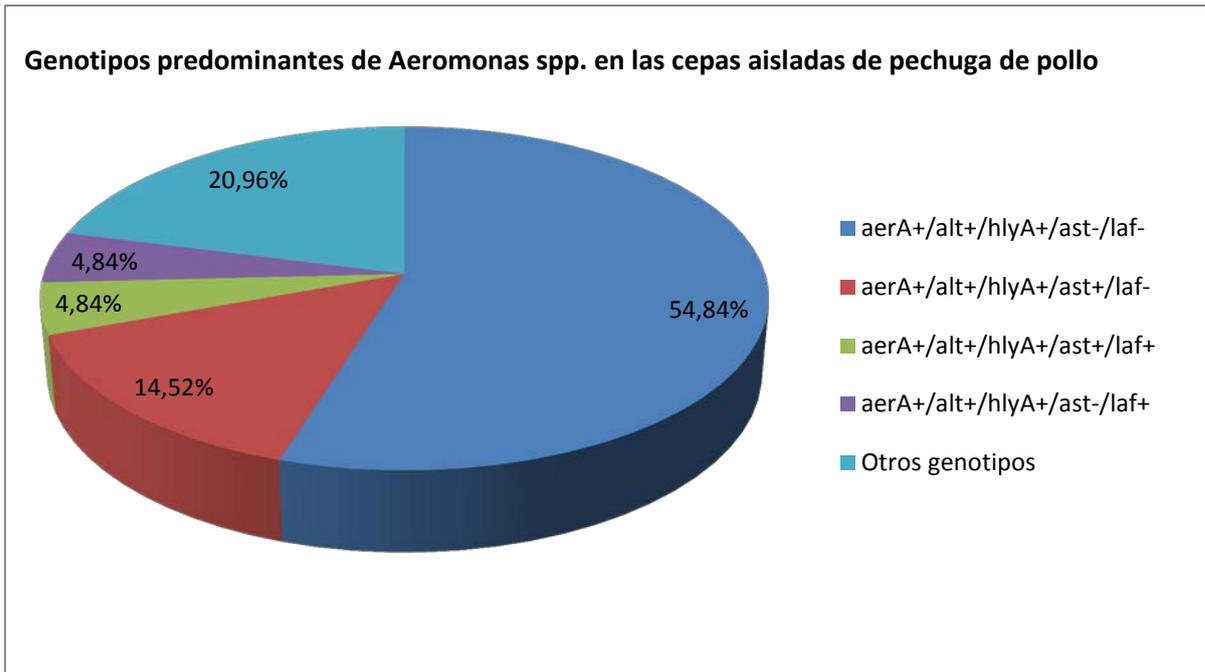


Figura 1. Distribución de genotipos (combinaciones de genes marcadores de virulencia) en cepas de *Aeromonas* aisladas de pechugas (frescas) de pollo.

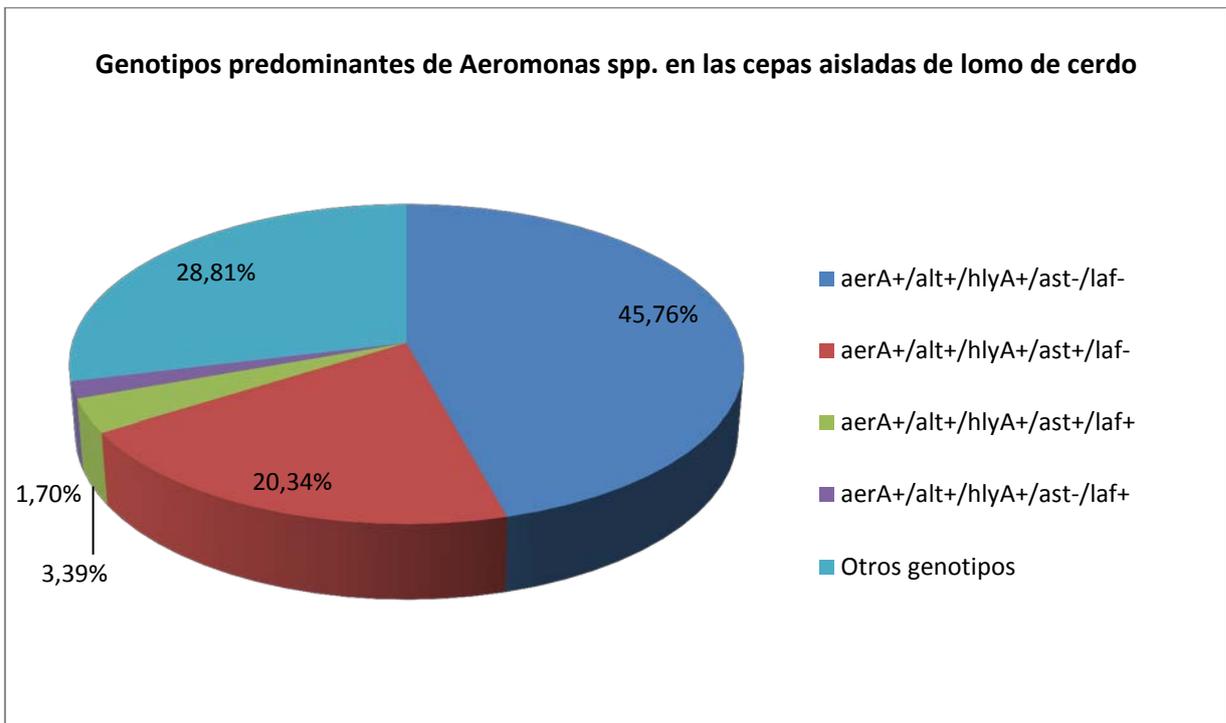


Figura 2. Distribución de genotipos (combinaciones de genes marcadores de virulencia) en cepas de *Aeromonas* aisladas de lomo (fresco) de cerdo.

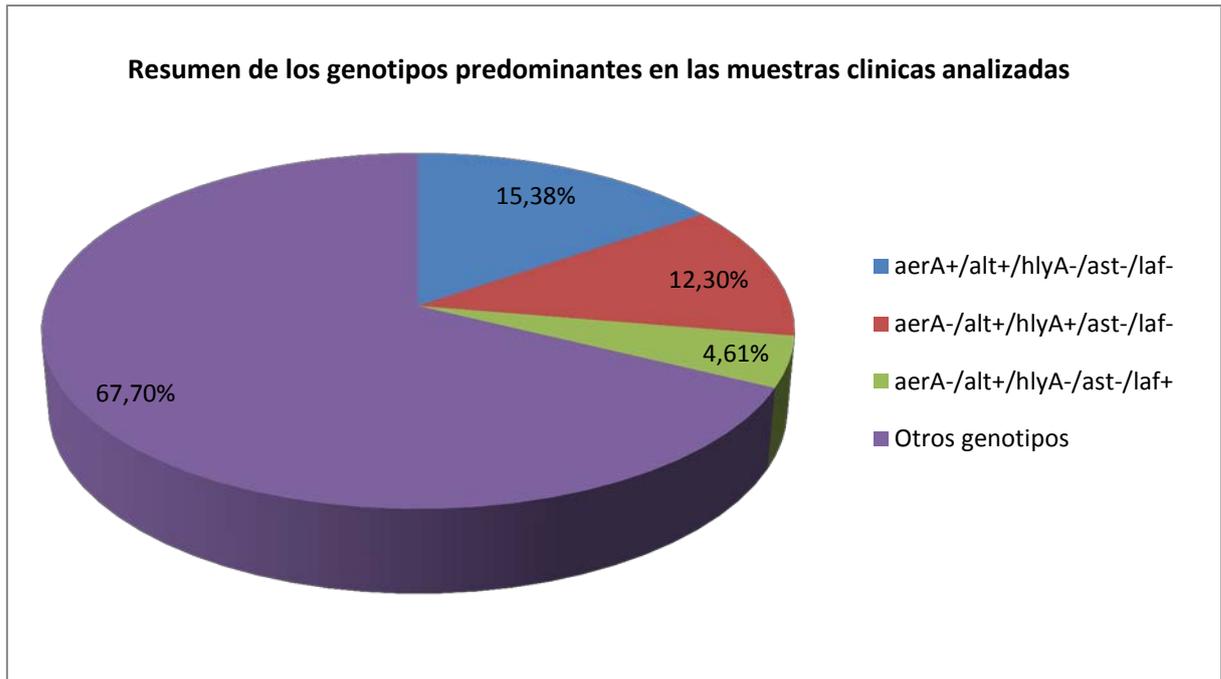


Figura 3. Distribución de genotipos (combinaciones de genes marcadores de virulencia) en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con gastroenteritis diagnosticadas en el Hospital de León.

En las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de carnes frescas y productos cárnicos, el perfil de virulencia *aerA+/alt+/hlyA+/ast-/laf-* fue predominante (61 cepas), la combinación *aerA+/alt+/hlyA+/ast+/laf-* fue detectada en otras 21 cepas, cuatro cepas portaban el genotipo *aerA+/alt+/hlyA+/ast-/laf+*, cinco cepas poseían todos los genes y el resto de cepas fueron portadoras de uno, dos o tres de los genes de virulencia buscados proporcionando otros genotipos.

Por el contrario, en las cepas clínicas los perfiles de virulencia fueron más heterogéneos (figura 3), así fueron mayoritarios los que se asociaban al gen *alt*, que estaba presente en 54 de los 65 aislados (83,08%). De todos ellos, los más frecuentes fueron los perfiles que muestran la combinación *aerA+/hlyA-/alt+/ast-/laf-* (15,38%), seguido de *aerA-/hlyA+/alt+/ast-/laf-* (12,30%), y sólo una cepa muestra la presencia del genotipo *aerA+/hlyA-/alt+/ast+/laf+*, una el genotipo *aerA-/hlyA-/alt+/ast+/laf+* y una *aerA-/hlyA+/alt+/ast-/laf+*.

En principio, cabría esperar que la posesión de un mayor número de factores de virulencia se asociara a un mayor poder patógeno de las cepas (Isonhood et al., 2002).

Adicionalmente, los perfiles de virulencia *aerA*+/*hlyA*+ y en algunos casos, el *aerA*+/*hlyA*- son indicadores del potencial de desarrollo de diarreas en humanos. Además, la combinación de ambos genes es menos común en *A.caviae* y en *A.veronii-sobria* que en *A.hydrophila* (Heuzenroeder et al., 1999).

En función, pues de su arsenal patogénico, cabría pensar que la presencia de estas cepas de *Aeromonas* en las carnes frescas podría constituir un riesgo sanitario, no tanto por su presencia en el producto cocinado (por la termolabilidad antes reseñada de estas bacterias) cuanto por la posibilidad de diseminación a productos alimenticios que no van a ser calentados antes del consumo durante las fases de preparación culinaria.

Sin embargo, las cepas clínicas mostraron un potencial de factores de virulencia mucho menor que las cepas de alimentos (Figuras 1, 2 y 3). En otros estudios se ha hallado que cepas de *Aeromonas* involucradas en casos clínicos no presentaron ninguno de los genes de virulencia (Pablos et al., 2010), lo que sugiere que el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad de *Aeromonas* es susceptible de ser ampliado.

Varios estudios llevados a cabo en Europa, los Estados Unidos, y India, la especie *A. caviae* fue prevalente, seguido por *A. hydrophila* y *A. veronii* biovar *sobria* (Borchardt et al., 2003). Otros estudios en Brasil, Tailandia y la India (Kannan et al., 2001) informó de *A.hydrophila* como predominante. Estas diferencias pueden depender de la ubicación geográfica, el método de aislamiento y de identificación utilizados (Pablos et al., 2010)

3.4. Resistencia a antibióticos de las cepas aisladas de *Aeromonas* spp.

En la tabla 10 se presenta a frecuencia de resistencia a los distintos antimicrobianos de las cepas de *Aeromonas* en función de su origen (alimenticio o clínico).

Tabla 10. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de *Aeromonas* procedentes de alimentos, agua y casos clínicos.

Antimicrobiano	Alimentos y agua			Casos clínicos		
	R*	I*	S*	R*	I*	S*
Ampicilina	100	0	0	44,57	55,43	0
Amoxicilina + Ácido clavulánico	0	13,19	86,80	0	1,50	98,50**
Cefalotina	95,14	0,70	4,17	7,23	3,61	89,16
Ácido nalidíxico	20,14	0	79,86	6,02	0	93,98
Tetraciclina	21,53	6,25	72,22	10,84	0	89,16
Gentamicina	0,70	0	99,30	0	0	100**
Kanamicina	3,47	0,70	95,83	0	33,85	66,15**
Compuestos sulfonamidas	27,08	0	72,92	93,85	0	6,15**
Estreptomina	6,25	31,25	62,50	4,82	48,19	46,99
Ciprofloxacino	2,08	13,19	84,73	0	1,20	98,80
Cloranfenicol	15,28	0	84,72	0	0	100
Cefotaxima	1,39	13,89	79,86	0	4,61	95,38**
Trimetoprima-sulfametoxazol	15,97	0	84,03	0	0	100**

*Porcentaje de cepas R=Resistente, I=Intermedia y S=Sensible.

** investigadas un el 80% de las cepas de origen clínico.

Por lo que respecta a combinaciones de resistencia a múltiples antimicrobianos cabe destacar un grupo de 16 cepas que presentan un elevado número de resistencias. Estas cepas proceden en su totalidad de alimentos, 11 de pechugas de pollo y 5 de lomo de cerdo, pero no se observan diferencias significativas en la época del año en la que fueron tomadas las muestras.

Los perfiles correspondientes a estas 16 cepas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Perfiles de multiresistencia a antimicrobianos en *Aeromonas* aisladas de carnes frescas

Perfil	Perfiles de Antibióticos													Nº Cepas
	AMP	S	CEF	NA	CTX	TE	AMC	SXT	CN	CIP	K	C	S3	
1	R	I	R	R	I	R	S	R	S	I	S	R	R	11
2	R	R	R	R	I	R	S	R	S	R	S	R	R	2
3	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	1
4	R	I	R	R	I	R	I	R	S	I	S	R	R	2

*(R=Resistente, I=resistencia intermedia, S=Sensible)

Dentro del perfil 1 se engloban 11 cepas de las cuales 6 fueron aisladas de pechuga de pollo y 5 de lomo de cerdo, todas ellas poseen un perfil fenotípico que permite adscribirlas a la especie *A. hydrophila*, salvo la cepa A70 (aislada de lomo de cerdo) que se corresponde con *A. veronii-sobria*. Cinco de estas cepas poseen un perfil genético idéntico *aerA+/alt+/hlyA+/ast-/laf-*, incluida la cepa A70. El resto ofrece perfiles variables dentro de los cuales cabe destacar el de la cepa A33 que no posee ninguno de los genes asociados a virulencia y la cepa A45 que posee los cinco genes analizados (*aerA+/alt+/hlyA+/ast+/laf+*).

Los perfiles 2 y 4 se corresponden con las cepas A13-A14 y A76-A79 respectivamente, todas ellas aisladas de muestras de pechuga de pollo. Sus perfiles fenotípica y genotípicamente son idénticos. Su fenotipo nos permite incluirlas en la especie *A. hydrophila* y su perfil genético *aerA+/alt+/hlyA+/ast-/laf-* es el más prevalente en las muestras analizadas (48,80%).

El perfil 3 se corresponde con la cepa A75 aislada de una muestra de pechuga de pollo, que posee un perfil fenotípico que se corresponde con *Aeromonas hydrophila* y su perfil genético es *aerA-/alt-/hlyA+/ast-/laf+*, el cual no se considera dentro de los perfiles más prevalentes según los datos obtenidos en el total de las cepas.

En cuanto a las cepas clínicas, podemos decir que el perfil de resistencia a antimicrobianos obtenido es muy diferente al de las cepas procedentes de alimentos, ya que el perfil más comúnmente encontrado sólo presenta resistencia a ampicilina y sulfonamidas (tabla 10). Las cepas que presentan una resistencia a más antimicrobianos son las cepas H52, H59 y H60 resistentes a ampicilina, estreptomina, tetraciclina y sulfonamidas, así como una resistencia intermedia a kanamicina. El perfil bioquímico de las mismas es idéntico y se corresponde con *Aeromonas hydrophila* mientras que en lo que respecta al perfil de virulencia H52 posee únicamente el gen *alt* y las cepas H59 y H60 no poseen ningún gen asociado a la patogenicidad.

El perfil mayoritario de resistencia antibióticos registrado en las cepas clínicas conforma un grupo que no se corresponde con ninguna otra cepa de origen alimenticio. También podemos destacar que ocurre algo similar en cuanto a los factores de virulencia, ya que los grupos de *Aeromonas* de origen alimenticio presentan un mayor número de genes que codifican para factores de virulencia por regla general que las cepas clínicas.

Por último, cabe destacar que en las cepas de otros orígenes (agua, carne de conejo y pescado) incluidas en la tesis nos muestran una serie de perfiles de resistencia

a antimicrobianos que pueden considerarse intermedios entre los de las cepas de carne y las cepas clínicas.

Según lo establecido en 1998 por Janda M.J. y Abbott S.L. la mayoría de las *Aeromonas* móviles son resistentes a penicilina, ampicilina (la excepción es que más de un 30% de *A.caviae* son susceptibles), carbenicilina y ticarcilina, y susceptibles a cefalosporinas de segunda y tercera generación, aminoglicósidos, carbapenems, cloranfenicol, tetraciclinas, trimetoprima-sulfametoxazol y quinolonas.

Desde el año 1998 no han tenido lugar cambios reseñables en el estudio de los mecanismos de resistencia a antibióticos del género *Aeromonas*, y los pocos estudios que han tenido lugar se han centrado primordialmente en las especies del mismo que desembocan en patologías humanas, lo cual no clarifica si las conclusiones de los mismos pueden permitir extrapolar los resultados a todas las especies existentes (Janda & Abbott, 2010).

Los estudios que se han sucedido a través de los años reflejan una inmensa variabilidad de perfiles de resistencia a una batería de antibióticos incluso dentro de la misma especie, lo cual nos conduce a pensar que no podemos establecer unas conclusiones generales válidas para cualquier cepa de *Aeromonas* spp. Esta variabilidad se establece en función de la taxonomía de las fenoespecies, el método de aislamiento, el origen de las cepas, causas geográficas y/o las presiones ambientales de selección (Janda & Abbott, 2010).

El sistema de referencia usado ha sido el establecido por el “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (Winkler et al., 2007), aunque es muy probable que en el mismo no se hayan considerado las cepas de origen no clínico. Es interesante destacar que el uso de otros sistemas de referencia no ofrece cambios significativos en los resultados finales (Kämpfer et al., 1999). La única excepción puede estar en la interpretación de susceptibilidades ante antifolatos (trimetoprima, sulfonamidas y sus combinaciones) y otras combinaciones como amoxicilina-clavulánico (Zhiyong et al., 2002).

Un estudio llevado a cabo por Chaudhury et al., en 1996 pone de manifiesto el potencial de patogenicidad y creciente incidencia de la multirresistencia en clínica y aislamientos ambientales de *Aeromonas*. El creciente uso de antibióticos en la población

humana, la cría de animales y piscicultura han proporcionado una presión de selección intensa para los genes que codifican resistencia a los antimicrobianos en el suelo y acuático microorganismos. Además, se llevó a cabo un experimento de transferencia de material genético que concluye con la posibilidad de que los genes que codifican para estas resistencias no solo se encuentren en el ADN cromosómico sino en plásmidos que pueden ser transferidos; su tamaño oscila entre 85,6 y 150 kilobases (Kb) (Chaudhury et al., 1996).

En todo caso, considerando la sustancial diferencia en los perfiles de resistencia a antimicrobianos de las cepas clínicas y las cepas procedentes de alimentos, la multiresistencia asociada a estos últimos no parece tener gran trascendencia sanitaria.

3.5. Evaluación de la similitud genética entre las cepas aisladas de los productos alimenticios sobre los que se realiza el estudio y las aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos, así como las cepas aisladas procedentes de otros orígenes (agua, pescado y carne procedente de conejo).

La técnica utilizada para llevar a cabo dicha comparación es la electroforesis en campo pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) que ha sido utilizado para diversos estudios a lo largo de los años sobre la estructura genómica y el tamaño del genoma de bacterias, así como para la comparación de los diversos patrones de cepas individuales pertenecientes a la misma o distinta especie con fines epidemiológicos (Hänninen et al., 1997).

Hänninen & Hirvelä-Koski en 1997 y tras varios estudios previos eligieron la enzima *XbaI* como la más adecuada para esta técnica sobre cepas de *Aeromonas* spp., ya que ofrece patrones de entre 15 y 30 bandas fácilmente discriminables.

Los resultados obtenidos tras la digestión del ADN genómico fueron analizados con el Software Gel Compar II (Versión 6.5.; Applied Maths) lo cual nos permitió crear un dendrograma en el cual se muestra la agrupación de las cepas analizadas en función de la similitud de patrones de bandas.

De las 226 cepas sometidas al PFGE se obtuvieron 159 patrones de bandas (pulsotipos) diferentes. Así, obtenemos 34 grupos destacables, señalados con números romanos (figura 1), con un porcentaje de similitud del 90%. De estos grupos, 18 poseen al menos dos o más cepas de pulsotipo idéntico. La mayor parte de ellos están conformados por cepas con el mismo origen, e incluso como ocurre en los grupos XVII, XXI y XXV se incluyen aislados de la misma muestra por lo que estamos ante las mismas cepas. Cabe destacar que las cepas clínicas se incluyen en grupos totalmente diferenciados con respecto a las cepas de origen alimenticio, salvo ciertas excepciones que se describen a continuación.

- Grupo XI conformado por una cepa de *A.caviae* procedente de pechuga de pollo, una cepa de *A.hydrophila* aislada de lomo de cerdo y una cepa de *A.hydrophila* obtenida de carne de conejo, que poseen un porcentaje de similitud del 90,5% y se diferencian en 4 bandas. Las dos primeras son idénticas en pulsotipo y en cuanto a genes que codifican para factores de virulencia con el siguiente perfil *aerA+/hlyA+/alt-/ast-/laf-*, y la cepa procedente de carne de conejo tiene también el gen *Alt* y un porcentaje de similitud del 90,5%. Además, es interesante destacar que las tres cepas poseen un perfil idéntico de resistencia a antibióticos siendo resistentes a ampicilina y cefalotina.
- Grupo XV está compuesto por dos cepas clínicas aisladas en el periodo de octubre 2005 a enero 2007 no identificadas a nivel de especie, una de ellas tiene perfil genotípico *aerA-/hlyA+/alt+/ast-/laf-* y la otra no posee ninguno de ellos y una procedente de una muestra de agua, de la cual conocemos su perfil genotípico *aerA+/hlyA-/alt+/ast-/laf+* y su perfil bioquímico que nos permite adscribirla a *A.caviae*. El pulsotipo de las muestras clínicas es idéntico y posee 18 bandas a diferencia del obtenido con la cepa de origen acuático que posee 20. En cuanto al perfil de resistencia a antibióticos tenemos que las cepas clínicas son resistentes a ampicilina, ácido nalidíxico y tetraciclina, mientras que la cepa procedente de agua únicamente es resistente a ampicilina y cefalotina.
- Grupo XIX con una cepa de *A.hydrophila* procedente de una muestra de pechuga de pollo que posee un perfil genotípico *aerA+/hlyA+/alt+/ast+/laf-* y una cepa clínica aislada en un periodo de tiempo anterior que únicamente

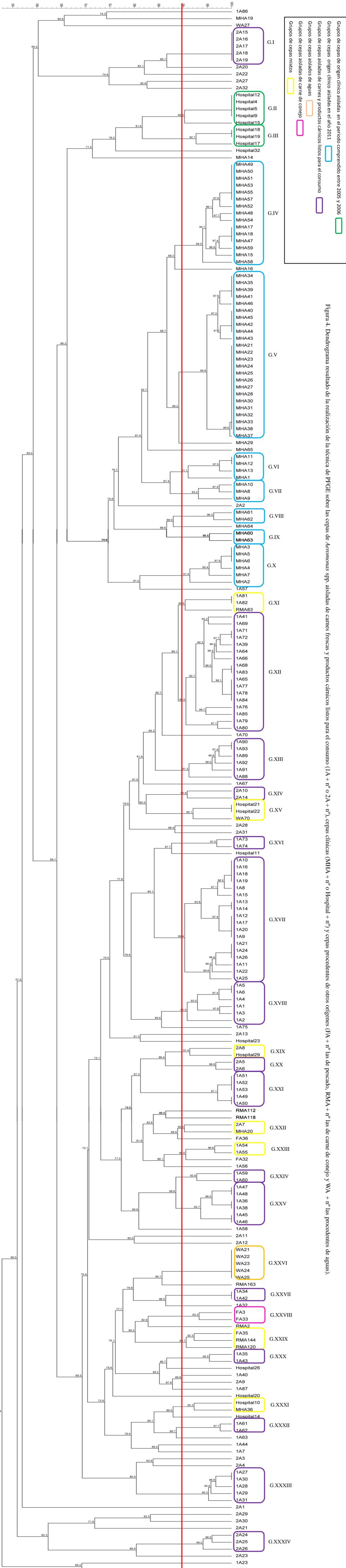


Figura 4. Dendrograma resultante de la realización de la técnica de PFGE sobre las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo (1A + n° o 2A + n°), cepas clínicas (MHA + n° o Hospital + n°) y cepas procedentes de otros orígenes (FA + n° las de pescado, RMA + n° las de carne de conejo y WA + n° las procedentes de aguas).

posee los genes *hlyA* y *alt*. Los pulsotipos obtenidos nos muestran una similitud del 91,4% diferenciándose únicamente en dos bandas. Ambas son resistentes a la ampicilina pero la cepa de origen alimentario lo es también a cefalotina.

- Grupo XXII con una cepa de *A. hydrophila* aislada de una muestra de lomo de cerdo con un perfil genético *aerA+/hlyA+/alt+/ast+/laf-* y una cepa clínica identificada como *A. sobria*, cuyo genotipo es el siguiente *aerA-/hlyA+/alt+/ast-/laf-*. Los pulsotipos se diferencian en una única banda (similitud del 90,3%). Sus perfiles de resistencia a antibióticos no poseen coincidencias.
- Grupo XXIII con dos cepas de *A. hydrophila* procedentes de muestras de lomo de cerdo, una de ellas sin genes asociados a factores de virulencia y la otra con un perfil *aerA+/hlyA+/alt+/ast-/laf-* y una cepa de *A. hydrophila* aislada de congrio de la cual no tenemos más datos. Los pulsotipos obtenidos por las dos primeras con 15 bandas y un porcentaje de similitud entre ellas del 95,4% y la cepa aislada de congrio tiene un pulsotipo conformado por 12 bandas con una similitud con respecto a las anteriores del 90,4%. El perfil de resistencia a antibióticos de las tres difiere en la presencia de una resistencia intermedia a estreptomicina presentada por las cepas de origen cárnico mientras que la cepa procedente de pescado es sensible a la misma.
- Grupo XXIX con dos cepas aisladas de muestras de carne de conejo adscritas a las especies *A. caviae* (*aerA-/hlyA+/alt+/ast-/laf-*) y *A. sobria* (*aerA-/hlyA-/alt+/ast-/laf-*) y una cepa de *A. caviae* aislada de congrio sin datos relativos a su perfil de virulencia. Los pulsotipos obtenidos de las dos cepas de *A. caviae* se diferencian en una banda y nos ofrecen un porcentaje de similitud del 92,2%, mientras que la cepa de *A. sobria* con respecto a las anteriores posee un porcentaje de similitud del 90,7%. Las tres cepas comparten su resistencia a la ampicilina y cefalotina siendo la cepa *A. caviae* de origen cárnico además resistente al ácido nalidíxico.
- Grupo XXXI compuesto por una cepa clínica de *A. hydrophila* aislada en el año 2011, que sólo posee el gen *alt* y otra cepa clínica aislada en el año en el periodo de octubre 2005 a enero 2007, con un genotipo *aerA-/hlyA+/alt+/ast+/laf-*. Sus pulsotipos nos ofrecen un porcentaje de similitud

del 92,3%. Sus únicas coincidencias en cuanto a su resistencia a antibióticos son en cuanto a la resistencia a la ampicilina y su resistencia intermedia a estreptomicina.

Las conclusiones que se pueden extraer de estos grupos es que los perfiles de bandas no agrupan las cepas que poseen características fenotípicas y/o genotípicas similares, ya que existe una gran variabilidad entre los perfiles bioquímicos de las mismas así como de la presencia de factores de virulencia.

Las cepas clínicas pueden ser colonizadores gastrointestinales transitorios y sólo unas pocas de ellas ser cepas diarrogénicas (Borchardt et al., 2003), lo cual permite explicar la variabilidad en cuanto a la patogenicidad de las mismas, y no será resuelto hasta que no se estudien más a fondo los mecanismos que les confieren la misma.

Un estudio de Korkoca et al., publicado en 2013 informa de que se encuentra en estudio el hecho de que la presencia de varias enzimas en cepas de *Aeromonas* tales como lipasas, proteasas, β -Lactamasas, amilasas y nucleasas, contribuyen significativamente a su distribución en la naturaleza y sus adaptaciones a los cambios ambientales.

4. CONCLUSIONES.

La prevalencia de *Aeromonas* en productos cárnicos listos para el consumo, cuando se encuentran en los puntos de venta es baja (menos del 2,1% en jamón cocido y salchichón, menos del 4,2% en mortadela y chorizo y menos del 6,3% en pechuga de pavo), mientras que las carnes frescas de pollo y de cerdo están habitualmente contaminadas con *Aeromonas* (prevalencia superior al 95%).

El potencial patogénico de las cepas de *Aeromonas* aisladas de carnes frescas de pollo y de cerdo es elevado pues se asocian mayoritariamente a la especie *A. hydrophila* y poseen múltiples genes de los principales factores de virulencia. Adicionalmente, una proporción importante de las mismas es resistente a antibióticos como cefalotina, ácido nalidíxico, sulfonamidas y mezclas de sulfametoxazol y trimetoprima.

Sin embargo, la importancia sanitaria de estos hallazgos debe considerarse escasa pues las cepas aisladas de carnes frescas de pollo y de cerdo son tanto en lo que se refiere a sus perfiles de virulencia y de resistencia a antibióticos como por su perfil de bandas tras análisis electroforético después de la restricción de su material genético (PFGE) muy diferentes de las que se aíslan en los pacientes cuyos cuadros gastroentéricos son investigados en los hospitales.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott, S. L., Cheung, W. K., & Janda, J. M. (2003). The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2348-2357.
2. Altwegg, M., Martinetti Lucchini, G., Lüthy-Hottenstein, J., & Rohrbach, M. (1991). *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 10(1), 44-45.
3. Atkinson, H., Adams, D., Savvas, R., & Trust, T. (1987). *Aeromonas* adhesin antigens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 43(4), 372-374.
4. Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The American Journal of the Medical Sciences, 188(2), 282.
5. Beveridge, T. J., Pouwels, P. H., Sára, M., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Kari, K., & Schocher, I. (1997). V. functions of S-layers1. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(12), 99-149.
6. BioMérieux. (2013). Programa ApiwebTM (disponible en <https://apiweb.biomerieux.com/servlet>, último acceso en mayo de 2013).
7. Borchardt, M. A., Stemper, M. E., & Standridge, J. H. (2003). *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. *Emerging Infectious Diseases*, 9(2), 224-228.
8. Burke, V., Robinson, J., Gracey, M., Peterson, D., & Partridge, K. (1984). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: Seasonal correlation with clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2), 361-366.
9. Carnahan, A., Behram, S., & Joseph, S. (1991). Aerokey II: A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(12), 2843-2849.
10. Carnahan, A., Chakraborty, T., Fanning, G., Verma, D., Ali, A., Janda, J., & Joseph, S. (1991). *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(6), 1206-1210.
11. Carnahan, A., & Joseph, S. W. (2005). Aeromonadales ord. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 556-587.
12. Caselitz, F. (1996). How the *Aeromonas* story started in medical microbiology. *Medical Microbiology Letters*, 5(1), 46-54.
13. Chakraborty, T., Montenegro, M., Sanyal, S., Helmuth, R., Bulling, E., & Timmis, K. (1984). Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infection and Immunity*, 46(2), 435-441.
14. Chaudhury, A., Nath, G., Shukla, B., & Sanyal, S. (1996). Biochemical characterisation, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 44(6), 434-437.
15. Chopra, A. K., Houston, C. W., Peterson, J. W., & Jin, G. (1993). Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(5), 513-523.

16. Condón, S., García, M. L., Otero, A., & Sala, F. (2008). Effect of culture age, pre-incubation at low temperature and pH on the thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Microbiology*, 72(4), 322-326.
17. Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A., Beretta, M., & Peduzzi, R. (2000). Epidemiological relationships between *Aeromonas* strains isolated from symptomatic children and household environments as determined by ribotyping. *European Journal of Epidemiology*, 16(5), 447-453.
18. Dooley, J., & Trust, T. J. (1988). Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: Identification of a surface array protein. *Journal of Bacteriology*, 170(2), 499-506.
19. Escarpulli, G. C., Arreola, M. A., Rodríguez, C. H., Garibay, R. A., Martínez, A. C., Valdespino, A. P., Ozores, G. A. (2003). La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquímica*, 28(4), 11-18.
20. Euzéby, J.P. (2013). "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" (disponible en <http://www.bacterio.cict.fr/a/Aeromonas.html>, ultimo acceso en mayo de 2013)
21. Galindo, C., Chopra, A., Doyle, M., & Beuch, L. (2007). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. Doyle, M.P. & Beuchat, L.R. (Eds.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3ª Ed. ASM Press, Washington, DC. 381-392.
22. Gavín Marín, R. (2003). Caracterización genética y fenotípica del flagelo de *Aeromonas*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona (Barcelona).
23. Gavín, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J. G., & Tomás, J. M. (2003). Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 224(1), 77-83.
24. Gill, C., & Jones, T. (1995). The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants. *Food Microbiology*, 12, 135-141.
25. Gobat, P.-F., Jemmi, T. (1993). Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready-to-eat fish and meat products in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 20 (2), pp. 117-120.
26. Granum, P. E., O'Sullivan, K., Tomás, J. M., & Ørmen, Ø. (2006). Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 21(2), 131-137.
27. Handfield, M., Simard, P., Couillard, M., & Letarte, R. (1996). *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: Hemagglutination, hemolysis, and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29). *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3459-3461.
28. Hänninen, M., Salmi, S., Mattila, L., Taipalinen, R., & Siitonen, A. (1995). Association of *Aeromonas* spp. with travellers' diarrhoea in Finland. *Journal of Medical Microbiology*, 42(1), 26-31.
29. Hänninen, M., & Siitonen, A. (1995). Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiology and Infection*, 115(1), 39-50.
30. Haque, Q. M., Sugiyama, A., Iwade, Y., Midorikawa, Y., & Yamauchi, T. (1996). Diarrheal and environmental isolates of *Aeromonas* spp. produce a toxin similar to shiga-like toxin 1. *Current Microbiology*, 32(5), 239-245.
31. Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology*. Academic Pr. London.

32. Hernández-Pezzi, G., Torres, A., & Ordóñez, P. & Cevallos, C. (2005). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 1993-2002 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*, 12(26), 289-291.
33. Herrera, F., Santos, J., Otero, A., & García-López, M. (2006). Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), 527-536.
34. Heuzenroeder, M. W., Wong, C. Y., & Flower, R. L. (2006). Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: Correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiology Letters*, 174(1), 131-136.
35. Hokama, A., Honma, Y., & Nakasone, N. (1990). Pili of an *Aeromonas hydrophila* strain as a possible colonization factor. *Microbiology and Immunology*, 34(11), 901-915.
36. Hudson J.A., Mott S.J., De Lacy K.M., Eldridge A.L. (1991). Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile *Aeromonas* and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. *Int. J. Food Microbiol.* 16 (1991), 99–108.
37. Isonhood, J. H., & Drake, M. (2002). *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*, 65(3), 575-582.
38. Janda, J. M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(4), 397-410.
39. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases*, 27(2), 332-344.
40. Janda, J. M., Abbott, S. L., Khashe, S., Kellogg, G. H., & Shimada, T. (1996). Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(8), 1930-1933.
41. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35-73.
42. Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (1996). *Modern Food Microbiology (5th Ed.)*. Springer, London.
43. Kämpfer, P., Christmann, C., Swings, J., & Huys, G. (1999). In vitro susceptibilities of *Aeromonas* genomic species to 69 antimicrobial agents. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(4), 662-669.
44. Kannan S., Chattopadhyay U.K., Pal D., Shimada T., Takeda Y., Bhattacharya S.K., Ananthanarayanan P.H. (2001). Isolation and identification of *Aeromonas* from patients with acute diarrhoea in Kolkata, India. *Indian J Med Microbiol* 19(4), 190–192.
45. Kirov, S. M., Ardestani, E. K., & Hayward, L. J. (1993). The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 20(3), 159-168.
46. Kirov, S. M., & Brodribb, F. (1993). Exotoxin production by *Aeromonas* spp. in foods. *Letters in Applied Microbiology*, 17(5), 208-211.

47. Kirov, S. M., Tassell, B. C., Semmler, A. B., O'Donovan, L. A., Rabaan, A. A., & Shaw, J. G. (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *Journal of Bacteriology*, 184(2), 547-555.
48. Kirov, S. M. (2003). Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 224(2), 151-159.
49. Kokka, R. P., Vedros, N. A., & Janda, J. M. (1990). Electrophoretic analysis of the surface components of autoagglutinating surface array protein-positive and surface array protein-negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(10), 2240-2247.
50. Krovacek, K., Faris, A., & Månsson, I. (1991). Growth of and toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 13(2), 165-175.
51. Leclère, V., Béchet, M., & Blondeau, R. (2004). Functional significance of a periplasmic manganese superoxide dismutase from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 828-833.
52. Leung, K., & Stevenson, R. (1988). Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of General Microbiology*, 134(1), 151-160.
53. Liu, D. (2011). *Molecular detection of human bacterial pathogens*. CRC Press. Boca Raton, Florida (USA).
54. Longa, A., Vizcaya, L., Nieves, B., Bravo, L., Morier, L., Pérez-Schael, I., & Cabrera, L. E. (2005). Factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de niños con diarrea en mérida, venezuela. *Revista Cubana De Medicina Tropical*, 57(2), 85-91.
55. Mateos, D., Anguita, J., Naharro, G., & Paniagua, C. (1993). Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Microbiology*, 74(2), 111-118.
56. McIntosh, D., & Austin, B. (1991). Atypical characteristics of the salmonid pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Journal of General Microbiology*, 137(6), 1341-1343.
57. Merino, S., Camprubí, S., & Tomás, J. M. (1991). The role of lipopolysaccharide in complement-killing of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O: 34. *Journal of General Microbiology*, 137(7), 1583-1590.
58. Morandi, A., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., & Graf, J. (2005). Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6561-6564.
59. Naharro, G., Rubio, P., & Luengo, J. M. (2011). *Aeromonas*. Liu, D. (Eds.) *Molecular detection of human bacterial pathogens* (pp. 789) CRC Press. Boca Raton, Florida (USA).
60. Namdari, H., & Bottone, E. (1991). *Aeromonas caviae*: Ecologic adaptation in the intestinal tract of infants coupled to adherence and enterotoxin production as factors in enteropathogenicity. *Experientia.Basel*, 47(5), 434-436.
61. Namdari, H., & Bottone, E. J. (1990). Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(5), 837-840.
62. Neves, M. S., Nunes, M. P., & Milhomem, A. M. (1994). *Aeromonas* species exhibit aggregative adherence to HEp-2 cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4), 1130-1131.

63. Neyts, K., Huys, G., Uyttendaele, M., Swings, J. and Debevere, J. (2001) Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Lett Appl Microbiol* 31, 359–363.
64. Nhung, P. H., Ohkusu, K., Miyasaka, J., Sun, X. S., & Ezaki, T. (2007). Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(3), 271-275.
65. Pablos, M., Remacha, M., Rodríguez-Calleja, J., Santos, J., Otero, A., & García-López, M. (2010). Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29(9), 1163-1172.
66. Pablos, M., Rodríguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. (2009). Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 158-164.
67. Pablos, M., Huys, G., Cnockaert, M., Rodríguez-Calleja, J. M., Otero, A., Santos, J. A., & García-López, M. L. (2011). Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 203-210.
68. Pablos, M., Rodríguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. (2009). Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 158-164.
69. Palumbo, S., Abeyta, C., Stelma, G., Wesley, I. W., Wei, C., Koberger, J. A., Murano, E. A. (2001). *Aeromonas*, *Arcobacter* and *Plesiomonas*. In F. P. Downes, & K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4^a ed., pp. 283) American Public Health Association. Washington, D.C. (USA).
70. Parker, J. L., & Shaw, J. G. (2011). *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, 62(2), 109-118.
71. Quinn, D. M., Atkinson, H. M., Bretag, A. H., Tester, M., Trust, T. J., Wong, C., & Flower, R. (1994). Carbohydrate-reactive, pore-forming outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 62(9), 4054-4058.
72. Reeves, P. R., Hobbs, M., Valvano, M. A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Raetz, C. R. (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology*, 4(12), 495-503.
73. Rodríguez-Calleja, J. M., García-Lopez, I., García-Lopez, M., Santos, J. A., & Otero, A. (2006). Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1106-1112.
74. Sakazaki, R., & Shimada, T. (1984). O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 37(5-6), 247.
75. Sepe, A., Barbieri, P., Peduzzi, R., & Demarta, A. (2008). Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Letters in Applied Microbiology*, 46(4), 439-444.

76. Shimada, T., Sakazaki, R., & Suzuki, K. (1985). Peritrichous flagella in mesophilic strains of *Aeromonas*. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, 38(3), 141-145.
77. Sierra, M. (1992). Flora microbiana superficial de canales de ovino recién obtenidas: microorganismos patógenos, alterantes e indicadores. Tesis Doctoral. Universidad de León (León).
78. Sierra, J. C., Suarez, G., Sha, J., Foltz, S. M., Popov, V. L., Galindo, C. L., Chopra, A. K. (2007). Biological characterization of a new type III secretion system effector from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* —Part II. *Microbial Pathogenesis*, 43(4), 147-160.
79. Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. Freeman, London, UK.
80. Snowden, L., Wernbacher, L., Stenzel, D., Tucker, J., McKay, D., O'Brien, M., & Katouli, M. (2006). Prevalence of environmental *Aeromonas* in south east Queensland, Australia: A study of their interactions with human monolayer Caco-2 cells. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 964-975.
81. Stintzi, A., & Raymond, K. N. (2000). Amonabactin-mediated iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Aeromonas hydrophila*: Direct measurement of individual microscopic rate constants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(1), 57-66.
82. Trust, T., Howard, P., Chamberlain, J., Ishiguro, E., & Buckley, J. (1980). Additional surface protein in autoaggregating strains of atypical *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), 35-38.
83. Umelo, E., & Trust, T. J. (1997). Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from *Aeromonas salmonicida* A449. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5292-5299.
84. Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Hecht, D. W., Swenson, J. M. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement 27(1), 1-177.
85. Wong, C. Y., Heuzenroeder, M. W., & Flower, R. L. (1998). Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology*, 144(2), 291-298.
86. Yadav, A., & Verma, S. (1998). Occurrence of enterotoxigenic *Aeromonas* in poultry eggs and meat. *Journal of Food Science and Technology*, 35(2), 169-170.
87. Yanez, M., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M., & Martínez-Murcia, A. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on gyrB gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 875-883.
88. Yu, H., Zhang, Y., Lau, Y., Yao, F., Vilches, S., Merino, S., Leung, K. (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4469-4477.
89. Zhang, Y., Arakawa, E., & Leung, K. (2002). Novel *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 genes involved in O-antigen and capsule biosynthesis. *Infection and Immunity*, 70(5), 2326-2335.
90. Zhiyong, Z., Xiaojun, L., & Yanyu, G. (2002). *Aeromonas hydrophila* infection: Clinical aspects and therapeutic options. *Reviews in Medical Microbiology*, 13(4), 151-162.

Capítulo III. Incidencia de *Campylobacter* en carnes frescas y productos cárnicos y comparación genética con cepas de origen clínico

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. *Campylobacter* como agente de gastroenteritis.

La campilobacteriosis constituye una de las infecciones alimentarias con mayor incidencia entre la población en los países industrializados. Según el Informe sobre tendencias y fuentes de zoonosis y agentes zoonóticos en la Unión Europea publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria en 2010, es el patógeno con mayor incidencia entre los causantes de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos (EFSA, 2012). El número de casos notificados de infección por *Campylobacter* en la Unión Europea en los años 2009 y 2010 ascendió a 198682 y 212064, respectivamente, de los cuales en España tuvieron lugar 5106 y 6340 (EFSA, 2012). La mayor parte de los casos confirmados de campilobacteriosis tuvieron lugar en los meses de verano, de junio a septiembre (EFSA, 2012). En el año 2010, los datos epidemiológicos indican que aproximadamente el 35,7% de las campilobacteriosis están causadas por *C.jejuni*, seguido de *C.coli* con un 2,3%. Otras especies de *Campylobacter spp.* supusieron un 10,2% de los casos, mientras que en el 51,8% no se llegó a identificar la especie implicada (EFSA, 2012).

La epidemiología de la infección por *Campylobacter spp.* es compleja ya que el microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente y se considera parte de la flora intestinal normal de un gran número de animales tanto domésticos como silvestres (Alonso et al., 2011).

Las aves son un importante reservorio de *Campylobacter spp.*, y la carne procedente de ellas presenta generalmente unos niveles de contaminación elevados, de manera habitual superiores al 80% (EFSA, 2009b; EFSA, 2010a). Varios factores ayudan a explicar la alta prevalencia de esta bacteria en los animales vivos: el particular método de sacrificio de las aves, con etapas como el escaldado y el desplumado que contribuyen a la diseminación de la contaminación, y las condiciones de almacenamiento junto con la naturaleza de la piel de las mismas que facilita la supervivencia de *Campylobacter spp.* (El-Shibiny et al., 2009). La carne de pollo ha sido considerada como el vehículo alimentario principal en la campilobacteriosis siendo muy similares los datos de prevalencia en *broilers*, en carnes de pollo frescas y en casos clínicos (Atekruse et al., 1998). En el 2010, la carne de pollo estuvo implicada en un 29,6% de los casos notificados en la UE, pero esta prevalencia variaba con

los países entre un 3,1% y 90% (EFSA, 2012). En España fueron: 44,6% en matadero, 74,7% durante el procesado y 25,4% en los emplazamientos de venta al por menor (EFSA, 2012). Por otra parte, la prevalencia en productos cárnicos de origen porcino es mucho menor, siendo del 0,6% durante los años 2009 y 2010 (EFSA, 2012).

Sin embargo, en lo que respecta a productos cárnicos listos para el consumo de origen porcino, los informes evaluados por la EFSA no recogen datos. Si bien, en los procedentes de carne de pollo y carne de pavo las prevalencias recogidas por Alemania e Irlanda fueron de 1,8% y 0,7%, respectivamente, en el año 2010 (EFSA, 2012).

1.2. Características y taxonomía del género *Campylobacter* spp.

Pertenece a la familia *Campylobacteriaceae*, la cual, a su vez incluye los géneros *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Dehalospirillum* y *Sulfurospirillum* (Euzéby et al., 2013). La primera descripción de una bacteria adscrita probablemente al género *Campylobacter* se atribuye a Theodore Escherich quien al final del siglo XIX describió en heces de bebés con diarrea un microorganismo espiriláceo, no cultivable, al que denominó *Vibrio felinus*, por su parecido morfológico con otros aislamientos de vibrios (Lior et al., 1994). A comienzos del siglo XX, el microorganismo se conoció como *Vibrio fetus* (*C.fetus* en la actualidad) siendo responsable de aborto espontáneo en bovinos y ovejas. Sin embargo, este organismo difiere de las especies de *Vibrio* ya que no puede crecer bajo condiciones atmosféricas de oxígeno ni fermentar azúcares. Fue así como en 1963, Sebald y Veron propusieron el nombre *Campylobacter* con la finalidad de diferenciarlo de *Vibrio* spp (Catteau et al., 1995).

Aunque las primeras especies de este género se identificaron hace más de 90 años en animales, no fue hasta 1970 cuando finalmente se reconoció como patógeno humano (Koneman et al., 1997). Si bien la clasificación de estas bacterias está en continua revisión y modificación, actualmente se consideran 31 especies dentro del género *Campylobacter*, además de diferentes subespecies y biovariedades (Euzéby et al., 2013).

Las especies asociadas con enfermedad gastrointestinal más importantes para humanos son *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus* y *C. upsaliensis*. Todos ellos son microorganismos Gram-negativos, termófilos, no sacarolíticos y microaerófilos (requiriendo una concentración de oxígeno de 5 a 7% y de 5 a 10% de dióxido de carbono para su crecimiento, Van Vliet et al., 2001), aunque algunas especies se han encontrado que pueden crecer en condiciones anaeróbicas o aeróbicas (Everest et al., 2002). Son capaces de

colonizar la mucosa intestinal de animales homeotermos de sangre caliente, incluyendo los animales de abasto y el hombre (Nachamkin et al., 2008).

De estas especies, *C.jejuni* es responsable del 80-85% de todas las infecciones humanas debidas a este género, en tanto que *C.coli* es la segunda especie más aislada (10 a 15%) (Lastovica et al., 2001). Estas especies fisiológicamente solo se diferencian por microbiología convencional mediante la prueba de hidrólisis del hipurato, en la que *C.jejuni* da una reacción positiva. Sin embargo, también podemos encontrar cepas de *C. jejuni* hipurato-negativas, por lo que esta prueba no es concluyente para la detección de la especie de *Campylobacter* de mayor importancia sanitaria y es necesario utilizar otras estrategias para lograr una identificación más exacta (On et al., 2003).

Observados al microscopio, estas bacterias presentan un morfología característica relacionada con una movilidad de tipo sacacorchos debido a que poseen un flagelo polar en uno o ambos extremos de la célula (Nachamkin et al., 2008). Por la presencia de estos flagelos las células son altamente móviles, sin embargo, *C. gracilis* es inmóvil, mientras que *C. showae* que posee múltiples flagelos (Nachamkin et al., 2008).

En *C.jejuni* se han descrito dos morfologías: una forma espiral cultivable y otra forma cocoide no cultivable. Algunos estudios han demostrado que la transición de la forma espiral a cocoide depende de muchos factores, tales como la cepa, la temperatura, el pH, la osmolaridad y el medio de cultivo (Lázaro et al., 1999). Aunque también, con más de 48 h de incubación o tras una prolongada exposición al aire adoptan una forma cocoide (Koneman et al., 1997). Se ha señalado que diversos tipos de estrés, como el estrés osmótico y el debido cambios de temperatura, se asocian a su capacidad de cambiar su forma de espiral a cocoide (Rollins et al., 1986). Por otra parte, existen estudios que no indican una correlación entre ambas formas morfológicas y la capacidad de crecimiento en los medios de cultivo de las mismas (Alonso et al., 2011).

Campylobacter spp posee un rango estrecho de temperatura de crecimiento, de 37 a 42°C y no es capaz de desarrollarse por debajo de los 30°C (Lee et al., 1998), sin embargo, se ha encontrado que posee actividad fisiológica a 4°C (Hazeleger et al., 1998). La temperatura óptima para *C.jejuni* y *C.coli* es de 42°C, lo cual probablemente refleja una adaptación al intestino de animales de sangre caliente (Van Vliet et al., 2001). A pesar de su carácter termófilo, se ha determinado que la muerte celular ocurre a 56-57°C (Nguyen et al., 2006).

Así mismo, se ha establecido que el rango de pH óptimo para el desarrollo de este microorganismo es de 6,5 a 7,5, sin embargo, puede crecer en un rango de 4,9 a 9. Blaser et al., (1980) indicaron que *C.jejuni* era incapaz de desarrollarse a un pH inferior a 4,9.

Con respecto a su metabolismo, las especies del género *Campylobacter* no son capaces de fermentar ni oxidar carbohidratos. En su lugar, obtienen su energía de la degradación de aminoácidos o intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (Vandamme et al., 2000).

Con respecto a su arsenal genético, gracias a la secuenciación total de su genoma en el año 2000 se estableció que *C.jejuni* tiene un genoma relativamente pequeño (1.6 a 2 megabases) rico en adenina-timina, la relación guanina-citosina es de 30% (Parkhill et al., 2000; Vandamme 2000). Con ello, también se determinó que este microorganismo posee una extensa variación genética, la cual ha surgido de la alta frecuencia de modificaciones intragenómicas así como del intercambio entre cepas. *C.jejuni* es naturalmente competente, es decir que puede tomar DNA del medio ambiente, lo que unido a la recombinación entre cepas permite la generación de una gran diversidad genética. La transferencia horizontal de DNA cromosomal y plasmídico ocurre tanto *in vitro* como durante la colonización del pollo, lo cual indica que la transformación natural podría jugar un papel importante en la constitución del genoma y en la transmisión de nuevos factores, tales como la resistencia a antibióticos aun en ausencia de presión selectiva (Boer et al., 2002; Wilson et al., 2003; Avrain et al., 2004).

La mayoría de *Campylobacter* spp. son sensibles a condiciones ambientales que hacen inviable su supervivencia durante mucho tiempo fuera del hospedador. No es fácil que el microorganismo se multiplique en los alimentos o en el medio exterior, por varias razones:

- Son destruidas por los pH ácidos y por la desecación.
- Al ser microaerófilas, su multiplicación por regla general es inactivada por la tensión de oxígeno en el aire.
- Su desarrollo a temperaturas inferiores a 30°C es pequeño, e incluso nulo. Por lo que *Campylobacter* spp. no puede crecer en los alimentos a las temperaturas habituales de almacenamiento (Beutling et al., 1998). En consecuencia, se considera que los alimentos actúan como vectores de transmisión de *Campylobacter* no habiendo multiplicación en ellos

del microorganismo (Altekruse et al., 1994), siendo entonces la contaminación cruzada la mayor causa de campilobacteriosis (Allerberger et al., 2003). La congelación ha demostrado ser un buen sistema de control de *Campylobacter* spp. No obstante, es un hecho demostrado que algunas cepas pueden sobrevivir durante meses, por lo que el frío puede también en ocasiones contribuir a la difusión del microorganismo (Rollins et al., 1986).

- Las especies del género *Campylobacter* son también sensibles a la mayoría de los desinfectantes conocidos (Nachamkin et al., 1997).

- Aunque no está totalmente explicado, se ha descrito que *Campylobacter* puede presentarse en una forma viable aunque no cultivable ante condiciones adversas, lo cual le permite vivir en circunstancias en las que según sus requerimientos no viviría. Varios estudios indican que no existe una correlación clara entre el estado morfológico y la capacidad de ser cultivados (Alonso et al., 2011).

1.3. Cuadro clínico producido por el género *Campylobacter*.

El término campilobacteriosis se refiere a un grupo de infecciones causadas por bacterias del género *Campylobacter* que afectan tanto a humanos como a animales, constituyendo una zoonosis de distribución mundial.

Las especies del género *Campylobacter* son sensibles a un pH bajo y, por ello, las condiciones del tracto gastrointestinal deberían ser suficientes para eliminar a la mayoría de *C.jejuni* que lo atraviesan. Ello hace necesario la ingestión de alrededor de un millón de células para producir la enfermedad en el 50% de las personas (Allos et al., 2001). Sin embargo, se ha señalado que dosis inferiores a 1.000 células de *C.jejuni* son capaces de iniciar la enfermedad (Robinson et al., 1981). La distribución por edad y sexo de las infecciones por *Campylobacter* spp. es única entre los patógenos entéricos humanos. En las naciones industrializadas se han detectado dos grupos de edad en los que es más frecuente: niños de <1 año de edad y adultos de 15-44 años de edad (Allos et al., 2001). En un estudio sobre la evaluación del riesgo de campilobacteriosis humana asociada al consumo de carne de aves, se ha determinado que las personas de 18-29 años son las más propensas a la adquisición de la enfermedad. Existe una evidencia cada vez mayor de que la inmunidad adquirida como consecuencia de exposiciones sucesivas a *Campylobacter* spp., puede

ejercer un importante papel en la protección frente a la enfermedad (Cawthraw et al., 2000). La tasa de incidencia varía según la estación del año o la región. Por otra parte, la presentación clínica de pacientes con campilobacteriosis difiere entre países en vías de desarrollo y los industrializados (Ketley et al., 1997; Rosenquist et al., 2003).

La enfermedad generalmente comienza con fiebre asociada a malestar sistémico con dolor de cabeza. Estos síntomas a veces preceden a la aparición de síntomas abdominales y vómitos. Los calambres abdominales y los demás síntomas se asemejan a los de una apendicitis aguda (Altekruse et al., 1999; Catteau, 1995). Los síntomas generalmente se resuelven en una semana, aunque la excreción del microorganismo dura en promedio 16 días. Los bebés excretan los microorganismos durante más tiempo que los niños más mayores (14 días en bebés contra 8 días en niños de 1 a 5 años) (Taylor et al., 1988).

Las características clínicas de la gastroenteritis por *Campylobacter* no permiten la diferenciación de otras causas de gastroenteritis y por lo tanto la confirmación en el laboratorio es de suma importancia.

Los pacientes con campilobacteriosis generalmente se recuperan sin necesidad de terapia antimicrobiana, y no suelen precisar hospitalización. Sin embargo, el tratamiento se indica en algunos pacientes con enfermedad prolongada con fiebre, diarrea sanguinolenta, así como en pacientes inmunodeprimidos o cuya sintomatología se mantiene o empeora más de una semana (Allos et al., 2001). En estos casos, la eritromicina o ciprofloxacino son los tratamientos de elección, seguidos de tetraciclina y doxiciclina y cloranfenicol como antibióticos alternativos (Ge et al., 2003). La aparición de resistencias a los tratamientos antibióticos supone un gran problema para la población y está mediada principalmente por un uso abusivo e indiscriminado de los mismos en producción animal (Allos et al., 2001).

En la mayoría de los casos la enfermedad es autolimitante, sin embargo en ocasiones puede generar complicaciones graves, sobre todo neurológicas, tales como el Síndrome de Guillain-Barré y el Síndrome de Reiter.

Aunque generalmente no hay complicaciones posteriores, en un 15-20% de los casos se pueden producir recaídas y en un porcentaje mucho menor, algunas secuelas más graves (García-Peña et al., 2003), en particular, Síndrome de Guillain-Barré, Síndrome de Miller-Fisher y Artritis reactiva que puede evolucionar a Síndrome de Reiter.

- a) Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Es una neuropatía caracterizada por parálisis muscular flácida, sensación de ardor, dolor y debilidad muscular. Esta complicación ocurre en 1 de cada 1000 casos de campilobacteriosis (Nachamkin et al., 1998). Los hallazgos serológicos y los cultivos indican que del 30 al 40% de los pacientes con SGB tuvieron una infección por *C.jejuni* (Komagamine et al., 2006). Este síndrome es grave y posee una tasa de mortalidad de 2% (Briscoe et al., 1987).
- b) Síndrome de Miller-Fisher. Es una variante de SGB y se caracteriza por oftalmoplejía, ataxia y arreflexia, también se ha asociado con *C. jejuni* (Neisser et al., 1997).
- c) Artritis reactiva y Síndrome de Reiter. Es un proceso que se presenta en un 1 a 7% de los casos por infecciones con *Campylobacter*. Se trata de un proceso post-infeccioso que se manifiesta normalmente entre los 7 y 14 días después del comienzo de los síntomas. La duración de la artritis oscila desde varias semanas hasta un año y aunque puede llegar a ser incapacitante, el pronóstico suele ser bueno (García-Peña et al., 2003). Cuando la artritis reactiva forma parte de una triada de síntomas acompañándose de uretritis y conjuntivitis, el proceso se denomina Síndrome de Reiter (García-Peña et al., 2003).

1.4. Mecanismos de patogenicidad asociados al género *Campylobacter*.

A pesar del papel de *Campylobacter* spp. como responsable de infecciones humanas, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares por los que *C.jejuni* origina su actividad infecciosa (Wassenaar et al., 1999; Hofreuter et al., 2006). No obstante, los aislados de *C.jejuni* son diversos, tanto fenotípicamente como genéticamente, lo que condiciona sus características de virulencia. *C.jejuni* y *C.coli* colonizan y forman parte de la microbiota normal de muchos mamíferos y aves, lo que no está claro es cómo se produce la enfermedad en humanos.

Los principales factores de virulencia son:

- 1.4.1. Presencia de uno o dos flagelos polares cuyas estructuras han sido reconocidas como factores reseñables en la patogénesis. Las proteínas flagelares de *C.jejuni* muestran homología con proteínas asociadas a la virulencia de *Yersinia pestis* y *Salmonella enterica*. Estructuralmente, está compuesto de una flagelina mayor y una menor, FlaA y FlaB respectivamente, ambas codificadas por dos genes en

tándem (*flaA* y *flaB*), (Nuijten et al., 1990; Guerry et al., 1991; Guerry et al., 2007).

- 1.4.2. Quimiotaxis. Se asocia a un aumento de la frecuencia de los cambios de dirección que se producen durante el movimiento bacteriano en respuesta a señales extracelulares, y se regula por la rotación alterna del flagelo hacia la derecha e izquierda. La quimiotaxis permite a la bacteria moverse o nadar hacia entornos favorables (Young et al., 2007). En el caso de *C.jejuni*, las sustancias quimioatrayentes incluyen componentes de la mucina como la L-fucosa y L-serina, así como ciertos ácidos orgánicos (Hugdahl et al., 1988).
- 1.4.3. Invasión y adhesión. *Campylobacter* se adhiere al epitelio intestinal y se internaliza (Fauchere et al., 1986; Grant et al., 1993). La translocación de *C.jejuni* a través de la barrera epitelial refleja el mecanismo por el cual la bacteria obtiene acceso a la mucosa intestinal causándole daño, inflamación y por lo tanto gastroenteritis. Los factores de virulencia a través de los que *Campylobacter* se adhiere a la célula epitelial incluyen proteínas, el flagelo y el lipooligosacárido (LOS) (Grant et al., 1993). Aunque no se han detectado adhesinas asociadas a fimbrias, sus propiedades de adhesión a las células epiteliales humanas se han adscrito a otras estructuras de su superficie. Cuatro proteínas aisladas de la membrana externa de *C.jejuni* se adhieren a las células epiteliales HEP-2. Una de ellas (*cadF*) se une a la fibronectina, mientras la secuencia nucleotídica del gen responsable de su síntesis muestra homología con proteínas de la membrana externa de otras bacterias.
- 1.4.4. Lipooligosacárido (LOS) y cápsula, cuya función radica en la capacidad de evadir la respuesta inmune del huésped. Diversas estructuras de LOS son similares a los gangliósidos neuronales, conteniendo ácido siálico. Tal mimetismo molecular está detrás de la complicación autoinmune que conduce al Síndrome de Guillain-Barré (SGB) y al Síndrome de Miller-Fisher (Karlyshev et al., 2000; Hadden et al., 2001; Schwerer et al., 2002).
- 1.4.5. Toxinas. *C.jejuni* produce una toxina de mayor importancia llamada toxina citoletal distensora (CDT), la cual, también es producida por un diverso grupo de otras especies bacterianas incluyendo *E. coli*, *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans, *Haemophilus ducreyi* y *Helicobacter hepaticus* (Whitehouse et al., 1998; Lara-Tejero et al., 2000; Hassane et al., 2001).

1.4.6. Plásmido pVir. Fue encontrado en 17% de los aislados clínicos de *C.jejuni* analizados en el estudio llevado a cabo por Tracz et al., (2005), y está íntimamente relacionado con la presencia de sangre en las heces de dichos pacientes. Sin embargo, esta teoría es cuestionada en otros estudios como los realizados por Schmidt-Ott et al., en 2005 y Louwen et al., en 2006.

1.5. Algunas alternativas genéticas para la adscripción a especie de cepas de *Campylobacter*.

Ante la dificultad para poder adscribir a especie las cepas de *Campylobacter* mediante pruebas bioquímicas (On et al., 2003), se han tratado de desarrollar alternativas genéticas.

Para la adscripción al género se han propuesto dos marcadores de virulencia característicos de *Campylobacter*, (i) el gen que codifica para la flagelina mayor que conforma el flagelo (FlaA, Nachamkin et al., 1993) y (ii) el gen que codifica para una proteína de membrana (CadF, Konkel et al., 1999) implicada en los procesos de invasión y adhesión celular.

Por otro lado, la adscripción a especie de las cepas de *Campylobacter* se ha sugerido el empleo de otros marcadores genéticos:

- El gen *mapA*, que codifica para una proteína de membrana de *Campylobacter jejuni*, ya que el uso de sueros anti-MapA en cepas de *Campylobacter coli* no mostró reacciones (Stucki et al., 1995).
- El gen *hipO*, que codifica para la enzima responsable de la hidrólisis del hipurato, específica de las cepas pertenecientes a la especie *Campylobacter jejuni* (Persson et al., 2005).
- El gen *asp* que codifica para la enzima asparto quinasa característica de las cepas de *Campylobacter coli* (Linton et al., 1997; Persson et al., 2005).

1.6. Objetivos.

Dentro del objetivo general tendente a aportar datos significativos que permitan una evaluación cuantitativa del riesgo para la salud asociado a la ingesta de bacterias patógenas del género *Campylobacter* con los productos alimenticios de origen cárnico, los objetivos concretos del trabajo presentado en este capítulo fueron:

- Establecer la prevalencia de *Campylobacter* en los productos alimenticios de origen cárnico en el momento de su comercialización en los centros de venta en la ciudad de León.
- Evaluar la importancia sanitaria de las cepas presuntamente patógenas aisladas de carnes y productos cárnicos mediante la estimación de su similitud genética con las cepas aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.
- Determinar la distribución de la capacidad de resistencia a antimicrobianos entre las cepas de *Campylobacter* presuntamente patógenas presentes en las carnes y productos cárnicos listos para el consumo y entre las cepas de la misma especie involucradas en casos de gastroenteritis.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Toma de muestras.

2.1.1. Muestras de alimentos. Se analizaron 336 muestras procedentes de diversos productos cárnicos (carnes frescas de diversas especies, productos listos para el consumo) que fueron adquiridos en varios supermercados de la ciudad de León cuyos productos tenían un origen (suministrador) diferente. Se llevaron a cabo muestreos regulares (toma de muestras semanal) en dos periodos de tiempo; uno durante la campaña 2008-2009 y otro durante la campaña 2009-2010.

De manera adicional, se realizó un segundo muestreo durante los meses de octubre y noviembre del año 2011, en el que se analizaron 36 muestras de la misma manera que en el caso anterior a excepción de que únicamente se realizó sobre pechuga de pollo.

Estos muestreos han sido descritos en el capítulo de *Aeromonas*.

2.1.2. Muestras de pacientes del hospital de León. Se analizaron 60 muestras procedentes de pacientes con cuadros de gastroenteritis diagnosticados del hospital, que fueron suministradas en semanas sucesivas durante los meses de marzo a mayo de 2011 ambos inclusive. Las muestras se correspondían con hisopos procedentes de aislamientos realizados a partir de las heces de los pacientes.

2.2. Detección y aislamiento de *Campylobacter*.

2.2.1. Muestras de alimentos (ISO 10272-1:2006). A partir de 25 g del alimento, se realizaron homogeneizados en bolsa de Stomacher con 225 ml de Bolton Broth (Oxoid) suplementado con *Laked Horse Blood* (Oxoid), los cuales se incubaron en jarras de anaerobios de 3,5 o 7 litros de capacidad (Oxoid) en condiciones de microaerobiosis (CampyGen, Oxoid) durante 48 horas a 42°C. A continuación, a partir de dichos enriquecimientos se sembraron dos medios selectivos *Campylobacter Selective Blood Free Agar* (*Charcoal cefoperazone deoxycholate agar*, CCDA, Oxoid) y *Campylobacter Agar Base* (Karmali, Oxoid) y se repitieron las condiciones de incubación durante 48 horas. Tras ese periodo de tiempo, se observaron las colonias

existentes, considerando que *Campylobacter* spp. presenta colonias lisas, convexas, brillantes de 1-2 mm de diámetro y color gris-blanco.

2.2.2. Muestras de pacientes del Hospital de León. Se sembraron las muestras sospechosas de *Campylobacter* procedentes de los hisopos en CCDA (Oxoid) y se incubaron en microaerofilia de igual manera que en el caso de las muestras procedentes de los alimentos, durante 48 horas a 42°C. A continuación, se procedió a la identificación de las colonias sospechosas de *Campylobacter*.

2.3. Identificación fenotípica de las cepas aisladas como *Campylobacter*. De cada medio de cultivo se escogieron varias colonias típicas para su posterior identificación mediante pruebas morfológicas y bioquímicas (Harrigan, 1998). Las pruebas llevadas a cabo para la identificación de *Campylobacter* fueron:

- Tinción de Gram (realizada según se describe en el capítulo de *Aeromonas*). *Campylobacter* es Gram -, con una morfología característica, ya descrita en la introducción de este capítulo.
- Oxidasa y catalasa (realizadas según se indica en el capítulo de *Aeromonas*). *Campylobacter* spp. es oxidasa y catalasa positivo.

2.4. Búsqueda de los principales genes marcadores de virulencia asociados a *Campylobacter* spp. y adscripción a especie en base a pruebas genéticas.

En todas las cepas con morfología característica de *Campylobacter* aisladas de los medios CCDA y Karmali (Oxoid), se investigó la presencia de los genes marcadores de virulencia según se describe a continuación.

a) Extracción del ADN (realizada como se describe en el capítulo de *Aeromonas*).

b) Determinación de genes. Utilizando métodos basados en la técnica de PCR se investigó la presencia de genes que codifican para la flagelina, en concreto el gen *flaA* (Nachamkin et al., 1993). Asimismo y para tratar de conseguir una identificación más próxima a nivel de especie, se investigaron los genes *cadF* (Konkel et al., 1999),

mapA (Alonso et al., 2011), *hipO* (Persson et al., 2005) y *asp* (Linton et al. 1997; Persson et al., 2005).

Se llevó a cabo la reacción en volúmenes finales de 50 µl por muestra que contenían:

- 20 µl Master Mix (5PRIME, VWR International Eurolab S.L. Barcelona, España)
- 1 µl cebador 1 (a una concentración de 250 nM), (XX Integrated DNA Technologies Inc).
- 1 µl cebador 2 (a una concentración de 250 nM), (XX Integrated DNA Technologies Inc).
- 23 µl agua destilada miliQ.
- 5 µl de solución de ADN bacteriano.

Una vez preparada la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador (Mastercycler Eppendorf-Netheler-Hinz) para realizar la amplificación. Los cebadores, su temperatura de actuación y el tamaño del fragmento amplificado en cada caso se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en las PCR realizadas con cepas de *Campylobacter*.

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	Unión al cebador (°C)	Tamaño del amplificado (pb)	Referencias
<i>fla1</i> <i>fla2</i>	GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT G...TGC CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG	45°C	17000	Nachamkin et al., 1993
<i>cadF1</i> <i>cadF2</i>	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAAGTTGAAAC	45°C	400	Konkel et al., 1999
<i>mapA1</i> <i>mapA2</i>	CTATTTTATTTTGAGTGCTTGTG GCTTTATTTGCGATTTGTTTTATT	55°C	589	Stucki et al., 1995
<i>hipO1</i> <i>hipO2</i>	GAC TTC GTG CAG ATA TGG ATG CTT GCT ATA ACT ATC CGA AGA AGC CAT CA	57°C	735	Persson et al., 2005
<i>asp1</i> <i>asp2</i>	GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG	57°C	500	Persson et al., 2005 y Linton et al. 1997

Además de las muestras de ADN procedentes de cepas de *Campylobacter* aisladas de alimentos y de casos clínicos, se utilizaron tres controles:

- Control positivo. Utilizamos varias cepas de la colección CECT *Campylobacter* 7572 (*Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*), CECT 7571 *Campylobacter coli*, LMG 8848 *Campylobacter coli* y LMG 6440 *Campylobacter coli*.
- Control negativo. Se utilizó la cepa de colección CECT4315 de *Yersinia enterocolitica*.
- Blanco de reacción: Se sustituyó la muestra de ADN por agua destilada miliQ realizando el protocolo de la forma habitual.

La realización de la electroforesis y el registro de resultados se llevaron a cabo por el procedimiento ya descrito en el capítulo de *Aeromonas*.

2.5. Evaluación de la similitud genética entre las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de los productos alimenticios antes mencionados y de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.

Se llevó a cabo mediante dos técnicas, electroforesis en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) y Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP.

2.5.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis. El protocolo se encuentra descrito en la página de <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>, y se llevó a cabo con ciertas modificaciones que se describen a continuación:

Se partió de placas de TSA con un cultivo fresco de *Campylobacter* cuyas colonias se transfirieron mediante un hisopo a tubos de 15 ml (VWR International) y se resuspendieron en 2 ml de PBS (*Phosphate buffered saline*, Oxoid). Se ajustó la concentración de la suspensión celular (diluyendo con PBS o añadiendo células) utilizando el espectofotómetro en una longitud de onda de 610 nanómetros (nm), hasta que se alcanzó una absorbancia de entre 0,8-1. Se transfirieron 400 µl de dicha solución a un *ependorf* al que se añadió 20 µl de Proteinasa K (Amresco). Para preparar el *plug* se añadió a este *ependorf* 400 µl de *Seakem Gold Agarose* (al 1,5%

en *TE Buffer*, 10mM Tris:1mM EDTA pH 8.0). Se dispuso dicha mezcla en los pocillos correspondientes evitando la formación de burbujas y se dejó solidificar 15 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos a 4°C. Se transfirieron los *plugs* una vez solidificados a tubos de 50 ml (VWR International, USA) con 5 ml de *Cell Lysis Buffer* (50mM Tris: 50mM EDTA, pH 8.0 + Sarcosyl al 1%) y 25 µl de Proteinasa K. Se colocaron los tubos en un baño a 55°C en agitación a 150 rpm durante dos horas. Tras este periodo de tiempo, se realizó un lavado de los *plugs*, dos veces con agua y tres veces con *TE Buffer* y entre ellos se mantuvieron los tubos en agitación a 55°C durante 10 minutos.

A continuación, se realizó la restricción del ADN en dichos *plugs* en tubos *ependorf* de 2 ml con 4 µl de enzima *SmaI* (Takara Bio Inc., Seta 3-4-1, Otsu, Shiga 520-2193, Japan), 30 µl de 10X Buffer (Takara Bio Inc.), 12 µl de BSA (Takara Bio Inc.) y 254 µl de agua miliQ. La digestión se llevó a cabo durante 4 horas a 37°C a 400rpm en un bloque térmico *Thermomixer compact* (Eppendorf-Netheler-Hinz).

Por último, se preparó un gel con *Seakem Gold Agarose* al 1% en 150 ml de TBE 0,5X (Tampón TBE 5X pH=8,3; Scharlau), se anclaron los *plugs* en el peine fijándolos con dicha agarosa y se dejó solidificar durante unos 45 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, se rellenó la cubeta de electroforesis (Chef-DR III System) con dos litros de TBE 0,5X y se encendió el módulo de frío (Bio-Rad) a 14°C. Las condiciones de la electroforesis se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de las condiciones de trabajo de la técnica PFGE realizada en las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas tanto en muestras de alimentos como en muestras de pacientes del Hospital de León

<i>Initial Switch Time</i>	6,76 s
<i>Final Switch Time</i>	35,38 s
Voltaje	6
<i>Included Angle</i>	120°
<i>Run Time</i>	18 horas

Tras las 18 horas se tiñó el gel en bromuro de etidio a una concentración de 1µg/ml (Sigma) durante una hora, y se procedió a registrar los datos de la misma forma que ha sido descrita en el capítulo de *Aeromonas*.

2.5.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): Los ADN de las cepas aisladas fueron purificados utilizando el kit comercial “PCR clean-up Gel extraction” (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemania), cuyo protocolo se describe a continuación:

- El primer paso consiste en la preparación del ADN para su unión a la columna de purificación mediante la mezcla de dos volúmenes de Buffer NTI y un volumen de nuestra muestra de ADN. Los volúmenes usados fueron 200 y 100 µl respectivamente.
- En segundo lugar, la mezcla obtenida se pasó a través de una columna de purificación centrifugando durante 30 segundos a 11000g.
- A continuación, se procedió al lavado de la columna dos veces con 350 µl del buffer NT3 y se centrifugó entre cada uno de ellos durante 30 segundos a 11000g.
- Por último, se centrifugó de nuevo la columna vacía durante 1 minuto a 11000g con el fin de secar la membrana y se eluyó el ADN purificado con 35 µl de agua destilada miliQ centrifugando a 11000g durante 1 minuto.

El ADN purificado fue guardado a congelación hasta el momento de realizarse la técnica de AFLP, que se llevó a cabo en el “Laboratorio de Técnicas Instrumentales” de la Universidad de León, y los resultados obtenidos fueron analizados con el programa “GeneMarker” (SoftGenetics LLS, State College, PA 16803) y el software Gel Comprer II (Versión 6.5.; Applied Maths).

La técnica de AFLP es un tipo de tipificación molecular basada en la restricción del ADN genómico mediante enzimas y en la subsecuente amplificación de algunos de esos fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Es una herramienta de análisis del genoma que nos permite la detección de la variabilidad genética combinando la especificidad y la resolución de la digestión con enzimas de restricción con la rapidez de la detección de polimorfismos mediante PCR.

El protocolo se llevó a cabo en las cuatro etapas que se indican a continuación:

- a) Digestión del ADN previamente purificado, con las enzimas de restricción, HindIII y HhaI (XX Integrated DNA Technologies Inc).
- b) Ligado de los adaptadores (fragmentos de ADN de doble cadena) que se unen de forma específica a los fragmentos obtenidos tras la digestión previa y sirven como molde para la amplificación posterior. Se emplearon HindIIILinkA, HindIIILinkB, HhaLinkA y HhaLinkB (XX Integrated DNA Technologies Inc).
- c) Incubación a 37°C durante dos horas. A continuación, se diluyó en 190 µl de TE Buffer y se guardó a -20°C.
- d) Amplificación por PCR con dos subetapas, una preamplificación en la que se utilizaron los cebadores HindPre y HhaPre y una amplificación donde se utilizaron los cebadores HindAPCRFAM y HhaAPCR (XX Integrated DNA Technologies Inc).

Las condiciones de realización de la amplificación llevada a cabo según Lévesque et al. (2012), se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de los cebadores y condiciones de PCR utilizados en el AFLP

Etapa AFLP	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Condiciones de la reacción	
Ligado de adaptadores específicos para la restricción	<i>Hind</i> III LinkA <i>Hind</i> III LinkB <i>Hha</i> LinkA <i>Hha</i> LinkB	GAC TGC GTA CC AGC TGG TAC GCA GTC GAT GAG TCC TGA TCG ATC AGG ACT CAT C	37°C, 2 horas.	
Primera amplificación mediante PCR	<i>Hind</i> Pre <i>Hha</i> Pre	GAC TGC GTA CCA GCT T GAT GAG TCC TGA TCG C	72°C 2 min	1 ciclo
			90°C 20 s	20 ciclos
			56°C 30 s	
			72°C 2 min	
Segunda amplificación mediante PCR	<i>Hind</i> APCRFAM <i>Hha</i> APCR	6-FAM-GAC TGC GTA CCA GCT TA GAT GAG TCC TGA TCG CA	94°C 2 min	1 ciclo
			94°C 20 s	10 ciclos
			66°C 30 s	
			72°C 2 min	
			94°C 20 s	20 ciclos
			56°C 30 s	
			72°C 2 min	
			60°C 30 min	1 ciclo

- e) Una vez realizada la electroforesis, los fragmentos fueron separados y visualizados utilizando un secuenciador automático capilar modelo Megabace 500 (Amersham Biosciences) y Megabace ET-ROX 550 como marcador de pesos moleculares. Las imágenes de cada gel procesado, obtenidas con el programa GeneMarker v. 1.6 (SoftGenetics LLS), fueron importadas en el programa GelCompar II v. 6.5 (Applied Maths) y analizadas en el rango de pares de bases 50 a 550. Los patrones de bandas fueron normalizados con el estándar GS500 y se calculó la similitud genética entre los patrones de AFLP empleando el coeficiente de Dice. Para el agrupamiento de los patrones de bandas AFLP se utilizó el algoritmo UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages).

2.5.3. Pruebas de resistencia a antimicrobianos.

Se utilizó el método de referencia establecido por el “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) en el año 2005 mediante discos de difusión de cantidades conocidas de antimicrobianos. En el caso de *Campylobacter*, el antibiograma se llevó a cabo estudiando la susceptibilidad de las cepas procedentes, tanto de productos cárnicos como de casos de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital de León, sobre trece antimicrobianos cuyo nombre y concentración se recogen en la tabla 4.

Tabla 4. Resumen de la batería de antimicrobianos utilizados en el análisis de posibles resistencias de cepas de *Campylobacter*.

Antimicrobiano	Abreviatura	Concentración (por disco en µg)
Ampicilina	AMP	10
Amoxicilina + Ácido clavulánico	AMC	30
Cefalotina	CEF	10
Ácido Nalidíxico	NA	30
Tetraciclina	TE	30
Gentamicina	CN	10
Kanamicina	K	30
Compuestos sulfonamidas	S3	300
Estreptomina	S	10
Ciprofloxacino	CIP	5
Cloranfenicol	C	30
Cefotaxima	CTX	30
Trimetoprima-sulfametoxazol	STX	25
Cefoxitina	FOX	30

Los antimicrobianos fueron suministrados por BioRad en formatos de 200 discos (4x50) por antibiótico. Para llevar a cabo el antibiograma, se llevó a cabo el protocolo según se ha descrito en el capítulo correspondiente a *Aeromonas*, a excepción de que la incubación fue a 42°C durante 48 horas y en condiciones de microaerofilia.

Para evaluar la posible resistencia o sensibilidad de cada cepa a cada antibiótico se utilizaron los límites establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute para enterobacterias, que se presentan en la tabla 2A de Winkler et al., (2005), y que se reproducen en la tabla 5.

Tabla 5. Criterios para evaluar el carácter de resistencia a antimicrobianos para enterobacterias establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (Winkler et al., 2005)

Antimicrobiano	Resistente*	Intermedio*	Sensible*
Ampicilina	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicilina + Ácido clavulánico	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefalotina	≤ 14	15-17	≥ 18
Ácido nalidíxico	≤ 13	14-18	≥ 19
Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamicina	≤ 13	14-17	≥ 18
Compuestos sulfonamidas	≤ 12	13-16	≥ 17
Estreptomina	≤ 11	12-14	≥ 15
Ciprofloxacino	≤ 15	16-20	≥ 21
Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
Trimetoprima-sulfametoxazol	≤ 10	11-15	≥ 16
Cefoxitina	≤ 14	15-17	≥ 18

*Diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Incidencia de *Campylobacter* spp.

3.1.1. Procedentes de muestras de alimentos. De un total de 372 muestras analizadas obtuvimos 55 sospechosas de contener *Campylobacter* spp. (14,51%), las cuales pertenecieron en su totalidad a carnes frescas, pechuga de pollo (51 muestras) y lomo de cerdo (4 muestras). De las 55 muestras sospechosas de *Campylobacter* spp. se aislaron 74 cepas, 67 de ellas de muestras procedentes de pechuga de pollo y 7 cepas de lomo de cerdo fresco. Todas estas cepas presentaron una morfología característica de *Campylobacter* spp., y eran Gram-, catalasa y oxidasa +.

La distribución de las cepas de *Campylobacter* aisladas en función del producto de origen y de la época del año en que fueron tomadas se resume en la tabla 6.

Tabla 6. Cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en diferentes muestras de carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo

Producto (n=nº muestras)	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
Jamón cocido (n=48)	0	0	0	0
Pechuga cocida de pavo (n=48)	0	0	0	0
Mortadela (n=48)	0	0	0	0
Chorizo (n=48)	0	0	0	0
Salchichón (n=48)	0	0	0	0
Pechuga de pollo (n=84)	8 (4*)	7 (4*)	13 (6*)	39 (37*)
Lomo fresco de cerdo (n=48)	2 (2*)	3 (1*)	2 (1*)	0

* Número de muestras de las que proceden los aislados

Como se muestra en la tabla 6, las cepas aisladas proceden en su totalidad de carnes frescas, siendo mayoritarias las muestras de pechuga de pollo sospechosas de contener *Campylobacter* spp. No parece existir una variabilidad significativa de la prevalencia de *Campylobacter* en función de la época del año en que se tomaron las muestras, ya que si bien el número de cepas aisladas en el otoño fue superior al de las aisladas en las otras estaciones, también fue mayor el número de muestras tomadas en el periodo otoñal.

Según el informe emitido por la EFSA en 2010, la mayor parte de los casos de campilobacteriosis humanas se produce en los meses de junio a septiembre, incluso hasta noviembre (EFSA, 2012). Esto se refleja también en los datos del Servicio de Información Microbiológica de los años 2011 y 2012 que indican que la distribución de los casos por gastroenteritis asociada a *Campylobacter* a lo largo del año muestra un pico muy acusado en los meses de mayo y junio y otro que va desde septiembre hasta noviembre. Aún con las limitaciones antes señaladas, el otoño fue el periodo de tiempo donde aislamos más cepas.

Las prevalencias por producto de las muestras analizadas mostraron unos valores de 60,71% y 8,34% en las carnes frescas de pollo y de cerdo, respectivamente. Al comparar dichas prevalencias con los datos por productos alimenticios contaminados por *Campylobacter* ofrecidos por la EFSA sobre el año 2010 (EFSA, 2012), se determinó que la prevalencia en carnes frescas de pollo y cerdo fue de 29,6 y 0,6% (en España, 48,23% y 1,1%, respectivamente), respectivamente, y por lo tanto, muy inferior a la reflejada en nuestros datos, en el caso de cifras europeas pero más cercano en el caso de las reseñas españolas para el año 2010.

Los valores de prevalencia de *Campylobacter* en carnes frescas en España y los datos generales de la Unión Europea pueden ser en parte explicados por la diferente incidencia de *Campylobacter* en las carnes de origen aviar, en concreto de pollo, en los diversos eslabones de la cadena alimentaria: 44,6% en mataderos, 74,4% en salas de procesado y 25,4% en puntos de venta (datos correspondientes a estudios epidemiológicos realizados en España en el año 2010; EFSA, 2012). Estos mismos estudios de ámbito europeo muestran, que en los últimos años, la frecuencia de contaminación de las carnes de pollo con *Campylobacter* ha descendido en mataderos y en los puntos de venta aunque se ha mantenido o aumentado en las salas de procesado de la carne (EFSA, 2012).

Hay que señalar, sin embargo, que la prevalencia de *Campylobacter* en carnes frescas de cerdo encontrada en nuestro trabajo es unas 14 veces superior a los valores medios encontrados en la Unión Europea (EFSA, 2012). Es importante tener en cuenta que el aislamiento de cepas de *Campylobacter jejuni* en carne de cerdo puede explicarse por la existencia de contaminación cruzada en los puntos

de venta con carnes de aves en las que esta especie es más prevalente (Pezzotti et al., 2003).

Por otra parte, en los informes epidemiológicos de la Unión Europea (EFSA, 2012), no se recogen datos de prevalencia de *Campylobacter* en productos cárnicos listos para el consumo de origen porcino salvo para Irlanda, en que se indica un valor inferior a 0,5% (no detección en 173 muestras analizadas), cifra similar a la que encontramos en nuestro trabajo (<0,52%).

Los valores de prevalencia de *Campylobacter* en productos cárnicos listos para el consumo elaborados con carne de pavo (inferiores a 2%) están en consonancia con los recogidos para otros países de la Unión Europea (en particular Alemania e Irlanda) en los informes epidemiológicos anuales para los productos cárnicos elaborados con carnes de aves (pavo, 0,7% y pollo, 1,8%; EFSA, 2012).

- 3.1.2. Procedentes de pacientes del Hospital de León. De las muestras procedentes de 60 pacientes, se aislaron 50 cepas de *Campylobacter* spp., que comparten morfología y características fenotípicas de tinción de Gram, catalasa y oxidasa con las cepas de origen alimentario.

Si bien no disponemos de datos precisos para valorar la importancia de *Campylobacter* como causa de gastroenteritis en la ciudad de León, hay que tener en cuenta que desde el año 2005 hasta ahora *Campylobacter* es la causa más común de gastroenteritis en la Unión Europea. En los años 2009 y 2010, el número de casos de afectados de gastroenteritis por *Campylobacter* fueron 198682 y 212064, respectivamente (EFSA, 2012). Según los datos reflejados en los informes emitidos por el Servicio de Información Microbiológica del Instituto de Salud Carlos III (Madrid), el número de casos de infecciones por *Campylobacter* en los años 2011 y 2012 ascendieron a 5469 y 5172, respectivamente.

La elevada prevalencia de *Campylobacter* en las carnes frescas de pollo y de cerdo objeto de este estudio comparativamente con los datos equivalentes medios de la Unión Europea es coherente con el incremento de los casos de campilobacteriosis diagnosticados en los hospitales españoles en los primeros años del siglo actual (EFSA, 2010; EFSA 2012).

3.2. Identificación de cepas aisladas. Incidencia de los principales genes de virulencia asociados a *Campylobacter* spp.

La identificación de las cepas de *Campylobacter* spp. fue un proceso complicado ya que las necesidades que requieren para su crecimiento óptimo resultan tediosas y difíciles de realizar y mantener. Como primer *screening* se llevó a cabo la tinción de Gram y las pruebas de catalasa y oxidasa, obteniendo un 100% de resultados afines con lo esperado en cepas de *Campylobacter*.

La adscripción a género de las bacterias Gram negativas, catalasa y oxidasa positivas aisladas se confirmó con la presencia del gen que codifica para la flagelina (*flaA*, Nachamkin et al., 1993) y del gen que codifica para una adhesina de la membrana externa de *Campylobacter* (*cadF*, Konkel et al., 1999), mientras que se necesitó un estudio genético más amplio para poder identificar las cepas a nivel de especie. Por lo tanto, la adscripción a género *Campylobacter* se ha basado en la presencia de uno o ambos genes descritos anteriormente.

Del total de cepas aisladas de alimentos pudimos adscribir a género a un total de 66 (89,19%), y de las clínicas 46 (92%). Los perfiles genéticos encontrados se recogen en la tabla 7.

Tabla 7. Perfiles genéticos mostrados por las cepas de *Campylobacter* aisladas.

Perfiles/Cepas	Muestras de alimentos	Muestras clínicas	Total
<i>flaA+</i> / <i>cadF</i> -	51	12	63
<i>flaA</i> -/ <i>cadF</i> +	3	8	11
<i>flaA+</i> / <i>cadF</i> +	12	26	38
Total cepas pertenecientes al género <i>Campylobacter</i> y % con respecto al total de cepas aisladas	66 (89,19%)	46 (92%)	112 (90,32%)

Cabe destacar que el perfil mayoritario en las cepas procedentes de las carnes frescas fue *fla+*/*cadF*- mientras que en las cepas de origen clínico la combinación de ambos genes se presentó como la más prevalente (tabla 7).

Cuatro de las 12 cepas que no conseguimos adscribir a género, poseen el gen *mapA* característico de *Campylobacter jejuni*, por lo que surge una controversia si partimos de la base de que los genes *cadF* y *flaA* son supuestamente característicos para el género *Campylobacter*. Si bien se ha sugerido que estos genes no son 100% específicos de este género, ya que, por ejemplo, el gen *cadF* se detectó en las cepas *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788, *Escherichia coli* ATCC 43889 y *Pasteurella aerogenes* ATCC 29554 (Nayak et al., 2005).

El único test bioquímico que permite la discriminación entre *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* es la hidrólisis del hipurato, pero conlleva mucho tiempo y es difícil de interpretar (Persson et al., 2005). La adscripción a especie se llevó a cabo mediante el análisis de la presencia de los genes *mapA* y *hipO* característicos de *C.jejuni* (Alonso et al., 2011 y Persson et al., 2005, respectivamente) y el gen *asp* propio de *C.coli* (Persson et al., 2005 y Linton et al. 1997). La tabla 8 nos muestra el conjunto de combinaciones genéticas encontradas en las cepas de *Campylobacter* aisladas tanto de productos de origen cárnico como de casos clínicos de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital de León.

Tabla 8. Perfiles genéticos obtenidos a partir de las cepas de *Campylobacter* aisladas de muestras de origen alimenticio y las cepas de origen clínico.

Perfiles	Muestras alimentos	Muestras clínicas	Total	Especie
<i>flaA+/cadF-/mapA+/hipO-/asp-</i>	11	4	15	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>flaA+/cadF+/mapA+/hipO-/asp-</i>	4	6	10	
<i>flaA-/cadF+/mapA+/hipO+/asp-</i>	0	4	4	
<i>flaA-/cadF-/mapA+/hipO-/asp-</i>	4	0	4	
<i>flaA+/cadF+/mapA+/hipO+/asp-</i>	0	15	15	
<i>flaA+/cadF+/mapA-/hipO+/asp-</i>	0	1	1	
<i>flaA-/cadF+/mapA+/hipO-/asp-</i>	0	2	2	
<i>flaA+/cadF-/mapA-/hipO-/asp+</i>	10	0	10	<i>Campylobacter coli</i>
<i>flaA-/cadF+/mapA-/hipO-/asp+</i>	1	0	1	
<i>flaA+/cadF-/mapA+/hipO-/asp+</i>	0	1	1	<i>Campylobacter coli</i> atípico*
<i>flaA+/cadF-/mapA-/hipO-/asp-</i>	30	8	38	<i>Campylobacter</i> spp.
<i>flaA-/cadF+/mapA-/hipO-/asp-</i>	2	1	3	
<i>flaA+/cadF+/mapA-/hipO-/asp-</i>	8	4	12	

*Ver justificación de esta identificación en el texto.

Según los resultados obtenidos, podemos decir que del total de las cepas adscritas a género (116 si consideramos las 4 cepas *flaA-/cadF-* pero *mapA+*, antes señaladas), 51 de ellas (43,96%) pertenecen claramente a la especie *Campylobacter jejuni* y 11 (9,48%) a *Campylobacter coli* (tabla 8). Las cepas de origen alimenticio que se incluyen en *C.jejuni* proceden todas ellas de pechuga de pollo (19 cepas, 27,14% del total de las cepas de *Campylobacter* de origen alimentario), mientras que las 11 cepas adscritas a *C.coli* (15,71%) 9 proceden de pechuga de pollo y las dos restantes, de origen porcino. Las cepas de origen alimentario que no se adscribieron a ninguna de estas especies se tomaron como *Campylobacter* spp. (57,14%).

Para las carnes de pollo, la distribución de las especies de *Campylobacter* (27% *C. jejuni*, 16% *C. coli* y 57% *Campylobacter* spp.) es similar a los datos equivalentes para el conjunto de la Unión Europea en el caso de *C. jejuni* (34% para la Unión Europea; EFSA, 2012). Sin embargo, la importancia porcentual de la especie *C. coli* es inferior en nuestro caso (16%) a la correspondiente a los datos ofrecidos por los países miembros de la Unión

Europea (27%). El porcentaje de cepas de *Campylobacter* procedentes de pollo que no se identificaban (57%), fue superior al valor medio para la Unión Europea (39%).

Por otro lado, los datos de prevalencias por especie obtenidos en las cepas clínicas aisladas de casos de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital de León, mostraron que el 69,56% involucraron a *C. jejuni*, el 2,17% a *C. coli* y un 28,26% *Campylobacter* spp. Al comparar estos datos con los ofrecidos por el Servicio de Información Microbiológica en los años 2011 y 2012, aproximadamente el 80% de los casos de gastroenteritis por *Campylobacter* se asociaron a *Campylobacter jejuni*, mientras que a *C. coli* fueron 2,12%, a *C. fetus* 0,09% y a *Campylobacter* spp. un 16,20%. Así pues, la distribución de las especies de *Campylobacter* en casos clínicos de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital de León es similar a la hallada en otros hospitales españoles.

Cabe destacar la presencia de una muestra clínica que comparte el gen *mapA* (*C.jejuni*) y el gen *asp* (*C.coli*). Podemos suponer que dicha circunstancia se explique por la forma en la que nos hicieron llegar las muestras. Los hisopos fueron sembrados en placas del medio selectivo para *Campylobacter* spp., CCDA, y su apariencia tras la incubación fue la propia de un cultivo puro de *Campylobacter* con colonias blanquecinas de idéntica morfología. Suponemos que podían coexistir en la placa ambas especies y que al tratar de recoger colonias para la extracción de ADN se tomaron de ambas especies, ya que la biomasa existente en las placas fue escasa. Se ha reflejado este suceso en varios trabajos realizados en los últimos años, como por ejemplo el de Khan et al. (2009) que se encontró con muestras en las que aparecen genes (*mapA* y *ceuE*) de ambas especies en un porcentaje de entre el 3 al 5%, y previamente, y el de Denis et al. (1999) analizando muestras fecales aisló en una misma muestra, cepas de ambas especies (por presencia de *mapA* y *ceuE*) en un porcentaje superior al esperado.

Para confirmar la presencia de ambos genes en dicha cepa clínica se secuenciaron los fragmentos amplificados del genoma de la misma para los genes *mapA* y *asp*, y se obtuvieron coincidencias de aproximadamente el 100% con ambos genes.

Según comunicación verbal de investigadores del Instituto de Salud Carlos III (Madrid), este tipo de cepas se han aislado en alguna ocasión más y se han adscrito genéticamente a *Campylobacter coli* sin que hayamos encontrado documentación bibliográfica adicional a dicha comunicación que refrende tal identificación. En todo caso, asumiendo la validez de la comunicación antes indicada, la cepa de origen clínico se adscribió a *C. coli* (tabla 8).

3.3. Resistencia a compuestos antimicrobianos.

En la tabla 9 se presenta a frecuencia de resistencia a los distintos antimicrobianos de las cepas de *Campylobacter* en función de su origen (alimentos o casos clínicos).

Tabla 9. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de *Campylobacter* procedentes de carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo y de casos clínicos.

Antimicrobiano	Alimentos			Casos clínicos		
	R*	I*	S*	R*	I*	S*
Ampicilina	89,19	0	10,81	96	0	4
Amoxicilina + Ácido clavulánico	12,16	0	87,84	44	0	56
Cefalotina	82,43	0	17,57	100	0	0
Ácido nalidíxico	97,30	0	2,70	96	0	4
Tetraciclina	86,49	0	13,51	96	0	4
Gentamicina	41,89	0	58,11	66	0	34
Kanamicina	77,03	0	22,97	72	0	28
Compuestos sulfonamidas	100	0	0	96	0	4
Estreptomina	100	0	0	96	0	4
Ciprofloxacino	89,19	0	10,81	88	0	12
Cloranfenicol	55,40	0	44,60	64	0	36
Cefotaxima	66,22	0	33,78	92	0	8
Cefoxitina	16,22	0	83,78	60	0	40
Trimetoprima-sulfametoxazol	100	0	1	88	0	12

*R=Resistente, I=Intermedia y S=Sensible

En general, los niveles de resistencia mostrados por las cepas de *Campylobacter* son bastante altos, siendo más del 80% de las cepas clínicas resistentes a todos los

antimicrobianos probados salvo a cuatro y una cifra similar de las cepas aisladas de alimentos resistentes a todos menos a seis de ellos (tabla 9).

Las cepas aisladas de pacientes con gastroenteritis diagnosticadas en el Hospital de León muestran perfiles de resistencia más elevados que las cepas de origen alimentario, en concreto, muestran mayor resistencia a cefalotina, ampicilina, ácido nalidíxico, tetraciclina, sulfonamidas, estreptomicina, cefotaxima, ciprofloxacino y trimetoprima-sulfametoxazol (tabla 9). Dentro de estos antimicrobianos, la estreptomicina, las sulfonamidas y la cefotaxima no son de los compuestos más comúnmente empleados ni en la terapia antimicrobiana en los casos de infecciones humanas por *Campylobacter* ni en los estudios de resistencia a antimicrobianos realizados en años recientes (EFSA, 2012).

Cabe destacar que las resistencias mostradas por las cepas de *Campylobacter* tanto de origen alimentario como clínicas son superiores a la media europea recogida en los informes de la EFSA (EFSA, 2012). Sin embargo en informes anteriores se recogen valores de resistencia en España (EFSA, 2010) para cepas de *Campylobacter* aisladas de carnes de pollo y de cerdo muy superiores (tetraciclina 99%, ciprofloxacino 86% y ácido nalidíxico 85%) a los medios de la Unión Europea y más parecidos a los registrados en nuestro trabajo (tabla 9).

El 66,93% de las cepas aisladas en este trabajo son resistentes a los ocho antibióticos (ampicilina, estreptomicina, cefalotina, ácido nalidíxico, cefotaxima, tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol y ciprofloxacino) más comúnmente investigados en los estudios de resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Campylobacter* realizados en los últimos años (Pezzotti et al., 2003; Kim et al., 2010; Nobile et al., 2013).

El perfil de resistencia mayoritario se refleja en la tabla 10, y muestra la resistencia a diez de los catorce antimicrobianos probados, mientras que frente a los otros cuatro se obtuvieron resultados variables. Este perfil mayoritario es compartido por 57 cepas (45,97%) de las estudiadas, 26 de ellas de origen alimentario y 31 de origen clínico.

Tabla 10. Perfil de multirresistencia de la totalidad de las cepas aisladas tanto de carnes frescas como de casos clínicos diagnosticados en el Hospital de León.

Nº Cepas en función del origen	AMP	S	KF	NA	CTX	TE	AMC	SXT	CN	CIP	K	C	S3	FOX
57 cepas (26 de alimentos y 31 de casos clínicos)	R	R	R	R	R	R	V*	R	V	R	V	R	R	V

*V significa variable

Es reseñable que tres cepas de origen clínico adscritas a la especie *Campylobacter jejuni* son resistentes a todos los antimicrobianos probados, incluso a pesar de su diversidad en cuanto a los genes investigados en este trabajo. Las tres cepas fueron aisladas de pacientes distintos diagnosticados en dos semanas sucesivas.

En España Sáenz et al. (2000) indicaron unos niveles de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Campylobacter* tanto en carnes de pollo y cerdo como en muestras humanas muy altos (99% y 72% al ciprofloxacino, respectivamente). Estas cifras son similares a los datos que registramos en este trabajo, en los que la resistencia a ciprofloxacino de las cepas de *Campylobacter* procedentes de carnes de pollo y de cerdo es de un 89,19% y en cepas clínicas de un 88% (tabla 9).

En Italia se publicaron un conjunto de trabajos realizados entre los años 2003 y 2013, en los que se señala que la prevalencia de *Campylobacter* en carnes procedentes de pollo y de cerdo disminuyó en dichos años, mientras que la aparición de resistencia a antibióticos aumentó progresivamente en el mismo periodo (Pezzotti et al., 2003; Parisi et al., 2007; Sammarco et al., 2010; Nobile et al., 2013).

Pezzotti et al. (2003) señalaron que las resistencias a ciprofloxacino y ácido nalidíxico en cepas de *C. jejuni* y *C. coli* de origen humano y cárnico son similares a los valores registrados en estudios en otros países (Rautelin et al., 1999; Aarestrup et al., 2001), pero las resistencias observadas son menores que en el estudio de Sáenz et al., (2000) en España, así como inferiores a los valores registrados en esta tesis.

Se han realizado varios estudios acerca de la adquisición de resistencias por parte de cepas de *Campylobacter* tanto en animales y alimentos derivados de los mismos, así como

en humanos (Sáenz et al., 2000; Kramer et al., 2000; Hong et al., 2007; Kim et al., 2010; Sammarco et al., 2010, entre otros).

La explicación de la aparición de estas resistencias se basa principalmente en la aprobación del uso de fluoroquinolonas en animales de abasto, ya que ha sido registrado en varios estudios la aparición de cepas multirresistentes de *Campylobacter* aisladas de muestras ambientales, de animales, de alimentos y de casos clínicos en Holanda, España, Suecia y Reino Unido, entre otros (Threlfall et al., 2000; Van der Bogaard et al., 2000). Un ejemplo es el trabajo de Delsol et al. (2004), en el que se trataron cerdos con enrofloxacino (quinolona estructuralmente similar al ciprofloxacino) y se encontraron que con dicho tratamiento las cepas de *Campylobacter coli* aisladas mostraban unos niveles de resistencias mayores que las aisladas de los animales no tratados. En consonancia con dicho trabajo se han realizado otros en los que se han aislado cepas también resistentes a tetraciclinas, quinolonas diferentes al ciprofloxacino y macrólidos (Gupta et al. 2004; GE et al., 2005; Alfredson et al., 2007). La adquisición de resistencias a macrólidos también se relaciona con el uso de promotores de crecimiento en cerdos (Gibreel et al., 2006).

Por otra parte, también se ha señalado que la adquisición de resistencia a antimicrobianos puede estar mediada por elementos genéticos móviles transferibles entre bacterias. Este es el caso, por ejemplo, de la resistencia a tetraciclina, que según lo recogido por Taylor et al. (1988) es transferible únicamente entre cepas de *Campylobacter* mediante el gen plasmídico *tetO*, cuya frecuencia es muy superior en *C. coli* y sobre todo en carnes frescas de origen porcino (Pezzotti et al., 2003).

Los perfiles de resistencia a antimicrobianos encontrados en esta tesis fueron independientes de la especie de *Campylobacter*. Si bien, según Pezzotti et al. (2003) las cepas de *Campylobacter coli* son más resistentes que las cepas de *Campylobacter jejuni* tanto las procedentes de aislados de heces humanas como las de origen cárnico.

3.4. Evaluación de la similitud genética entre las cepas aisladas de los productos alimenticios sobre los que se realiza el estudio y las aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.

La primera técnica que se utilizó con las cepas tanto de origen alimentario como clínicas fue la de PFGE con la enzima *SmaI* inicialmente y a continuación, con la enzima *KpnI* como endonucleasa alternativa para tratar de mejorar el resultado. Los resultados que nos proporcionaron estas variantes de la PFGE sobre las cepas de *Campylobacter* spp. confirman su bajo poder de discriminación, ya que sobre 124 cepas, únicamente 76 (43 de origen clínico y 33 de origen alimentario) nos ofrecían bandas. Este bajo poder de discriminación nos condujo a emplear otra técnica que permitiera una mejor tipificación de las cepas. Los resultados de la tipificación por PFGE dependen de la enzima elegida y es recomendable utilizar una segunda enzima para comprobar las relaciones entre especies, u otro método de tipificación, ya que existen cepas de ambas especies de *Campylobacter* que el PFGE no es capaz de discriminar incluso usando cuatro enzimas diferentes (On et al., 1998). En nuestro caso, nos encontramos con nueve agrupaciones de cepas que el PFGE considera idénticas y que su perfil genético las adscribe a género pero no se encuentran coincidencias en cuanto a los perfiles de genes que permiten incluirlas en especie, incluso una de estas agrupaciones incluye dos cepas de origen alimentario diferente, una procedente de lomo de cerdo incluida en la especie *Campylobacter coli* y otra procedente de pechuga de pollo la cual sólo pudo ser adscrita a género. Este fenómeno puede ser explicado partiendo de la base de que en esta técnica obtenemos pocas bandas, lo cual no nos ofrece un grado de discriminación adecuado.

Ante la decisión de qué técnica de tipificación alternativa emplear, la revisión bibliográfica nos ofreció que para la genotipificación de *Campylobacter* spp. se emplean sobre todo las técnicas de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), ribotipado, tipado basado en el gen *fla* y MLST (*multilocus sequence typing*). El sistema de tipado más novedoso es el MLST, que se basa en la secuenciación de fragmentos de entre 450 y 500 pares de bases de siete genes conservados (*housekeeping genes*): *aspA* (aspartasa A), *glnA* (glutamina sintetasa), *gltA* (citrato sintetasa), *glyA* (serina hidroximetiltransferasa), *pgm* (fosfoglucomutasa), *tkt* (transcetolasa) y *uncA* (subunidad alfa ATP sintasa) (Dingle et al.,

2001; Dingle et al., 2005). El problema de utilizar esta técnica es que requiere de mucho tiempo y además, es bastante costosa, por eso nos inclinamos por realizar el AFLP.

La técnica de AFLP nos ofreció un 100% de tipificación de las cepas, lo cual permitió construir un dendrograma utilizando el coeficiente de Dice para evaluar la similitud entre cepas y el método de agrupamiento UPGMA. Utilizando un porcentaje de similitud del 85% obtuvimos 26 grupos de cepas (nombrados con números romanos del I al XXVI), de los cuales sólo ocho (II, VI, VII, VIII, IX, XII, XIV y XVI) incluían cepas aisladas de muestras de alimentos y cepas de origen clínico (figura 1).

Según el dendrograma resultante, no se encontraron cepas que mostraran una similitud del 100% entre ellas, pero sí tenemos varios grupos que se parecen en un porcentaje alto. Al analizar la información que se había recopilado en cada una de las cepas que se parecen con porcentajes superiores al 94,9% no se encontraron patrones de agrupación de especies, baterías genéticas o de perfiles de resistencia a antibióticos.

Para simplificar la expresión, en adelante emplearemos la terminología “perfil genético” ó “batería genética” para referirnos a la presencia en las cepas de los genes de virulencia y de los genes de identificación incluidos en este trabajo.

Cabe destacar, en cuanto a las cepas de origen cárnico:

- Las cepas 1C117 y 1C118 (97% de semejanza, sólo dos bandas de diferencia) comparten origen (pechuga de pollo), especie (*Campylobacter* spp., *flaA+*) y perfil de resistencia a antibióticos, y a su vez se parecen a una tercera cepa, 1C120, en un 96.9% (3 bandas de diferencia) integrada con las anteriores en el grupo XIV (figura 1), y que es idéntica en cuanto a origen, especie y perfil genético, pero con un perfil de resistencia a antimicrobianos diferente.
- Ocurre algo similar con las cepas 2C26 y 2C29 ambas procedentes de pechuga de pollo, similares en un 94,9% (3 bandas de diferencia), que son idénticas en especie y perfil genético, y además similares en perfil de resistencia a antimicrobianos. Estas dos cepas forman el grupo III (figura 1).
- Sin embargo, las cepas procedentes de pechuga de pollo, 2C6 y 2C8, similares en un 95,8% (6 bandas diferentes entre ellas) son de la misma especie y tienen un perfil de resistencia similar pero no coinciden en el patrón genético (grupo VII, figura 1).

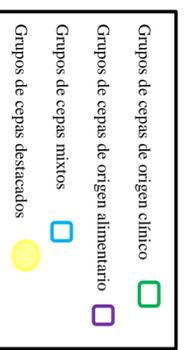
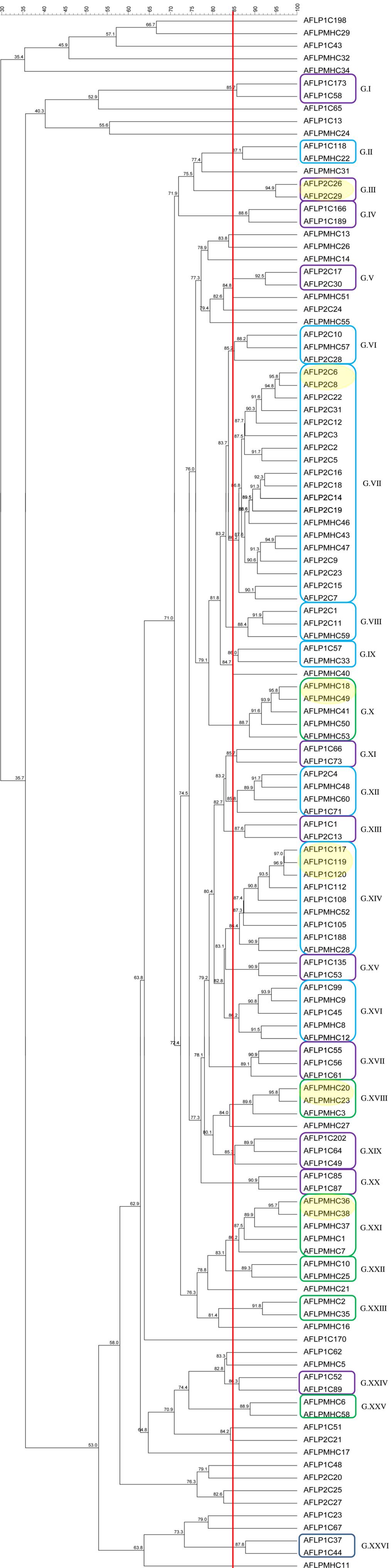


Figura 1. Dendrograma resultado de la realización de la técnica AFLP sobre las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de alimentos (AFLP1C y AFLP2C) y de origen clínico (AFLPMHC).

Por otra parte, en cuanto a las cepas clínicas, es importante destacar que:

- Las cepas H36 y H38 (similares en un 95,7% con una banda de diferencia, incluidas en el grupo XXI, figura 1) comparten perfil genético (*flaA+*/*cadF+*/*mapA+*/*hipO+*/*asp-*) y especie (*C. jejuni*) pero sólo la H36 está incluida en el perfil mayoritario de resistencia a antibióticos.
- Las cepas H20 y H23 (similares en un 95,8% con tres bandas de diferencia, integradas en el grupo XVIII, figura 1), son idénticas en cuanto a especie (*C. jejuni*), similares en perfil genético y comparten el mismo perfil de resistencia a antimicrobianos que a su vez coincide con el perfil mayoritario.
- Mientras que las cepas H18 y H49 (grupo X, figura 1) muestran diferencias significativas en cuanto a su batería genética y su perfil de resistencia a antibióticos pero se parecen en un porcentaje del 95,8% (poseen tres bandas de diferencia).

Del total de pulsotipos encontrados observamos una gran variabilidad en cuanto a los perfiles genéticos de las cepas que los conforman, ya que sólo en ocho de ellos (III, V, XI, XV, XX, XXII, XXIV y XXVI) aparecen cepas genéticamente iguales en cuanto a su perfil. De estos ocho grupos, siete están compuestos por cepas de origen alimentario y cabe destacar que las cepas que incluyen únicamente están adscritas a género, dos de ellos con cepas con perfiles *flaA+*/*cadF+* y los otros seis con perfiles *flaA+*/*cadF-*.

En cuanto al grupo restante (G. XXII), está compuesto por dos cepas clínicas incluidas en la especie *Campylobacter jejuni* y con perfil genético *flaA+*/*cadF+*/*mapA+*/*hipO+*/*asp-*. Este grupo se parece en un 83,1% a otro (G. XXI) formado por cinco cepas clínicas adscritas también a la especie *C.jejuni* y todas ellas con el perfil *flaA+*/*cadF+*/*mapA+*/*hipO+*/*asp-* salvo una de ellas que es *mapA* negativa.

Una situación similar se presenta en otro grupo (G. XVIII) constituido por tres cepas clínicas de *C.jejuni* en el que comparten dos de ellas el perfil completo de dicha especie (*flaA+*/*cadF+*/*mapA+*/*hipO+*/*asp-*) y la otra no posee el gen *hipO*, y que además, se parecen un 84% a una cuarta cepa de origen clínico que genéticamente es idéntica a las dos primeras.

Las cepas que comparten el perfil mayoritario de resistencia a antibióticos están ampliamente distribuidas a lo largo del dendrograma resultante de su tipificación genética. Por otra parte, las tres cepas clínicas resistentes a todos los antibióticos probados pertenecen

a la especie *Campylobacter jejuni* pero no comparten perfil genético y sólo una de ellas (MHC18) está incluida en un grupo de AFLP (G.X) con otras cuatro cepas de origen clínico altamente resistentes pero con perfiles genéticos muy diversos.

Con todo esto, se concluye que esta técnica no ha sido capaz de agrupar las cepas aisladas de carnes frescas y de pacientes de gastroenteritis diagnosticadas en el Hospital de León en función de su especie, de sus características genéticas o de sus perfiles de resistencia a los antimicrobianos probados.

4. CONCLUSIONES.

La prevalencia de *Campylobacter* en carnes frescas de pollo y de cerdo comercializadas en la ciudad de León es especialmente elevada, mientras que la prevalencia estimada para *Campylobacter* en productos cárnicos listos para el consumo de origen porcino o de origen aviar comercializados en la referida ciudad de León es similar a la recogida en los informes epidemiológicos globales de toda la Unión Europea.

Sin embargo, la importancia sanitaria real de esta elevada prevalencia previsiblemente es escasa, como se pone de manifiesto por las diferencias genéticas y fisiológicas entre las cepas de *Campylobacter* aisladas de las carnes frescas y las procedentes de casos clínicos de campilobacteriosis diagnosticados en el Hospital que cubre la zona geográfica en que se comercializaron los productos alimenticios.

Las cepas de *Campylobacter* procedentes de casos de gastroenteritis diagnosticadas en el Complejo Hospitalario de León mostraron una gran capacidad de resistencia *in vitro* a compuestos antimicrobianos incluso presentando perfiles genéticos diferentes, lo que previsiblemente dificultará la gestión terapéutica de estos casos clínicos.

5. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aarestrup, F. M., & Engberg, J. (2001). Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 32(3-4), 311-321.
2. Allerberger, F., Al-Jazrawi, N., Kreidl, P., Dierich, M. P., Feierl, G., Hein, I., & Wagner, M. (2003). Barbecued chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infection*, 31(1), 19-23.
3. Allos, B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), 1201-1206.
4. Altekruse, S. F., Stern, N. J., Fields, P. I., & Swerdlow, D. L. (1999). *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 5(1), 28-35.
5. Altekruse, S. F., Hunt, J. M., Tollefson, L. K., & Madden, J. M. (1994). Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(1), 57-61.
6. Altekruse, S. F., Swerdlow, D. L., & Stern, N. J. (1998). Microbial food borne pathogens. *Campylobacter jejuni*. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 14(1), 31-40.
7. Avrain, L., Humbert, F., Sanders, P., Vernozy-Rozand, C., & Kempf, I. (2004). Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from pigs in french slaughterhouses. *Revue De Medecine Veterinaire*, 155(3), 156-158.
8. Avrain, L., Vernozy-Rozand, C., & Kempf, I. (2004). Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 134-140.
9. Beutling, D. (1998). Incidence and survival of *Campylobacter* in food. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 49, 13-15.
10. Blaser, M., Hardesty, H., Powers, B., & Wang, W. (1980). Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(4), 309-313.
11. Boer, P. d., Wagenaar, J. A., Achterberg, R. P., Putten, J. P. v., Schouls, L. M., & Duim, B. (2002). Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo. *Molecular Microbiology*, 44(2), 351-359.
12. Briscoe, D. M., McMenamin, J. B., & O'Donohoe, N. V. (1987). Prognosis in Guillain-Barre Syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, 62(7), 733-735.
13. Catteau, M. (1995). The genus *Campylobacter*. *Microbiological Control for Foods and Agricultural Products, Bourgeois, CM and JY Leveau (Eds.)*. VCH Publishers, New York., 325-334.
14. Cawthraw, S. A., Lind, L., Kaijser, B., & Newell, D. G. (2000). Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers. *Clinical and Experimental Immunology*, 122(1), 55-60.
15. Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of am - PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 29(6), 406-410.

16. Dingle, K. E., Colles, F. M., Falush, D., & Maiden, M. C. J. (2005). Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 340-347.
17. Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R. A., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., Maiden, M. C. J. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 14-23.
18. Dingle, K. E., Van den Braak, N., Colles, F. M., Price, L. J., Woodward, D. L., Rodgers, F. G., Maiden, M. C. J. (2001). Sequence typing confirms that *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillain-Barré and Miller-Fisher Syndromes are of diverse genetic lineage, serotype, and flagella type. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3346-3349.
19. El-Shibiny, A., Connerton, P., & Connerton, I. (2009). Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), 197-202.
20. El-Shibiny, A., Scott, A., Timms, A., Metaweia, Y., Connerton, P., & Connerton, I. (2009). Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *Journal of Food Protection*, 72(4), 733-740.
21. Everest, P., Ketley, J., & Sussman, M. (2002). *Campylobacter*. *Molecular Medical Microbiology: Volumes 1-3*, 1311-1329.
22. Fauchere, J., Rosenau, A., Veron, M., Moyon, E., Richard, S., & Pfister, A. (1986). Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infection and Immunity*, 54(2), 283-287.
23. Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Mandrell, R. E., Miller, W. G., Rasko, D. A., Ravel, J., Daugherty, S. C. (2005). Major structural differences and novel potential virulence mechanisms from the genomes of multiple *Campylobacter* species. *PLoS Biology*, 3(1), e15-e19.
24. García Peña, F., Vigo, M., & Varo, J. (2003). Bovine genital *Campylobacteriosis*. *Profesión Veterinaria*. 2003.
25. Ge, B., McDermott, P. F., White, D. G., & Meng, J. (2005). Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3347-3354.
26. Ge, B., White, D. G., McDermott, P. F., Girard, W., Zhao, S., Hubert, S., & Meng, J. (2003). Antimicrobial-resistant *Campylobacter* species from retail raw meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 3005-3007.
27. Grant, C., Konkol, M., Cieplak, W., & Tompkins, L. (1993). Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infection and Immunity*, 61(5), 1764-1771.
28. Guerry, P., Alm, R., Power, M., Logan, S., & Trust, T. (1991). Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. *Journal of Bacteriology*, 173(15), 4757-4764.
29. Guerry, P. (2007). *Campylobacter* flagella: Not just for motility. *Trends in Microbiology*, 15(10), 456-461.

30. Hadden, R., & Gregson, N. (2001). Guillain–Barre Syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90(S6), 145S-154S.
31. Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology* Academic Pr. London, UK.
32. Hassane, D. C., Lee, R. B., Mendenhall, M. D., & Pickett, C. L. (2001). Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infection and Immunity*, 69(9), 5752-5759.
33. Hazeleger, W. C., Wouters, J. A., Rombouts, F. M., & Abee, T. (1998). Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3917-3922.
34. Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R. O., Novik, V., Altman, B., Benitez, M., Galán, J. E. (2006). Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infection and Immunity*, 74(8), 4694-4707.
35. Hong, J., Kim, J. M., Jung, W. K., Kim, S. H., Bae, W., Koo, H. C., Park, Y. H. (2007). Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat, pork, and beef in Korea, from 2001 to 2006. *Journal of Food Protection*, 70(4), 860-866.
36. Hugdahl, M. B., Beery, J., & Doyle, M. (1988). Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 56(6), 1560-1566.
37. ISO. (2006). In ISO (Ed.), ISO 10272-1:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - part 1: Detection method. ISO Ginebra, Suiza.
38. Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N. A., Lastovica, A. J., & Wren, B. W. (2000). Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for penner serotype specificity. *Molecular Microbiology*, 35(3), 529-541.
39. Ketley, J. M. (1997). Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143(1), 5-21.
40. Khan, I. U., Gannon, V., Loughborough, A., Jokinen, C., Kent, R., Koning, W., Neumann, N. (2009). A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), 307-313.
41. Kim, J. M., Hong, J., Bae, W., Koo, C., Kim, S. H., & Park, Y. H. (2010). Prevalence, antibiograms, and transferable *tetO* plasmid of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw chicken, pork, and human clinical cases in Korea. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1430-1437.
42. Komagamine, T., & Yuki, N. (2006). Ganglioside mimicry as a cause of Guillain-Barré Syndrome. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets)*, 5(4), 391-400.
43. Konkel, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J., Garvis, S. G., & Yoon, J. (1999). Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 510-517.
44. Kramer, J. M., Frost, J. A., Bolton, F. J., & Wareing, D. R. (2000). *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: Identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. *Journal of Food Protection*, 63(12), 1654-1659.
45. Lara-Tejero, M., & Galán, J. E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science*, 290(5490), 354-357.

46. Lastovica, A. J., & Le Roux, E. (2001). Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4222-4223.
47. Lázaro, B., Cárcamo, J., Audicana, A., Perales, I., & Fernández-Astorga, A. (1999). Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4677-4681.
48. Lee, A., Smith, S. C., & Coloe, P. J. (1998). Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1609-1614.
49. Lévesque, S., St-Pierre, K., Frost, E., Arbeit, R. D., & Michaud, S. (2012). Use of amplified-fragment length polymorphism to study the ecology of *Campylobacter jejuni* in environmental water and to predict multilocus sequence typing clonal complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2470-2473.
50. Linton, D., Lawson, A., Owen, R., & Stanley, J. (1997). PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(10), 2568-2572.
51. Lior, H. (1994). *Campylobacters*: Epidemiological markers. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 14, 317-324.
52. Liu, D. (2011). *Molecular detection of human bacterial pathogens* CRC Press. Boca Raton, Florida (USA).
53. Louwen, R., Van Belkum, A., Wagenaar, J., Doorduyn, Y., Achterberg, R., & Endtz, H. (2006). Lack of association between the presence of the pVir plasmid and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1867-1868.
54. Nachamkin, I., Szymanski, C. M., & Blaser, M. J. (2008). *Campylobacter* (3^a Ed.). ASM Press, Washington D.C.
55. Nachamkin, I. (1997). Microbiologic approaches for studying *Campylobacter* species in patients with Guillain-Barre Syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 176, S106-S114.
56. Nayak, R., Stewart, T. M., & Nawaz, M. S. (2005). PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Molecular and Cellular Probes*, 19(3), 187-193.
57. Neisser, A., Bernheimer, H., Berger, T., Moran, A. P., & Schwerer, B. (1997). Serum antibodies against gangliosides and *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides in Miller Fisher Syndrome. *Infection and Immunity*, 65(10), 4038-4042.
58. Nguyen, H. T., Corry, J. E., & Miles, C. A. (2006). Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic *Campylobacters*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 908-913.
59. Nobile, C. G., Costantino, R., Bianco, A., Pileggi, C., & Pavia, M. (2013). Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in southern Italy. *Food Control*, 2013.
60. Nuijten, P., Van Asten, F., Gastra, W., & Van Der Zeijst, B. (1990). Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes. *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 17798-17804.

61. On, S. L., & Jordan, P. J. (2003). Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 330-336.
62. On, S. L. W. (1998). In vitro genotypic variation of *Campylobacter coli* documented by pulsed-field gel electrophoretic DNA profiling: Implications for epidemiological studies. *FEMS Microbiology Letters*, 165(2), 341-346.
63. On, S. L. W., Nielsen, E. M., Engberg, J., & Madsen, M. (1998). Validity of SmaI-defined genotypes of *Campylobacter jejuni* examined by *SalI*, *KpnI*, and *BamHI* polymorphisms: Evidence of identical clones infecting humans, poultry, and cattle. *Epidemiology and Infection*, 120(3), 231-237.
64. Parisi, A., Lanzilotta, S., Addante, N., Normanno, G., Di Modugno, G., Dambrosio, A., & Montagna, C. (2007). Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from cattle, hens, broilers and broiler meat in south-eastern Italy. *Veterinary Research Communications*, 31(1), 113-123.
65. Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Barrell, B. G. (2000). The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403(6770), 665-668.
66. Persson, S., & Olsen, K. E. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of Medical Microbiology*, 54(11), 1043-1047.
67. Pezzotti, G., Serafin, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M., & Perin, R. (2003). Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 281-287.
68. Rautelin, H., Jusufovic, J., & Hänninen, M. (1999). Identification of hippurate-negative thermophilic *Campylobacters*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 35(1), 9-12.
69. Robinson, D. (1981). Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, 282(6276), 1584.
70. Robinson, D., & Jones, D. M. (1981). Milk-borne *Campylobacter* infection. *British Medical Journal*, 282(6273), 1374.
71. Rollins, D., & Colwell, R. (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3), 531-538.
72. Rosenquist, H., Nielsen, N. L., Sommer, H. M., Nørrung, B., & Christensen, B. B. (2003). Quantitative risk assessment of human *Campylobacteriosis* associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 83(1), 87-103.
73. Sáenz, Y., Zarazaga, M., Lantero, M., Gastañares, M. J., Baquero, F., & Torres, C. (2000). Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 267-271.
74. Sammarco, M. L., Ripabelli, G., Fanelli, I., Grasso, G. M., & Tamburro, M. (2010). Prevalence and biomolecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from retail meat. *Journal of Food Protection*, 73(4), 720-728.

75. Schmidt-Ott, R., Pohl, S., Burghard, S., Weig, M., & Groß, U. (2005). Identification and characterization of a major subgroup of conjugative *Campylobacter jejuni* plasmids. *Journal of Infection*, 50(1), 12-21.
76. Schwerer, B. (2002). Antibodies against gangliosides: A link between preceding infection and immunopathogenesis of Guillain-Barré Syndrome. *Microbes and Infection*, 4(3), 373-384.
77. Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
78. Taylor, D. E., & Courvalin, P. (1988). Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(8), 1107.
79. Threlfall, E. J., Ward, L. R., Frost, J. A., & Willshaw, G. A. (2000). The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1), 1-5.
80. Totten, P., Patton, C., Tenover, F., Barrett, T., Stamm, W., Steigerwalt, A., Brenner, D. (1987). Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(9), 1747-1752.
81. Tracz, D. M., Keelan, M., Ahmed-Bentley, J., Gibreel, A., Kowalewska-Grochowska, K., & Taylor, D. E. (2005). pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 839.
82. Van den Bogaard, Anthony E, & Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(4), 327-335.
83. Van Vliet, A., & Ketley, J. (2001). Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90(S6), 45S-56S.
84. Vandamme P. (2000) Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. In *Campylobacter* (2^a ed.), Nachamkin I. & Blaser, M.J. American Society for Microbiology, Washington, DC. Pp 3–26.
85. Wassenaar, T. M., & Blaser, M. J. (1999). Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection*, 1(12), 1023-1033.
86. Whitehouse, C. A., Balbo, P. B., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Mirabito, P. M., & Pickett, C. L. (1998). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infection and Immunity*, 66(5), 1934-1940.
87. Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Hecht, D. W., Swenson, J. M. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. 27 (1), 1-177.
88. Wilson, D. L., Bell, J. A., Young, V. B., Wilder, S. R., Mansfield, L. S., & Linz, J. E. (2003). Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture. *Microbiology*, 149(12), 3603-3615.
89. Young, K. T., Davis, L. M., & DiRita, V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: Molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), 665-679.

Capítulo IV. Incidencia de *Salmonella* y *Yersinia* en carnes y productos cárnicos listos para el consumo y estimación de su patogenicidad

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. *Salmonella*.

1.1.1. *Salmonella* como agente de gastroenteritis.

Anualmente se producen unos 112 millones de casos anuales de infección humana por *Salmonella* en humanos y según la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO), las fiebres tifoideas suponen 21,7 millones de los mismos (WHO, 2002; Crump et al., 2004). En la Unión Europea los casos confirmados de infecciones por *Salmonella* en 2007 ascendieron a la cifra de 151995 (EFSA, 2009).

Según el Servicio de Información Microbiológica (SIM), las cifras de casos de enfermedades gastrointestinales producidas por bacterias del género *Salmonella* en España fueron 4420 y 3786 en los años 2010 y 2011, respectivamente. Desde el año 2006 los datos registrados colocan a *Salmonella* no tifoidea como la segunda causa de gastroenteritis notificadas al SIM, después de *Campylobacter* (Servicio de Información Microbiológica, 2012).

Salmonella se sitúa como la bacteria causante de mayor número de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos notificados según agente causal y año en España, durante los años 1994-2003 (Hernández-Pezzi et al., 2004; Cevallos et al., 2005). En número de brotes en el año 2003 ascendió a 733, siendo *Salmonella* Enteritidis el serotipo prevalente en un 56,07% de los brotes (Hernández-Pezzi et al., 2004; Cevallos et al., 2005). Según lo recogido en el informe de la Unión Europea (UE) sobre las tendencias de las zoonosis y los agentes zoonóticos y los brotes de origen alimentario en 2010 (EFSA, 2012a), del total de brotes de origen alimenticio en la UE en el año un 30% fueron atribuidos a serotipos de *Salmonella*, y dentro de estos, en España fueron notificados 190 brotes por *Salmonella* en dicho año, de los cuales un 5,3% y un 5,4% correspondieron con carne de pollo y de cerdo, respectivamente (EFSA, 2012a).

En los brotes por *Salmonella* en los que se pudo identificar el alimento implicado, las carnes frescas y los productos cárnicos estuvieron involucrados en un 4,45% de los mismos (Hernández-Pezzi et al., 2004; Cevallos et al., 2005).

A nivel mundial durante los años 2000-2002 *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis fue el serotipo más comúnmente aislado en humanos (65%) y esta cifra es superada en Europa con un valor del 85% (Galanis et al., 2006). Esto se atribuye a su gran capacidad invasiva en animales destinados a consumo humano (Humphrey et al., 2004). El hecho de que la inmensa mayoría de los aislados humanos pertenezcan al mismo serotipo ha obligado a mejorar la eficiencia en su caracterización lo que se ha logrado mediante técnicas de discriminación como tipificación mediante fagos, pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos y tipificación genética mediante PFGE, entre otros (Josefsen et al., 2011).

En España el serotipo mayoritario es *Salmonella* Enteritidis con una incidencia del 43-60% durante 1997-2005. El segundo es *Salmonella* Typhimurium con valores del 30% en los años 97-98, que descienden posteriormente hasta un 8,5% (Usera 2001a, 2003a; Echeita 2005 a, b).

Según los datos registrados en el Servicio de Información Microbiológica (SIM) durante el periodo 2001-2010 el número de infecciones por *Salmonella* no tifoidea asciende a 60517, siendo un 45,25% de los mismos causado por el serotipo Enteritidis (Servicio de Información Microbiológica, 2012). No existen diferencias significativas en cuanto al sexo de los individuos afectados pero sí en cuanto la edad, siendo muy importante la incidencia en niños menores de cinco años (37%) y en ancianos (12% en mayores de 65), Echeita et al., 2005 a,b,c. Destaca también la mayor probabilidad de contraer la infección en personas inmunodeprimidas y/o con enfermedades crónicas subyacentes como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida por ejemplo (Morpeth y Thielman, 2006; Rodríguez et al., 2006d).

De los 131468 casos de salmonelosis recogidos por la EFSA en el año 2008, un 5,6%, 5,1% y 0,7% de los mismos se asocian al consumo de carne de pavo, pollo y cerdo, respectivamente (EFSA, 2010).

1.1.2. Taxonomía y clasificación del género *Salmonella*.

Las bacterias del género *Salmonella* fueron aisladas por primera vez en 1885 de cerdos por dos veterinarios americanos, Salmon y Smith y se denominaron inicialmente como *Salmonella choleraesuis* (Humphrey et al., 2006).

Son bacterias Gram negativas anaerobias facultativas y la mayoría móviles por flagelos peritricos, a excepción de los serotipos Gallinarum y Pullorum. La mayoría produce gas por fermentación de carbohidratos, especialmente glucosa, con la excepción de los serotipos Typhi, Gallinarum y Pullorum. Producen la enzima catalasa y dan negativo en la prueba de la citocromo oxidasa. Toleran altas concentraciones de sales biliares y su crecimiento no se ve afectado por la presencia de colorantes, tales como el azul de metileno, la eosina o el verde brillante, los cuales se utilizan en los medios de aislamiento como características selectivas frente a otros géneros bacterianos. Se multiplican en un rango de temperatura que va desde los 5°C a los 47°C, teniendo su óptimo en 35-37°C. Soportan pH de entre 4,5 y 9 pero su óptimo para el crecimiento oscila en 6,5-7,5. Se desarrollan bien a actividades de agua de entre 0,945 y 0,999 aunque se ha comprobado que en los alimentos pueden multiplicarse desde valores de 0,930 (Gledel et al., 1995; Mossel et al., 2002). La inhibición completa de su crecimiento se produce en condiciones de temperatura <7°C, pH <3,8 y/o actividad de agua <0,93 (Hanes, 2003; Bhunia, 2008).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Euzéby et al., 2013). La terminología empleada para la designación de los grupos taxonómicos dentro de *Salmonella* es, incluso entre los especialistas en bacteriología, variable y, en ocasiones contradictoria. En todo caso, a partir de la opinión publicada por Le Minor y Popoff en 1987 posteriormente apoyada por Euzéby entre otros, y la decisión de la Comisión Judicial del Comité Internacional de Sistemática Bacteriana (Opinión 80, Tindall et al., 2005) se acepta que únicamente existen dos especies de *Salmonella* (*Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*) (Le Minor et al., 1987; Euzéby et al., 1999). Durante algún tiempo se consideró una tercera especie, *Salmonella subterránea* (Shelobolina et al. 2005), que está estrechamente relacionada con *Escherichia hermannii* y no pertenece al género *Salmonella* (Euzéby et al., 2013). Dentro de la subespecie *enterica* encontramos 6 subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*), (Tindall et al., 2005). Las subespecies se separan en serotipos de acuerdo con sus características antigénicas basándose en el esquema de White-Kauffmann-Le que usa tres tipos de antígenos de superficie: somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K), (Grimont et al., 2007):

- Antígenos somáticos (O). Son termoestables y alcohol-resistentes. Forman parte del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared celular, el cual posee estructuralmente tres zonas:
 - Lípido A, que es responsable de la actividad tóxica intensa asociada a las endotoxinas.
 - Núcleo del polisacárido.
 - Cadena lateral O, que constituye el antígeno somático que proporciona la especificidad.
- Antígenos flagelares (H). Son de naturaleza proteica y termolábiles. Pueden ser de dos tipos en función de si tienen uno o dos tipos de antígenos, monofásicos o bifásicos, respectivamente.
- Antígenos capsulares (K): El único que se conoce en *Salmonella* es el antígeno Vi que se encuentra en serotipos altamente invasivos como Typhi, Paratyphi y Dublin (Rafatellu et al., 2006).

Se han aislado 2579 serotipos (Josefsen et al., 2011), perteneciendo la mayoría (>99,5%) de ellos a la especie *enterica* (la especie *bongori* posee menos de 10 serotipos, Reeves et al., 1898) y más de la mitad de éstos a la subespecie *enterica* y se encuentran relacionados con animales de sangre caliente. El resto de subespecies se relacionan con animales de sangre fría y con el medio ambiente (Uzzau et al., 2000). Además, algunos serotipos poseen un hospedador específico, bien restringido como en el caso del serotipo Typhi con humanos o bien se caracterizan por tener un hospedador prevalente y poder desarrollarse también en otros como por ejemplo los serotipos Choleraesuis y Dublin. Sin embargo, otros serotipos son altamente ubicuos y se encuentran en diversos reservorios (Uzzau et al., 2000). Debido a esta circunstancia, podemos encontrarnos con:

- Serotipos adaptados al hombre. Provocan infecciones en humanos y rara vez en animales. La transmisión de los mismos se lleva a cabo por heces de personas enfermas o de portadores asintomáticos. Los vectores de transmisión son el agua, los alimentos y los insectos. Incluye los serotipos Typhi, Paratyphi A, B y C y Sendai.
- Serotipos adaptados a animales. Incluyen los serotipos Pullorum y Gallinarum (gallináceas), Abortus-ovis (ovino), Abortus-equi (equino), Choleraesuis (porcino) y Dublin (vacuno).

- Serotipos no adaptados a hospedadores específicos. En este grupo se encuentran la mayoría y están ampliamente distribuidos por la naturaleza. Son los que mayor importancia tienen en relación con las enfermedades de transmisión alimentaria.

La mayoría de las infecciones humanas por *Salmonella* se originan en el consumo de alimentos de origen animal contaminados (WHO, 2009). También se han aislado de frutas tanto frescas como secas y de hortalizas, lo cual indica que las causas de contaminación son fertilización, riego y/o recolección en inadecuadas condiciones higiénicas (Humphrey et al., 2006).

En la figura 1 tomada de Josefsen et al. (2011), se esquematizan las principales vías de diseminación de los serotipos de *Salmonella* no específicos de hospedador.

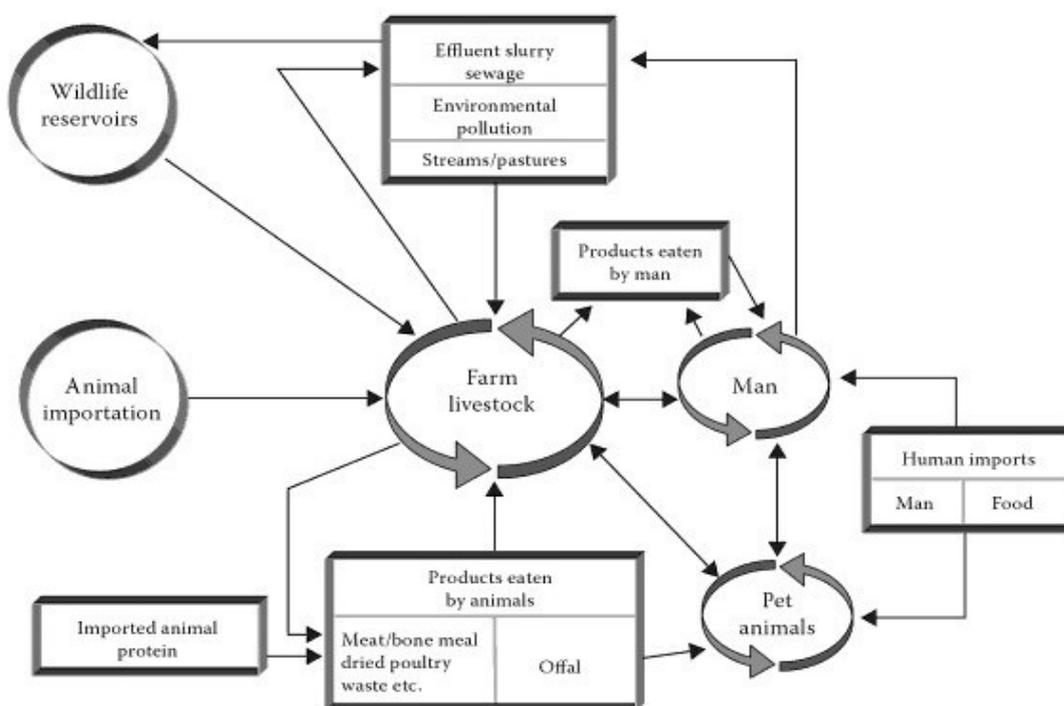


Figura 1. Rutas de transmisión de *Salmonella* (Josefsen et al., 2011).

Cuando *Salmonella* interacciona con el hospedador pueden producirse:

- ✓ La eliminación del microorganismo por el sistema inmunitario del hospedador;
- ✓ La aparición de un estado de portador asintomático;

✓ El desarrollo de enfermedad.

Las salmonelosis humanas pueden producir principalmente cuadros clínicos de dos tipos, intestinales y extraintestinales.

- Infecciones intestinales. La más común es la inflamación aguda que puede afectar al intestino delgado (enteritis) o al intestino grueso (enterocolitis). Generalmente la bacteria entra en el hospedador por vía digestiva a través de alimentos o agua contaminados con heces de animales (Figura 1). La dosis infectiva mínima oscila entre 10^5 - 10^6 en individuos sanos, mientras que individuos con factores de riesgo como la edad, inmunodepresión o procesos subyacentes (leucemia, linfoma, drepanocitosis) dicha dosis es de 10^3 células bacterianas (Gray, 1995; Miller et al., 1995). Si bien el número de células ingeridas puede disminuir al atravesar el estómago debido a su pH y a los jugos gástricos. Además, la colonización también se evita en el intestino delgado debido a los ácidos grasos bactericidas, la secreción de mucina y al peristaltismo intestinal. Por otra parte la monocapa celular del epitelio intestinal supone una barrera física a la entrada de microorganismos y a la invasión de tejidos más profundos (Pestka et al., 1985). Las bacterias que atraviesan dichas barreras colonizan el íleon y/o el colon e invaden el epitelio. La invasión comienza por la unión a receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora seguida por la internalización de la propia bacteria (Wallis et al., 2000). El periodo de incubación es de 8 a 72 horas y los síntomas iniciales son náuseas y vómitos seguidos de dolor abdominal y deposiciones diarreicas de moderado volumen (Mims et al., 1993). También pueden aparecer fiebres, cólicos y con menor frecuencia cefaleas, mialgias y otros síntomas de tipo sistémico (Miller et al., 1995). Normalmente, se trata de una enfermedad autolimitada, desapareciendo los síntomas en un periodo de 2-5 días en el caso de enteritis y de 2 a 3 semanas en las enterocolitis.

El resultado de la infección gastrointestinal depende del serotipo, de la dosis ingerida, del vehículo de transmisión, de la flora intestinal del hospedador y del estado inmunitario de éste.

- Infecciones invasivas.

- Fiebres entéricas. Son producidas por los serotipos Typhi (fiebres tifoideas) y Paratyphi A, B y C (fiebres paratifoideas), teniendo el segundo unos síntomas más suaves y una menor tasa de mortalidad. La infección normalmente se produce por la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces humanas (Pui et al., 2011). En países desarrollados está relacionada con viajes al extranjero. Sin embargo, también se presentan algunos casos en el propio país. En España, las fiebres tifoideas y paratifoideas son enfermedades de declaración obligatoria y anualmente se produjeron 228 en el periodo comprendido entre los años 1998-2008, siendo la media de 19 casos anuales según lo recogido por el Boletín epidemiológico semanal (Centro Nacional de Epidemiología, 2009). El periodo de incubación de las fiebres tifoideas oscila entre 1 y 10 días y los síntomas comienzan con dolor abdominal, diarreas leves y malestar general, complicándose con fiebres, distensión abdominal y esplenomegalia.
- Septicemia, generalmente se produce en individuos inmunocomprometidos (Josefsen et al., 2011).

En términos epidemiológicos es también importante considerar la capacidad de diseminación de *Salmonella* por las personas infectadas.

Después de una infección por *Salmonella*, la eliminación de la bacteria por las heces o por la orina persiste durante tiempos variables, generalmente algunas semanas. En tal caso se habla de portadores convalecientes. También existe el estado de portador crónico asintomático que constituye una forma de infección más frecuente aún que la inflamación intestinal aguda, y puede deberse al contacto con dosis bajas de la bacteria. Se consideran igualmente portadores crónicos aquellos que continúan la eliminación de la bacteria en heces por periodos superiores a un año, hecho que ocurre entre el 1-3% de los pacientes con fiebres tifoideas (Jones et al., 1996). En otros serotipos no tifoideos el estado del portador crónico se da en el 1% de pacientes mayores de 15 años y en el 5,4% de los menores de dos años (Miller et al., 2000; Scherer et al., 2001).

1.1.3. Mecanismo de patogenicidad de las bacterias del género *Salmonella*. Existen dos grupos distintos de factores de virulencia.

1.1.3.1. Estructuras superficiales de la bacteria, que son además dianas del sistema inmune del hospedador (Josefsen et al., 2011).

1.1.3.1.1. Lipopolisacárido, cuya actividad tóxica se debe fundamentalmente al lípido A.

1.1.3.1.2. Flagelos, que dirigen la bacteria hacia el epitelio intestinal mediante quimiotaxis, permiten atravesar la espesa capa de mucina y contribuyen al proceso de inflamación.

1.1.3.1.3. Cápsula, relacionada directamente con la capacidad invasiva del serotipo Typhi.

1.1.3.1.4. Fimbrias, estructuras proteicas que facilitan la unión de la bacteria a receptores específicos de las células del hospedador.

1.1.3.2. Genes de virulencia localizados en el cromosoma o en plásmidos que codifican factores solubles que modifican la fisiología celular del hospedador o que protegen a la bacteria de sistemas antimicrobianos del mismo. Estos genes pueden estar sueltos, formando pequeñas agrupaciones (islotes) y/o en agrupaciones mayores, llamadas islas de patogenicidad (PI, Schmidt et al., 2004).

1.1.3.2.1. Las PI son largas agrupaciones de genes que contribuyen a un determinado fenotipo de virulencia ya que codifican para determinantes responsables de establecer las interacciones específicas con el hospedador. En el caso de algunas bacterias, la adquisición de una única PI puede convertir a una cepa en patógena, lo cual explicaría la emergencia de nuevos patógenos como resultado de la evolución de cepas no virulentas. No obstante, la adquisición de una PI no siempre garantiza la conversión de una bacteria en patógeno, sino que la virulencia va a depender del microorganismo receptor y de su hospedador (Marcus et al., 2000).

En *Salmonella* la isla de patogenicidad mejor caracterizada es la denominada SPII, que se trata de una inserción de 40 Kb en el cromosoma bacteriano con un porcentaje de G+C significativamente más bajo que el contenido medio del genoma de *Salmonella*. Es necesaria para que se produzca la infección intestinal, mediando la invasión de células no-fagocíticas por *Salmonella*.

También interviene en la patogenicidad intestinal: inflamación del epitelio y síntomas diarreicos (Marcus et al., 2000; Wallis et al., 2000; Zhou et al., 2001). Esta isla tiene al menos 29 genes que codifican para (1) los componentes estructurales de un sistema de secreción tipo 3, que codifica para tres proteínas, InvA, InvH y PrgH, que interactúan directamente con los sistemas de señalización celulares forzando la entrada del patógeno; (2) proteínas que forman un poro por el que entra la bacteria (SipB y SipC); (3) proteínas efectoras (Spt y genes *sip*), y (4) proteínas reguladoras (HilA). En conjunto permiten la entrada de la bacteria en el epitelio intestinal y desencadenan el proceso inflamatorio en la mucosa. Al final del proceso la bacteria se encuentra en el interior de las células hospedadoras, dentro de vesículas membranosas denominadas SVCs (vacuolas que contienen *Salmonella*, Sansonetti et al., 2002).

La isla de patogenicidad SPI1 está presente en la geno especie *S.bongori* y en todos los genotipos analizados hasta el momento de *S.enterica* (Hensel et al., 2004).

En este estudio se investigó la presencia el gen que codifica para la invasina (gen *invA*), proteína que, entre otras, interactúa directamente con los sistemas de señalización celulares forzando la entrada del patógeno.

1.1.3.2.2. Plásmidos de virulencia. Su existencia fue descrita por primera vez en 1982 (Jones et al., 1982). Han sido encontrados en unos pocos serotipos de *S.enterica* subesp. *enterica*, particularmente en los más frecuentes y adaptados al hombre (Enteritidis, Typhimurium, Choleraesuis y Dublin). Se denominan “Plásmidos serotipo-específicos” y todos ellos portan una región *spv* (*Salmonella* Plasmid Virulence) formada por 5 genes (*spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC* y *spvD*) implicados en la multiplicación intracelular de *Salmonella*. En los plásmidos de virulencia también se incluyen otros *loci* implicados en biosíntesis de fimbrias (operón *pef*) o resistencia al suero (*rck* y *rsk*) (Mendoza et al., 2009).

1.2. *Yersinia*.

1.2.1. *Yersinia enterocolitica* como agente de gastroenteritis.

El género *Yersinia* comprende, entre otras, tres especies causantes de infecciones humanas: *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis*. Esta última originó en el siglo XIX una pandemia en China y se sucedieron brotes esporádicos de peste en Europa hasta 1920, pero hoy en día se supone totalmente erradicada en la Unión Europea (Feng et al., 2001).

Las bacterias del género *Yersinia* son capaces de causar un rango de enfermedades que va desde una enteritis leve hasta septicemia. La gravedad de los síntomas depende de la edad y el estado del sistema inmune del individuo, la virulencia de la cepa y la dosis infectiva. Pero la gravedad siempre es mayor en ciertos sectores de población: niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos (Skurnik et al., 2011).

Dentro de los síntomas producidos por *Yersinia enterocolitica* predominan las diarreas, que pueden ser sanguinolentas, mientras que *Yersinia pseudotuberculosis* cursan con dolor abdominal y fiebre (Cover et al., 1989; Bottone et al., 1999). A veces en individuos adultos se suceden complicaciones tales como dolor articular o erupciones cutáneas (Terti et al., 1989; Hannu et al., 2003). La dosis infectiva mínima en humanos no se conoce. El periodo de incubación oscila entre 1 y 11 días y la duración de los síntomas de 5 a 14 días y ocasionalmente meses (Cover et al., 1989; Jalava et al., 2006). En la mayor parte de los casos la infección es autolimitante, por lo que no suele requerir tratamiento antibiótico, salvo en casos de septicemia, individuos inmunocomprometidos y pacientes con niveles de hierro altos (Abdel-Haq et al., 2006).

La yersiniosis (*Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*) es la cuarta causa más importante de gastroenteritis en Europa, con un número de casos confirmados en 2011 que alcanzan los 1,63 por cada 100000 individuos, siendo la tasa de mortalidad del 0,02%. *Yersinia enterocolitica* fue la especie más aislada en los casos confirmados de yersiniosis con un porcentaje del 98,7% (EFSA, 2013). La incidencia máxima se muestra en niños menores de 5 años y es superior en niños de raza negra (Ray et al., 2004). Según lo recogido en datos europeos no existe variabilidad significativa en cuanto a la estacionalidad, ni al género (ECDC, 2008).

En el año 2011, fueron confirmados un total de 7017 casos de yersiniosis en la Unión Europea, lo cual supone un incremento del 3,5% con respecto al 2010 (EFSA, 2012a). Sin embargo, los datos recogidos por la EFSA muestran una disminución estadísticamente significativa durante los últimos cinco años (período 2007-2011) en la Unión Europea. Más de la mitad de los casos confirmados en 2011, un 55,2%, requirieron hospitalización (EFSA, 2013).

Dentro de los alimentos, los datos recogidos por la EFSA de forma anual muestran que *Yersinia enterocolitica* y sus biotipos y serotipoedades patógenas en humanos son aisladas la mayoría en carne de cerdo y sus derivados. Algunas cepas fueron encontradas en otros tipos de carne, en leche, en pescado y en vegetales (EFSA, 2013).

Ninguna de las pruebas realizada sobre alimentos en el año 2011 reveló la presencia de *Yersinia pseudotuberculosis*, la especie que junto a *Y. enterocolitica* se sitúa como cuarta causa de producción de gastroenteritis en humanos (EFSA, 2013).

Según el Sistema de Información Microbiológica, en España en el año 2011 se registraron 265 casos de yersiniosis por *Y. enterocolitica* procedentes de 37 laboratorios de once comunidades autónomas. Esto supone una disminución del 36% en los últimos diez años (Servicio de Información Microbiológica, 2012).

1.2.2. Taxonomía y clasificación del Género *Yersinia*.

El género *Yersinia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, y se compone de 18 especies (Euzéby et al., 2013). El tamaño del genoma oscila entre 3,7-5,4 megabases y el contenido G+C está situado entre 47 y 49%, pero únicamente está secuenciado en su totalidad en las tres especies anteriormente citadas. Estas especies patógenas poseen un número elevado de plásmidos y otros elementos genéticos móviles, lo cual explicaría los mayores niveles de virulencia expresados en *Y. pestis* frente a *Y. pseudotuberculosis* a pesar de estar bastante relacionadas genómicamente (Skurnik et al., 2011).

Y. enterocolitica y *Y. pseudotuberculosis* son patógenos zoonóticos que pueden ser transmitidos de animales a humanos (Bottone et al., 1999). La transmisión puede ser directa animal-humano (vía fecal), humano-humano (vía fecal), y en unos pocos casos, por transfusiones de sangre. En humanos suelen aparecer indirectamente por el consumo de comida o aguas contaminadas (Bottone et al., 1999).

Yersinia enterocolitica fue aislada por primera vez en 1930 (Schleifstein et al., 1939) y se describió en 1963 como *Pasteurella X* (Winblad et al., 1966). Se trata de coccobacilos Gram negativos no esporulados, móviles por flagelos peritricos a 22-25°C e inmóviles a 37°C (Castañeda et al., 2001). Son anaerobios facultativos y crecen en rangos de temperatura que oscilan entre 4 y 43°C, siendo su temperatura óptima 28-30°C. Su capacidad de crecer a bajas temperaturas permite su multiplicación en condiciones de refrigeración (Goverde et al., 1998).

En función del antígeno O, se han descrito 70 serotipos (Wauters et al., 1991). Las cepas patógenas de *Yersinia enterocolitica* de animales y humanos contienen un plásmido, denominado pYV, generalmente relacionado con los serotipos O:3, O:5,27, O:8 y O:9 (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006).

Por sus características bioquímicas y genéticas, las cepas de *Yersinia enterocolitica* se clasifican en seis biotipos: 1A (no patógeno y no posee el pYV; se considera no patógeno o ambiental, pero muchas veces es aislado de heces humanas y/o animales), 1B (posee el pYV y es altamente patógeno), 2, 3, 4 y 5 (poseen el pYV pero su patogenicidad es baja) (Wauters et al., 1987).

Las infecciones por *Yersinia enterocolitica* suelen manifestarse de manera esporádica sin origen aparente y raramente existen brotes. Únicamente algunos biotipos se relacionan con humanos, siendo el más común el 4, en particular el serotipo O:3 (Bottone et al., 1999). Rara vez se aíslan de alimentos cepas patógenas de *Y. enterocolitica* a pesar de que la digestiva es la principal vía de adquisición de la yersiniosis humana. La mayoría de las cepas de *Y. enterocolitica* aisladas de origen ambiental son no patógenas y no se corresponden en biotipo ni serotipo con las cepas patógenas humanas (Skurnik et al., 2011).

1.2.3. Mecanismo de patogenicidad en *Yersinia enterocolitica*.

Los factores de virulencia tanto cromosómicos como plasmídicos de *Y. enterocolitica* son por regla general comunes en *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*. La entrada de *Y. enterocolitica* en un huésped humano requiere de un tiempo de adaptación a la temperatura del mismo antes de iniciar el proceso infeccioso. Para conseguir adaptarse a esta temperatura las cepas hacen uso de factores de virulencia tanto cromosómicos como plasmídicos, que únicamente se expresan en ciertos rangos de temperaturas (Bottone et al., 1999).

Cabe destacar los siguientes factores de virulencia:

- 1.2.3.1. El plásmido pYV, que según Bottone et al. (1999), codifica para:
- Una proteína de membrana, YadA, responsable de la invasión de la célula hospedadora.
 - El sistema de secreción tipo III.
 - El efector Yop, constituido por tres componentes:
 - YopH, que confiere resistencia a ser fagocitados por macrófagos,
 - YopB, relacionado con la evasión del sistema inmune y la respuesta inflamatoria, y
 - YopE, implicado en procesos de citotoxicidad.
- 1.2.3.2. Como factores de adhesión se encuentran dos genes cromosómicos, el gen *inv* y el gen *ail* (Miller et al., 1992; Pepe et al., 1993).
- 1.2.3.2.1. El gen *inv* codifica para la invasina, que promueve la penetración celular en la superficie de las células eucariotas por unión a las integrinas B1 (Isberg et al., 1990). Esta proteína se sintetiza a temperaturas inferiores a 28°C y en condiciones ácidas, pero también es producida a 37°C (Pepe et al., 1994).
- 1.2.3.2.2. El gen *ail* codifica para otra proteína involucrada en la penetración de la bacteria en la célula epitelial aunque de manera más restrictiva (Miller et al., 1988). Además, está involucrada en la resistencia sérica (Bottone et al., 1999).
- 1.2.3.3. La toxina Yst, enterotoxina termoestable cuya implicación en el desarrollo de los procesos diarreicos humanos por *Y.enterocolitica* no está bien definida. Su acción se caracteriza porque induce un aumento de los niveles de GMP cíclico intracelular, creando un desequilibrio iónico que puede desencadenar los procesos diarreicos. La controversia surge cuando (a) no se ha conseguido aislar la toxina de procesos diarreicos de animales infectados con *Y.enterocolitica* (Schiemann et al., 1979;

Robins-Browne et al., 1985; Paerregaard et al., 1991) y (b) sólo puede ser detectada en sobrenadantes de cultivos frescos en la última parte de la fase logarítmica del crecimiento cuando han sido incubados a 30°C (Boyce et al., 1979). Varios estudios muestran que cepas patogénicas de colecciones antiguas pueden tener el gen *yst* de manera silente y no expresar la toxina (Delor et al., 1992). El modo de acción de la toxina, sus características bioquímicas y sus propiedades antigénicas son muy similares a las de la toxina termoestable de *E.coli* enterotoxigénico. A diferencia de la toxina de *E.coli*, la toxina Yst no puede detectarse *in vitro* a 37°C (Boyce et al., 1979; Pai et al., 1980). Esto puede hacer suponer que las condiciones para que la toxina se exprese no se reproducen *in vitro*, aunque también se ha señalado que la expresión puede ser inducida *in vitro* a 37°C mediante un aumento de la osmolaridad y del pH hacia los valores reales en el íleon (Mikulskis et al., 2006).

En el estudio llevado a cabo por Delor et al., en 1992, se llegó a la conclusión de que la toxina Yst estaba implicada en la permanencia de la bacteria *in vivo* y en la diseminación de la misma, ya que, utilizando un modelo animal sobre conejos, se demostró que la presencia de la toxina de *Y.enterocolitica* agravaba los síntomas de la yersiniosis. Sin embargo, si se utiliza otro modelo animal no se muestran los mismos efectos (Robinson-Browne et al., 1985). Por lo que el papel específico que supone la expresión de la toxina no está totalmente definido y depende del organismo sobre el cual se desarrolla el proceso infeccioso.

En cualquier caso, y en base a la conclusión antes señalada por Delor et al. (1992), se utilizó el gen *yst*, que codifica para la toxina termoestable como marcador principal para valorar la posible patogenicidad de las cepas de *Yersinia enterocolitica*.

1.3. Objetivos.

Dentro del objetivo general tendente a aportar datos significativos que permitan una evaluación cuantitativa del riesgo para la salud asociado a la ingesta de bacterias patógenas del género *Salmonella* y del género *Yersinia* con los productos alimenticios de origen cárnico, los objetivos concretos del trabajo presentado en este capítulo fueron:

Establecer la prevalencia de *Salmonella* spp. y de *Yersinia enterocolitica* en los productos alimenticios de origen cárnico en el momento de su comercialización en los centros de venta en la ciudad de León.

Evaluar la importancia sanitaria de las cepas presuntamente patógenas aisladas de carnes y productos cárnicos mediante la estimación de su similitud genética con las cepas aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Toma de muestras.

2.1.1 Muestras de alimentos. Se analizaron 336 muestras procedentes de diversos productos cárnicos (carne fresca de diversas especies, productos listos para el consumo) adquiridos en varios supermercados de la ciudad de León cuyos productos tenían un origen (suministrador) diferente. Se llevaron a cabo muestreos regulares (toma de muestras semanal) en dos periodos de tiempo; uno durante la campaña 2008-2009 y otro durante la campaña 2009-2010. Estos muestreos han sido descritos en el capítulo de *Aeromonas*.

2.1.2. Muestras procedentes de pacientes de Hospital de León.

2.1.2.1. Para *Salmonella* spp. Se recogieron 18 cepas de *Salmonella* spp. procedentes de pacientes con gastroenteritis cedidas por el Hospital de León en el periodo de tiempo de marzo a mayo del 2011 ambos inclusive. Las muestras nos fueron enviadas en placas de agar XLD (Xylose Lysine Deoxycholate, Oxoid).

2.1.2.2. Para *Yersinia enterocolitica*. Se aislaron 295 cepas de supuestas *Yersinia* a partir de muestras procedentes de pacientes con gastroenteritis cedidas por el Hospital de León en el periodo de tiempo de marzo a mayo de 2011 ambos inclusive. Las muestras nos fueron enviadas en placas de CIN (Oxoid).

2.2. Detección y aislamiento de *Salmonella* (ISO 6579:2002). A partir de 25 g del alimento, se realizaron homogeneizados en bolsa de Stomacher con 225 ml de agua de peptona tamponada, lo cual conforma un enriquecimiento no selectivo que nos permite la activación y revitalización de las posibles células de *Salmonella* dañadas por tratamientos industriales o de almacenamiento. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. A continuación, se llevó a cabo el enriquecimiento selectivo propiamente dicho, que nos sirve para favorecer el crecimiento de *Salmonella* en un ambiente que pueda contener gran número de bacterias distintas de ellas mismas, así como la reducción del posible

crecimiento de microorganismos competidores. Para ello se utilizaron dos caldos selectivos, *Rappaport-Vassiliadis Broth* con soja (RVS, Oxoid) y Tetratiónato de Müller-Kauffman (MKTTn, Oxoid). A partir del medio de enriquecimiento no selectivo se pipetearon 0,1 mililitros (ml) y 1 ml a 10 ml de los caldos RVS (Se incubaron a 42°C 24 horas) y MKTTn (Se incubaron 37°C 24 horas) respectivamente. El tercer paso fue la siembra en dos medios sólidos selectivos y diferenciales por agotamiento, *Xylose lysine deoxycholate agar* (XLD, Oxoid) y Agar Rambach (BioMérieux). Se incubaron ambos medios a 37°C durante 24 horas. Concluido el tiempo de incubación se observaron las colonias en ambos medios; en Agar XLD las presuntas de *Salmonella* se mostraron rojas-rosas con la posibilidad de tener el centro de color negro por la formación de ácido sulfhídrico (H₂S), mientras que en el Agar Rambach eran rosas. A continuación, se tomaron de cada placa, colonias de las consideradas típicas y se sembraron en ambos medios con incubación a 37°C durante 24 horas.

Para llevar a cabo una primera confirmación bioquímica se sembraron las colonias sospechosas de ser *Salmonella* en *Triple Sugar Iron Agar* (TSI, Oxoid) y en *Lysine Iron Agar* (LIA, Oxoid).

- *Triple Sugar Iron Agar* (TSI, Oxoid): Se empleó para detectar la fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa, con formación de ácido y gas, y también para detectar producción de ácido sulfhídrico. En este medio la concentración de glucosa es la décima parte de la concentración de la lactosa y la sacarosa, lo cual permite determinar cuándo éste es el único glúcido fermentado. La pequeña cantidad de ácido producido por la fermentación de la glucosa es rápidamente oxidado en la parte inclinada donde hay abundancia de oxígeno, quedando el color rojo correspondiente a un medio alcalino; por el contrario, en el fondo del tubo donde la tensión de oxígeno es baja, la reacción ácida se mantiene. Para que las reacciones antes indicadas ocurran, el medio tiene que estar en un tubo que permita un fácil acceso del aire, por lo que debe estar provisto de un tapón de algodón flojo.

La prueba se realizó sembrando una asada de colonias por estría en la parte inclinada y por picadura en la parte profunda. Se incubaron 18-24 horas a 37°C. Los resultados pueden mostrar lo siguiente:

- En profundidad
 - Amarillo: glucosa +.
 - Rojo o sin cambio: glucosa -.
 - Negro: formación de H₂S.
 - Burbujas: producción de gas.

- En la parte inclinada
 - Amarillo: lactosa y/o sacarosa +.
 - Rojo sin cambio: lactosa y/o sacarosa -.

Salmonella spp. es glucosa positiva y sacarosa y lactosa negativa.

- *Lysine Iron Agar* (LIA, Oxoid): Esta prueba pone de manifiesto si la bacteria posee la enzima lisina descarboxilasa (LDC). El medio contiene como indicador Purpura de Bromocresol. Cuando la lisina se descarboxila, el medio se acidifica y el indicador vira amarillo en el fondo. *Salmonella* spp. no es capaz de descarboxilar la lisina, por lo tanto el medio no se acidifica y no vira a amarillo.

2.3. Detección y aislamiento de *Yersinia*.

2.3.1. De muestras de alimentos. A partir de 25 g del alimento, se realizaron homogeneizados en bolsa de Stomacher con 225 ml de caldo de peptona, sorbitol y sales biliares (*Peptone Sorbitol Bile Broth*, Oxoid) y se incubaron durante 48 horas a 25 °C. A continuación, se transfirieron 0,5 ml de dicho medio a 4,5 ml de KOH 0,5% y NaCl 0,5% (permiten la reducción de la flora acompañante) y se agitó durante 3-4 segundos. Se sembraron en superficie en placas de Agar Cefsulodin Irgasan con Novobiocina (CIN, Oxoid) y se incubaron 24 horas a 30°C.

2.3.2. Muestras procedentes de pacientes de Hospital de León. Se enriquecieron las muestras recibidas en *Nutrient Broth* (Oxoid) durante 24 horas a 37°C y a continuación, se aislaron en el medio CIN descrito en el punto anterior siguiendo el mismo procedimiento.

2.4. Identificación de las cepas aisladas procedentes tanto de los alimentos como de las cepas clínicas.

De cada medio de aislamiento se escogieron varias colonias típicas para su posterior identificación mediante pruebas morfológicas y bioquímicas (Harrigan, 1998) y mediante el sistema miniaturizado de identificación API 20E (BioMérieux). Las pruebas llevadas a cabo para la identificación de *Salmonella* y para *Yersinia enterocolitica* fueron las siguientes:

- Tinción de Gram (Realizada como se describe en el capítulo de *Aeromonas*). *Salmonella* spp y *Yersinia enterocolitica* son Gram negativos.
- Oxidasa y catalasa (Realizada como se describe en el capítulo de *Aeromonas*). *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* son oxidasa negativa y catalasa positiva.
- Fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa, con formación de ácido y gas, y también para detectar producción de ácido sulfhídrico. Los resultados se obtuvieron a partir de las pruebas rápidas de identificación realizadas en TSI, descrita previamente. *Salmonella* spp. es glucosa positiva y sacarosa y lactosa negativa, mientras que *Yersinia enterocolitica* es glucosa y sacarosa positiva y lactosa negativa.
- Presencia de la enzima lisina descarboxilasa (LDC). Los resultados fueron los obtenidos mediante la realización de la prueba LIA, descrita previamente. *Salmonella* spp. no posee la enzima LDC, mientras que *Yersinia enterocolitica* sí.
- Reacciones de capacidad de fermentación y oxidación de carbohidratos (Oxidation-Fermentation Basal Medium, Difco). Realizada como se describe en el capítulo de *Aeromonas*.
- Desaminación de la fenilalanina (realizada para las cepas de *Salmonella* spp.). Determina la capacidad de la bacteria para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpirúvico por acción de la enzima fenilalanina desaminasa, esto va a producir una acidificación del medio, que se va a poner de manifiesto mediante la aplicación de 0,2 - 0,3 ml de Cloruro férrico al 10 %; si hay en el medio ácido fenilpirúvico aparece una coloración

verde-azulada. *Salmonella* spp. no posee dicha enzima y por lo tanto ofrece un resultado negativo.

- Citrato (realizada para las cepas de *Salmonella* spp.). Se usa para determinar si el organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y los compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno. El medio contiene citrato sódico, fosfato de amonio y azul de bromotimol como indicador; éste se tornará azul cuando el medio se basicifica. Las bacterias que metabolizan el citrato liberan iones amonio al medio (degradación del fosfato amónico) lo que provoca que éste se alcalinice y el indicador vire azul. La mayor parte de los serotipos del género *Salmonella* son citrato positivos aunque no lo son *S. Typhi* y *S. Paratyphi*.
- Pruebas del Rojo de metilo y de Voges-Proskauer (Realizadas para las cepas de *Salmonella* spp.): Las enterobacterias son anaerobios facultativos que usan la glucosa en dos fases: (1) degradan la glucosa por la vía oxidativa hasta que consumen el oxígeno del medio; (2) metabolizan la glucosa por la vía fermentativa, que puede ser de dos tipos:
 - ✓ Fermentación ácido mixta. Los productos finales son ácidos orgánicos, que disminuyen el pH del medio, lo que se manifiesta mediante el viraje del rojo de metilo. Una coloración roja, indicadora de la presencia de ácidos provenientes de la fermentación de la glucosa, constituye un resultado positivo, una coloración amarilla constituye una reacción negativa.
 - ✓ Fermentación butilén-glicólica. los productos finales, como butanodiol y etanol, son neutros y producen como intermediarios acetoína, que puede detectarse con el reactivo doble de Voges Proskauer. El reactivo A es KOH, y el B alfa-naftol, éstos reaccionan con la acetoína originando coloraciones violáceas.

Salmonella spp. es Rojo de Metilo positiva y Voges-Proskauer negativa.

- Indol (realizada para las cepas de *Salmonella* spp.). El microorganismo objeto de identificación se inoculó en *Tryptone Soya Broth* (TSB), que supone una rica fuente de triptófano. Las bacterias indol positivas como *Escherichia coli*, producen triptofanasa, una enzima que usa el triptófano

produciendo indol y otros productos. Para llevar a cabo esta prueba se utilizó el reactivo de Kovacs (dimetilaminobenzaldehído) que se añadió al caldo donde habíamos incubado nuestro microorganismo problema originando una coloración rosa-rojo oscuro en el caso de que la prueba sea positiva.

Salmonella spp. es indol negativa.

- Ureasa (realizada sobre las cepas de *Yersinia enterocolitica*). Se utilizó el medio Agar Urea de Christensen (Urea Agar Base, Oxoid). Algunas bacterias, como *Yersinia*, hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el rojo de fenol del amarillo al rojo.
- Prueba de movilidad (realizada sobre las cepas de *Yersinia enterocolitica*). Se utilizó el medio *Oxidation-Fermentation Basal Medium* (OF, Difco). Sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Este medio nos permitió la realización de esta prueba gracias a ser semisólido. En estas condiciones, las bacterias móviles producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Por el contrario, las bacterias inmóviles permanecerán en la misma línea de la picadura en que se sembraron. Se incubaron dos tubos por cada cepa, uno a 25°C y otro a 37°C, que son las temperaturas a las que *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* son móviles e inmóviles, respectivamente.
- API 20E (BioMérieux): Es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram -, que en este caso se realiza de la misma forma que la descrita en el capítulo de *Aeromonas*. Cuando se analizaron los resultados se encontraron pruebas con resultados contradictorios que no permitían adscribir las cepas al género *Salmonella* y *Yersinia* respectivamente. En estos casos, se realizaron las pruebas bioquímicas de manera independiente para poder contrastar los resultados obtenidos con el API20E.

2.5. Búsqueda de los principales genes marcadores de virulencia en las cepas de *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica*.

2.5.1. Extracción del ADN (realizada como se describe en el capítulo de *Aeromonas*).

2.5.2. Determinación del gen *invA* en las cepas de *Salmonella* spp. y del gen *yst* en las cepas de *Yersinia enterocolitica*. Utilizando métodos basados en la técnica de PCR se investigó, en las cepas previamente identificadas, la presencia del gen *invA* asociado a la patogenicidad en *Salmonella* (Rahn et al., 1992) y del gen que codifica para la enterotoxina termoestable de *Yersinia enterocolitica* (Yst) (Ibrahim et al., 1992).

Se llevó a cabo la reacción en volúmenes finales de 50 µl por muestra que contenían:

- 20 µl Master Mix (5PRIME, VWR International Eurolab S.L. Barcelona, España).
- 1 µl cebador 1 (a una concentración de 250 nM). (XX Integrated DNA Technologies Inc).
- 1 µl cebador 2 (a una concentración de 250 nM). (XX Integrated DNA Technologies Inc).
- 23 µl agua destilada miliQ.
- 5 µl de la solución de ADN bacteriano.

Una vez preparada la mezcla de reacción se introdujo en el termociclador (Mastercycler Eppendorf-Netheler-Hinz) para realizar la amplificación. El paso más importante es el anclaje de los cebadores que se produce a una temperatura concreta reflejada en la Tabla 1 para el gen *invA* y el gen *yst*, así como el resto de condiciones de la reacción.

Tabla 1. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en la PCR para la detección del gen *invA* en cepas de *Salmonella* (Rahn et al. 1992) y la detección del gen *yst* en cepas de *Yersinia enterocolitica* (Ibrahim et al., 1992).

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	Unión al cebador (°C)	Tamaño del amplificado (pb)	Referencias
<i>invA1</i> <i>invA2</i>	TAT CGC CAC GTT CGG GCA A TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	55°C	275	Rahn et al. 1992
<i>yst1</i> <i>yst2</i>	CTG TCT TCA TTT GGA GCA TTC GCA ACA TAC ATC GCA GCA ATC	60°C	163 pb	Ibrahim et al., 1992

Aparte de las muestras de ADN sospechosas de poseer dichos genes de virulencia, se utilizaron tres controles:

- Control positivo. Bacteria previamente identificada poseedora de los genes de virulencia buscados. En el caso de *Salmonella* spp., se utilizó una cepa de colección CECT4156 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, serotipo Abony. Por otra parte, en el caso de *Yersinia*, utilizamos la cepa CECT4315 de *Yersinia enterocolitica*.
- Control negativo. Bacteria previamente identificada que no posee los genes que buscamos y sirve para comprobar la especificidad de la reacción. En este caso, se utilizó la cepa de colección CECT4315 de *Yersinia enterocolitica* y la cepa de colección *E. coli* CECT4076, para *Salmonella* spp. y *Yersinia* respectivamente.
- Blanco de reacción. Se sustituyó la muestra de ADN por agua destilada miliQ realizando el protocolo de la forma habitual. De este modo, se pretendía comprobar que no se producía contaminación con material genético durante la preparación y el desarrollo de la reacción.

La realización de la electroforesis y el registro de resultados se llevaron a cabo con el procedimiento ya descrito en el capítulo de *Aeromonas*.

2.6. Evaluación de la similitud genética entre las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de los productos alimenticios y de casos de gastroenteritis diagnosticados en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos:

Se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), descrita en el capítulo de *Aeromonas* y cuyo protocolo se encuentra desarrollado en la página de <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>. El protocolo fue descrito en el capítulo de *Aeromonas* y las excepciones al mismo se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de las condiciones de trabajo de la técnica PFGE realizada en las cepas de *Salmonella* spp. aisladas tanto en muestras de alimentos como en muestras de pacientes del Hospital de León

<i>Initial Switch Time</i>	2,2 s
<i>Final Switch Time</i>	63,8 s
Voltaje	6
<i>Included Angle</i>	120°
<i>Run Time</i>	19 horas

Del mismo modo que en el caso de *Aeromonas*, se analizaron los resultados con el software Gel Compar II (Versión 6.5; Applied Maths), que nos ofrece la posibilidad de agrupar las cepas en un dendrograma utilizando el coeficiente de Dice y el procedimiento de agrupación UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages. Sneath et al., 1973).

2.7. Pruebas de resistencia a antimicrobianos para las cepas de *Salmonella* spp.

Se utilizó el método de referencia establecido por el “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) en el año 2005 mediante discos de difusión de cantidades conocidas de antimicrobianos. En el caso *Salmonella* spp., el antibiograma se llevó a cabo estudiando la susceptibilidad de las cepas sobre quince antimicrobianos cuyo nombre y concentración se recoge en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de la batería de antimicrobianos utilizados en el análisis de posibles resistencias de cepas de *Salmonella*.

Antimicrobiano	Abreviatura	Concentración (por disco en µg)
Ampicilina	AMP	10
Amoxicilina + Ácido clavulánico	AMC	30
Cefalotina	CEF	10
Cefepima	PEP	30
Tetraciclina	TE	30
Gentamicina	CN	10
Kanamicina	K	30
Compuestos sulfonamidas	S3	300
Cefoxitina	FOX	30
Ciprofloxacino	CIP	5
Cloranfenicol	C	30
Cefotaxima	CTX	30
Trimetoprima-sulfametoxazol	STX	25
Piperaciclina	PIP	100
Ceptacidina	CAZ	30
Ácido nalidíxico	NA	30
Estreptomina	S	10

Los antimicrobianos fueron suministrados por BioRad en formatos de 200 discos (4x50) por antibiótico.

Para llevar a cabo el antibiograma, se llevó a cabo el protocolo según se ha descrito en el capítulo correspondiente a *Aeromonas*, a excepción de que la incubación fue a 37°C.

Para evaluar la posible resistencia o sensibilidad de cada cepa a cada antibiótico se utilizaron los límites establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* para enterobacterias, que se presentan en la tabla 2A de Winkler et al, (2005), y se reproducen en la tabla 4 que se muestra a continuación.

Tabla 4. Criterios para evaluar el carácter de resistencia a antimicrobianos para enterobacterias establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Wikler et al., 2005)

Antimicrobiano	Resistente*	Intermedio*	Sensible*
Ampicilina	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicilina + Ácido clavulánico	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefalotina	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefepima	≤ 14	15-17	≥ 18
Ácido nalidíxico	≤ 13	14-18	≥ 19
Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamicina	≤ 13	14-17	≥ 18
Compuestos sulfonamidas	≤ 12	13-16	≥ 17
Cefoxitina	≤ 14	15-17	≥ 18
Estreptomicina	≤ 11	12-14	≥ 15
Ciprofloxacino	≤ 15	16-20	≥ 21
Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
Cefotaxima	≤ 14	15-22	≥ 23
Trimetoprima-sulfametoxazol	≤ 10	11-15	≥ 16
Piperaciclina	≤ 17	18-20	≥ 21
Ceftacidina	≤ 14	15-17	≥ 18

*Diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. *Salmonella*.

3.1.1. Aislamiento e identificación de *Salmonella*.

Sobre un total de 336 muestras de carnes y productos cárnicos, se aislaron 11 cepas de presuntas *Salmonella* y sobre 18 muestras de pacientes diagnosticados de gastroenteritis en el Hospital de León, 18 cepas de *Salmonella*.

Mediante el sistema API 20E, tres de las once cepas presuntas *Salmonella* procedentes de carnes y productos cárnicos se adscribieron al género *Salmonella*, mientras que las otras ocho mostraban un perfil que la base de datos del sistema API 20E calificaba como “inaceptable” a los efectos de la identificación. Sin embargo, la realización de algunas pruebas incluidas en el sistema API 20E por procedimientos convencionales, es decir, no miniaturizados, proporcionó resultados diferentes a los alcanzados con las galerías API 20E. Introducidos los resultados de dichas pruebas realizadas por procedimientos convencionales en el sistema de identificación ApiWeb™ (Biomeriéux), se obtuvieron los siguientes resultados: cuatro de las cepas tenían un perfil correspondiente a *Salmonella* spp., cuatro a *S. Pullorum* y tres a *S.choleraesuis* ssp. *arizonae*.

En cuanto al perfil que obtuvimos al inocular galerías API20E con las cepas de origen clínico, el resultado fue uniforme, incluyéndolas con un 99% de fiabilidad en *Salmonella* spp.

Tanto las once cepas aisladas de alimentos como las dieciocho procedentes de casos clínicos presentaban el perfil característico del género *Salmonella* que se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Perfil de las cepas de *Salmonella* aisladas

Prueba	Gram	Oxidasa	Catalasa	Glucosa	Sacarosa	Lactosa	H ₂ S	LIA	Citrato	Indol	Desaminación de la fenilalanina	RM	VP
Resultado	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-

Sobre el total de cepas aisladas, 11 procedentes de alimentos y 18 procedentes de pacientes del hospital, se llevó a cabo una PCR para investigar la presencia del gen que codifica para la invasina, proteína que, entre otras, interacciona directamente con los sistemas de señalización celulares forzando la entrada del patógeno. La totalidad de cepas presentó dicho gen.

Las cepas clínicas fueron serotipadas en el Centro Nacional de Microbiología en el Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) y los resultados de dicha prueba se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Serotipos de *Salmonella* en casos de gastroenteritis diagnosticados en el Complejo Hospitalario de León

Serotipo	Nº de cepas	Código de identificación*
<i>Salmonella</i> Enteritidis	4	MHS1, MHS9, MHS10 y MHS15
<i>Salmonella</i> Thyphimurium	11	MHS3, MHS4, MHS5, MHS7, MHS8, MHS12, MHS13, MHS14, MHS16, MHS17 y MHS18
<i>Salmonella</i> Poona	2	MHS2 y MHS6
<i>Salmonella</i> grupo C	1	MHS11

*Muestras Hospital *Salmonella* y el número asignado por orden de llegada.

3.1.2. Incidencia de *Salmonella* en carnes y productos cárnicos listos para el consumo.

Sobre un total de 336 muestras estudiadas, se encontraron 11 (3,27%) muestras contaminadas con *Salmonella* spp.

En la Tabla 7 se presenta la distribución de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas en función del producto alimenticio del que fueron aisladas y del periodo del año en que se tomaron las muestras.

Tabla 7. Prevalencia de *Salmonella* spp. en carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo

Producto (n=n° muestras)	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
Jamón cocido (n=48)	1*	0	0	0
Pechuga cocida de pavo (n=48)	0	0	0	0
Mortadela (n=48)	0	0	2	0
Chorizo (n=48)	0	1	2	0
Salchichón (n=48)	1	0	0	0
Pechuga de pollo (n=48)	0	1	0	0
Lomo fresco de cerdo (n=48)	1	2	0	0

*De cada muestra se aisló una única cepa de *Salmonella*.

Salvo en el otoño, en el resto de estaciones la prevalencia de *Salmonella* fue similar.

Los datos de prevalencia de *Salmonella* spp. en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo son variables a lo largo de los últimos años. En cuanto a la carne fresca procedente de pollo, la prevalencia de *Salmonella* oscila en porcentajes entre 20 y 37% según lo recogido por varios autores desde 1993 y 2002 (Uyttendaele et al., 1998 y 1999; Duffy et al., 1999; Domínguez et al., 2002). Sin embargo, Jordan et al., en el año 2006 recoge que los porcentajes de aislamiento de *Salmonella* spp. en carnes frescas de pollo y de cerdo alcanzaban valores de 2,8 y 2,1%, respectivamente. Además, indica que durante los años 2002 y 2004 no se aprecia una variación estacional en cuanto al aislamiento de *Salmonella* de dichos productos (Jordan et al., 2006). En el periodo que va desde el año 2008 al 2010 se registró una importante implicación de los alimentos de origen cárnico en dichas infecciones por *Salmonella* (EFSA, 2012b). Los datos se reflejan en la tabla 8.

Tabla 8. Carnes y productos cárnicos involucrados en los casos de infección de origen alimentario por *Salmonella* en la UE y en España durante el año 2010 (EFSA, 2012a)

Alimento	Datos de prevalencia (%)	
	Unión Europea	España
Carne de pollo	4,8	16
Carne de pavo	9	0
Carne de cerdo	0,9	26,7

Por otra parte, en lo que se refiere a productos cárnicos listos para el consumo, Cabedo et al., en el año 2008 indicó que la prevalencia de *Salmonella* spp. en jamón cocido y en embutidos curados ascendía a 2% y 11,12%, respectivamente (Cabedo et al., 2008).

El informe anual de la EFSA sobre zoonosis y brotes de origen alimenticio en la Unión Europea (UE) en 2010 muestra que los casos de infección por *Salmonella* en el año 2009 fueron 108618, mientras que en 2010 fueron 99020 casos de salmonelosis en humanos. Esto reafirma el descenso en el número de casos anuales de infección por *Salmonella* que se lleva observando desde el año 2006 (EFSA, 2012a y b). Este descenso se atribuye a los exitosos programas de control de *Salmonella* en aves de corral, entre otros.

Los serotipos más prevalentes en el año 2010 fueron *Salmonella* Enteritidis con un porcentaje del 45% y *Salmonella* Typhimurium con un 22,4% (EFSA, 2012a).

Particularmente en España, el número de casos de *Salmonella* también ha sufrido un descenso estadísticamente significativo desde el año 2006 hasta el 2010, con 5117 y 4420 casos confirmados respectivamente (EFSA, 2012a).

Para proteger a los consumidores del riesgo que puede producir la infección por *Salmonella*, la UE ha adoptado un enfoque integrado de la seguridad alimentaria, que consiste en la evaluación de riesgos y las medidas de gestión de los mismos. La EFSA desempeña la prestación de apoyo y asesoramiento científico independiente sobre la salud humana y los alimentos los aspectos relacionados con la seguridad a través de la recolección y análisis de datos sobre la prevalencia de *Salmonella* en los animales y los alimentos, así como mediante la evaluación de la inocuidad de los alimentos, los riesgos planteados por la bacteria para la salud humana y el asesoramiento sobre el posible control y las opciones de mitigación. La coordinación de los países miembros de la UE sobre las enfermedades zoonóticas, mediante la creación de Programas Nacionales de Control (PNC), ha ayudado a reducir los casos humanos de salmonelosis en casi la mitad en cinco años (2004-2009). En 2003, la UE estableció un programa de control extendido de las zoonosis (Reglamento (CE) nº 2160/2003), en el que se incluye un programa de control de *Salmonella* en aves de corral y en cerdos (EFSA, 2010 y 2011).

En el informe de síntesis, el ECDC y la EFSA proporcionan actualizaciones anuales sobre los progresos realizados en el cumplimiento de los objetivos de reducción de *Salmonella*. Estos informes analizan los datos de la vigilancia de *Salmonella* en los animales, los alimentos y los seres humanos recogidos por los Estados miembros. Entre 2005 y 2009, los informes indican una clara tendencia a la baja de *Salmonella* en lo que respecta a los casos humanos, los brotes humanos y su prevalencia en las aves de corral (EFSA, 2010 y 2012a).

3.1.3. Resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas de *Salmonella* spp.

En el caso concreto de *Salmonella* spp., según el CLSI las muestras fecales deben ser probados con ampicilina, una quinolona y trimetoprima-sulfometoxazol y para muestras extraintestinales además de los anteriores, cloranfenicol y una cefalosporina de tercera generación. Además, cabe destacar que el CLSI advierte que tanto las cefalosporinas (I, II, III y IV) como los aminoglicósidos pueden actuar sobre *Salmonella* spp. *in vitro* pero que no son efectivos clínicamente, por lo tanto, los resultados no proporcionan conclusiones fiables a estos efectos (Winkler et al., 2005).

En la tabla 9 se presenta a frecuencia de resistencia a los distintos antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* en función de su origen (alimenticio o clínico).

Tabla 9. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* procedentes de alimentos y casos clínicos.

Antimicrobiano	Alimentos y agua			Casos clínicos		
	R*	I*	S*	R*	I*	S*
Ampicilina	27,28	0	72,72	66,67	0	33,33
Amoxicilina + Ácido clavulánico	100	0	0	5,56	0	94,44
Cefalotina	100	0	0	22,23	0	77,77
Cefepima	0	0	100	0	0	100
Cefoxitina	0	0	100	27,78	0	72,72
Piperaciclina	100	0	0	72,23	0	27,77
Ceptacidina	0	0	100	11,12	0	88,88
Ácido nalidíxico	0	0	100	5,56	0	94,44
Tetraciclina	18,18	0	81,82	66,67	0	33,33
Gentamicina	0	0	100	22,23	0	77,77
Kanamicina	0	0	100	44,45	0	55,55
Compuestos sulfonamidas	9,09	0	90,91	55,56	0	44,44
Estreptomina	100	0	0	94,45	0	5,55
Ciprofloxacino	0	0	100	11,12	0	88,88
Cloranfenicol	0	0	100	33,34	0	66,66
Cefotaxima	0	0	100	11,12	0	88,88
Trimetoprima-sulfametoxazol	0	0	100	22,23	0	77,77

*Porcentaje de cepas R=Resistente, I=Intermedia y S=Sensible.

Los porcentajes de resistencia varían en función del origen de las cepas ya que las clínicas muestran resistencia a más antimicrobianos que las cepas de origen alimenticio, siendo la coincidencia mayoritaria la resistencia a Estreptomina (tabla 9). Todas las cepas de origen cárnico fueron resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico, cefalotina, piperacilina y estreptomina. En el caso de la cefalotina todas las cepas de origen alimenticio fueron resistentes mientras que únicamente 4 cepas clínicas lo fueron (22,23%). Sin embargo, las resistencias a ampicilina, tetraciclina y sulfonamidas fueron superiores en las cepas clínicas que en las de origen alimentario.

La mayor frecuencia de resistencia a antimicrobianos en las cepas de origen clínico se se mostró en estreptomina (94,45%, tabla 8), piperacilina (72,23%), ampicilina (66,67%) y tetraciclina (66,67%) y también es relevante para sulfonamidas (55,56%) y kanamicina (44,45%).

La mayor susceptibilidad fue mostrada ante cefepima con la totalidad de las cepas sensibles (tabla 9), seguido por el ácido nalidíxico.

La evaluación de los perfiles de resistencia a los 17 antimicrobianos antes descritos de todas las cepas de *Salmonella* nos mostró una gran variedad de perfiles caracterizados por los altos porcentajes de cepas resistentes a estreptomicina (96,55%) y piperaciclina (82,75%), seguidos de cerca por cefalotina (51,72%), ampicilina (51,72%), tetraciclina (48,27%) y sulfamidas (37,93%).

En las cepas procedentes de carnes y productos cárnicos el perfil mayoritario de resistencia a antimicrobianos fue común para ocho de las once cepas aisladas (72,73%), mientras que en las cepas clínicas encontramos una gran variedad de perfiles. Cabe destacar el compartido por dos cepas serotipificadas como *Salmonella* Typhimurium. En la tabla 10 se recogen ambos perfiles y el número de cepas que los comparten.

Tabla 10. Perfiles mayoritarios de resistencia a antimicrobianos mostrados por las cepas aisladas de *Salmonella* en función de su origen

Origen	Compuestos Antimicrobianos																Nº cepas	
	AMP*	CEF	FOX	PEP	STX	TE	AMC	CIP	CTX	CN	K	C	PIP	CAZ	S3	S		NA
Alimentos	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	8 (72,73%)
Clínicas	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	2 (11,12%)

*Abreviaturas de la nomenclatura de los antimicrobianos utilizados en las pruebas de susceptibilidad recogidas en la tabla 3.

La resistencia de *Salmonella* a antimicrobianos fue descrita por primera vez en 1960 (Montville et al., 2008) y desde entonces el aislamiento de cepas resistentes a uno o más antimicrobianos ha ido aumentando (Pui et al., 2011). Este aumento se asocia al uso abusivo e indiscriminado de los mismos en animales destinados al consumo humano así como la facilidad para conseguirlos en muchos países (Yoke-Kqueen et al., 2008). Como se comentó anteriormente, la salmonelosis no tifoidea suele ser autolimitada quedando confinado al tracto gastrointestinal, por lo que la terapia con antimicrobianos no está indicada. Sin embargo, en individuos inmunodeprimidos o niños resulta vital disponer de un tratamiento eficaz. Además la diversidad bacteriana en el tracto gastrointestinal es muy alta y *Salmonella* puede mediar la transferencia

horizontal de determinantes de resistencia a la microbiota normal que pueden llegar a actuar como patógenos oportunistas y/o permitir la propagación de resistencias en otros patógenos que interaccionen con ella (Martínez Álvarez, N., 2007).

En los últimos años se refleja una tendencia a un aumento en la resistencia de las cepas de *Salmonella* aisladas al ácido nalidíxico que además supone una disminución en la susceptibilidad al ciprofloxacino (fluoroquinona de elección para el tratamiento de salmonelosis no tifoideas) (Hur et al., 2012), lo cual no ocurre en nuestras cepas ya que únicamente una cepa clínica es resistente al ácido nalidíxico y dos al ciprofloxacino, y esto puede ser explicado porque existe una baja prevalencia de dicha resistencia en cepas aisladas de animales destinados a consumo humano (FDA, 2010).

La Unión Europea ha iniciado acciones para la eliminación del uso de antimicrobianos como sustancias promotoras del crecimiento en industrias de ganado (Reglamento 1831/2003; García-Feliz et al., 2008), con el propósito de disminuir la aparición de nuevas resistencias, ya que la adquisición de la resistencia a un antibiótico de una bacteria en un alimento de origen cárnico implica que el animal del que procede dicha carne ha sido tratada en algún momento con ese antibiótico. La nueva legislación promueve programas de monitorización y vigilancia de nuevas resistencias a antimicrobianos en patógenos zoonóticos y animales en todos los países de la Unión Europea (García-Feliz et al., 2008).

El informe de la Unión Europea sobre la resistencia antimicrobiana en bacterias zoonóticas e indicador de seres humanos, animales y alimentos en 2010 nos indicó que las mayores resistencias a compuestos antimicrobianos mostradas por las cepas de *Salmonella* investigadas (un 25,9% de los casos de salmonelosis humana confirmados en 2010) se correspondieron con tetraciclina (28,4%), ampicilina (28%), sulfonamidas (25,4%) y estreptomycinina (19%). En el serotipo Enteritidis los niveles de resistencia al ciprofloxacino y al ácido nalidíxico fueron 9,3 y 18,7%, respectivamente. Lo cual es relevante, desde el punto de vista de que el ciprofloxacino es la quinolona de referencia a usar para este tipo de infecciones. La segunda opción como tratamiento es el uso de cefotaxima, cuyo porcentaje de cepas resistentes fue mucho menor (0,4%). En la tabla 11 se muestra un resumen de los porcentajes de cepas resistentes a cada antimicrobiano en función de su origen (EFSA, 2012c).

Tabla 11. Porcentaje de cepas resistentes a antimicrobianos en función de su origen.

Antimicrobiano	Porcentaje de resistencia en función del origen de las muestras		
	Carne de pollo	Carne de pavo	Carne de cerdo
Ampicilina	21	51	47
Tetraciclina	20	7	50
Sulfonamidas	27	64	52
Ácido nalidíxico	24	25	4
Ciprofloxacino	24	28	5
Cefotaxima	0	0,3	0,2
Gentamicina	2	2	2
Cloranfenicol	3	7	19

Las cepas que fueron aisladas de muestras de carne de cerdo fresca fueron 100% resistentes a cefalotina, amoxicilina clavulánico, piperaciclina y estreptomycin, mientras que únicamente el 66,7% son resistentes a ampicilina y el 33,4% a tetraciclinas.

Por otra parte, en la única cepa aislada de una muestra de pechuga de pollo las resistencias confirmadas fueron a Cefalotina, amoxicilina clavulánico, piperaciclina y estreptomycin.

Cabe destacar la emergencia de una cepa de *S. Typhimurium* DT104 multirresistente, aislada por primera vez en 1984 en Reino Unido, constituye un problema serio para la salud pública (Montville et al., 2008). Desde su aislamiento han sido descubiertas varias cepas multirresistentes de varios serotipos (Zhao et al., 2008) cuya importancia radica en que la mayoría de las infecciones se producen por el consumo de alimentos de origen animal contaminados (Crump et al., 2010). El perfil de *S. Typhimurium* DT104 incluye resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfometazol y tetraciclina, y pueden adquirir resistencia adicional a fluoroquinonas y cefalosporinas (Hsueh et al., 2004; Weill et al., 2006; Winokur et al., 2000).

La cepa de origen clínico denominada MHS18 fue serotipada como *Salmonella* Typhimurium y comparte el perfil de resistencia a compuestos antimicrobianos con la cepa multirresistente *S. Typhimurium* DT104, pero no podemos confirmarlo ya que no se llevó a cabo su fagotipificación.

En el año 2005 se publicaron una serie de artículos en Reino Unido divulgando que un brote que tuvo lugar en enero del 2005 de *Salmonella* Typhimurium DT104, estaba ligado a la importación de verduras españolas. La Agencia Alimentaria Británica

confirmó que el origen de dicha cepa proviene de la lechuga iceberg de la región de Murcia. Asimismo, se notificó que la semana anterior a dicho brote las autoridades finlandesas emitieron una alerta al resto de países de la UE después de que el mismo tipo de salmonelosis apareciera en mayo en el oeste y sur del país. Una vez más, el brote se localizó en este tipo de lechuga importada de España.

Las bacterias del género *Salmonella* son capaces de eludir la acción de los antimicrobianos mediante uno de estos cuatro mecanismos:

- Presencia de enzimas específicos que modifiquen o inactiven el antibiótico antes o después de penetrar en la bacteria como por ejemplo β -lactamasas, enzimas modificadores de aminoglicósidos y enzimas modificadores de fenicoles (Michael et al., 2006).
- Modificación de la membrana celular disminuyendo su permeabilidad ante los agentes antimicrobianos.
- Expulsión activa de antimicrobianos fuera de la bacteria mediante bombas de expulsión de tetraciclinas (Michael et al., 2006) y de fenicoles (Meunier et al., 2002 y 2003).
- Síntesis de una molécula alternativa o modificación de la diana celular como por ejemplo la resistencia a trimetoprima codificada por 13 genes descritos ampliamente para los serotipos Enteritidis y Typhimurium entre otros (Rodríguez et al., 2006 a,b; Daly et al., 2005; Randall et al., 2004). Otro ejemplo son los genes que codifican para la resistencia a sulfonamidas y a quinolonas y fluoroquinonas. Estas últimas pueden ser especialmente importantes ya que una mutación puntual en el gen que codifica para la subunidad A de la DNA girasa, que es la diana primaria para la acción de las quinolonas, puede suponer un aumento en los perfiles de resistencia de las cepas ante el ciprofloxacino, el cual es la fluoroquinona de elección en el tratamiento de infecciones causadas por *S. enterica* (Michael et al., 2006).

Cabe destacar el caso de las cepas clínicas MHS13 y MHS14, que proceden del mismo paciente aisladas en semanas consecutivas, que comparten perfil bioquímico y genético así como serotipo pero nos ofrecen un perfil en PFGE distinto, compartiendo 11 bandas y diferenciándose en 5, y que además muestran un perfil de resistencia a antimicrobianos diferente, compartiendo la resistencia a tetraciclina, sulfonamidas,

ampicilina, piperacilina y estreptomina, pero la cepa MHS14 además, es resistente a kanamicina y cefotaxima. Esta resistencia podemos presuponer que ha sido adquirida por la existencia de presiones ambientales diferentes y sobre todo por la existencia de elementos genéticos móviles que pueden ser transferidos entre bacterias confiriendo características nuevas o bien la pérdida de las mismas. Los genes de resistencia pueden estar en las bacterias originarias y su descendencia o diseminarse de forma horizontal entre bacterias más o menos relacionadas, mediante los anteriormente nombrados, elementos genéticos móviles. En *Salmonella* cabe destacar los siguientes (i) plásmidos (Liebert et al., 1999), (ii) transposones (Kleckner et al., 1981), (iii) integrones (Guerra et al., 2000^a; Carattoli et al., 2001; Rodríguez et al., 2006 a, b), (iv) isla genómica 1 que constituye el ejemplo más representativo de isla de resistencia cromosómica descrita en *S. enterica* (Mulvey et al., 2006).

La presencia de dichos elementos permite explicar también la diferencia entre los perfiles de resistencia de las cepas clínicas MHS3, MHS4 y MHS5, que fueron aisladas el mismo día y comparten perfil bioquímico, genético, PFGE y serotipo. Las cepas aisladas pertenecen a un niño de 2 años de edad, un niño de 4 años y un adulto, respectivamente. La existencia de tres cepas idénticas aisladas en la misma fecha podría explicarse en base a la posible existencia de una relación entre pacientes, tal como lazo familiar o bien coincidencia en restauración colectiva pero no conocemos más datos acerca de ellos, salvo que el único paciente que ingresó en el hospital fue el niño de dos años de edad.

3.1.4. Evaluación de la similitud genética entre las cepas aisladas de los productos alimenticios sobre los que se realiza el estudio y las aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.

La técnica elegida para llevar a cabo dicho objetivo fue, al igual que en el caso de *Aeromonas*, la electroforesis en campo pulsado (PFGE), técnica que supone un alto poder de discriminación de las cepas aisladas, tras la restricción enzimática con *XbaI* de su genoma. La enzima elegida, así como el procedimiento a seguir fue descrito en el capítulo de *Aeromonas* con pequeñas modificaciones recogidas en “Material y métodos” del capítulo que nos ocupa. El resultado de la técnica fue analizado con el Software Gel

Comprar II (Versión 6.5.; Applied Maths) lo cual nos permitió crear un dendrograma (figura 2) en el cual se muestra la agrupación de las cepas analizadas en función de la similitud de patrones de bandas.

Los resultados nos muestran dos grupos claramente diferenciados y con porcentaje de similitud muy bajo entre ellos según el coeficiente de Dice (28,8%). Uno de estos grupos (Grupo II, figura 2) incluye a la mayor parte de las cepas procedentes de alimentos, todas ellas de origen porcino (mortadela, chorizo, salchichón y lomo de cerdo) aisladas en diferentes épocas del año (tabla 6). El otro grupo (Grupo I, figura 2) está compuesto por todas las cepas de origen clínico y cuatro cepas procedentes de muestras de alimentos tanto de pechuga de pollo como de productos de origen porcino también aisladas en varias épocas del año. Dentro de este grupo I, tenemos 6 subgrupos seleccionando su porcentaje de similitud en la cifra de 80%, compuestos por dos o más cepas (figura 2).

Todos estos subgrupos excepto uno están formados por cepas con el mismo origen, 4 de ellos por cepas clínicas y el otro constituido por dos cepas aisladas una de pechuga de pollo y la otra de mortadela que se parecen en un 90,9% (figura 2). El subgrupo heterogéneo integrante del grupo I está compuesto por una cepa de origen clínico serotificada como *Salmonella* Typhimurium y una cepa aislada de chorizo, que se parecen en un 82,4%.

Cabe destacar que en el grupo I, las cepas clínicas serotipadas como *Salmonella* Typhimurium se agrupaban un porcentaje de similitud de aproximadamente un 56% y junto con ellas se incluyen cuatro de las cepas de origen alimenticio, siendo la denominada MAS25 (aislada de chorizo) similar en un 84,2% a la cepa clínica MHS14, es decir, se diferencian únicamente en dos bandas (figura 2). Ambas se parecen a las cepas de origen alimenticio denominadas MAS12 (aislada de jamón cocido) y MAS23 (aislada de mortadela) en un 70,3%. Estas cuatro cepas a su vez se parecen en un 57,1% a la cepa clínica MHS13 y a la cepa procedente de jamón cocido MAS6 que, a su vez se parecen entre sí en un porcentaje del 66,7%, es decir, se diferencian únicamente en tres bandas.

El resto de serotipos (Enteritidis y Poona) incluidos en el grupo I se parecen entre sí en un porcentaje del 70% y dentro de ellos, la cepa clínica serotificada como *Salmonella* Enteritidis denominada MHS10 y la cepa de origen clínico *Salmonella*

Poona MHS6 se asemejan en un 94,7%, mientras que las cepas clínicas de *Salmonella* Enteritidis, denominadas MHS1 y MHS9, son similares en un 85,7% (figura 2).

Hay que tener en cuenta que la importancia del número de bandas diferentes a la hora de establecer la semejanza entre dos cepas depende del coeficiente de semejanza empleado para crear el dendrograma. En nuestro caso, usamos el “Coeficiente de Dice” en el que la similitud se valora de forma doble en las coincidencias, por ello a mayor número de bandas, mayor será la posibilidad de similitudes entre cepas (Sneath et al., 1973).

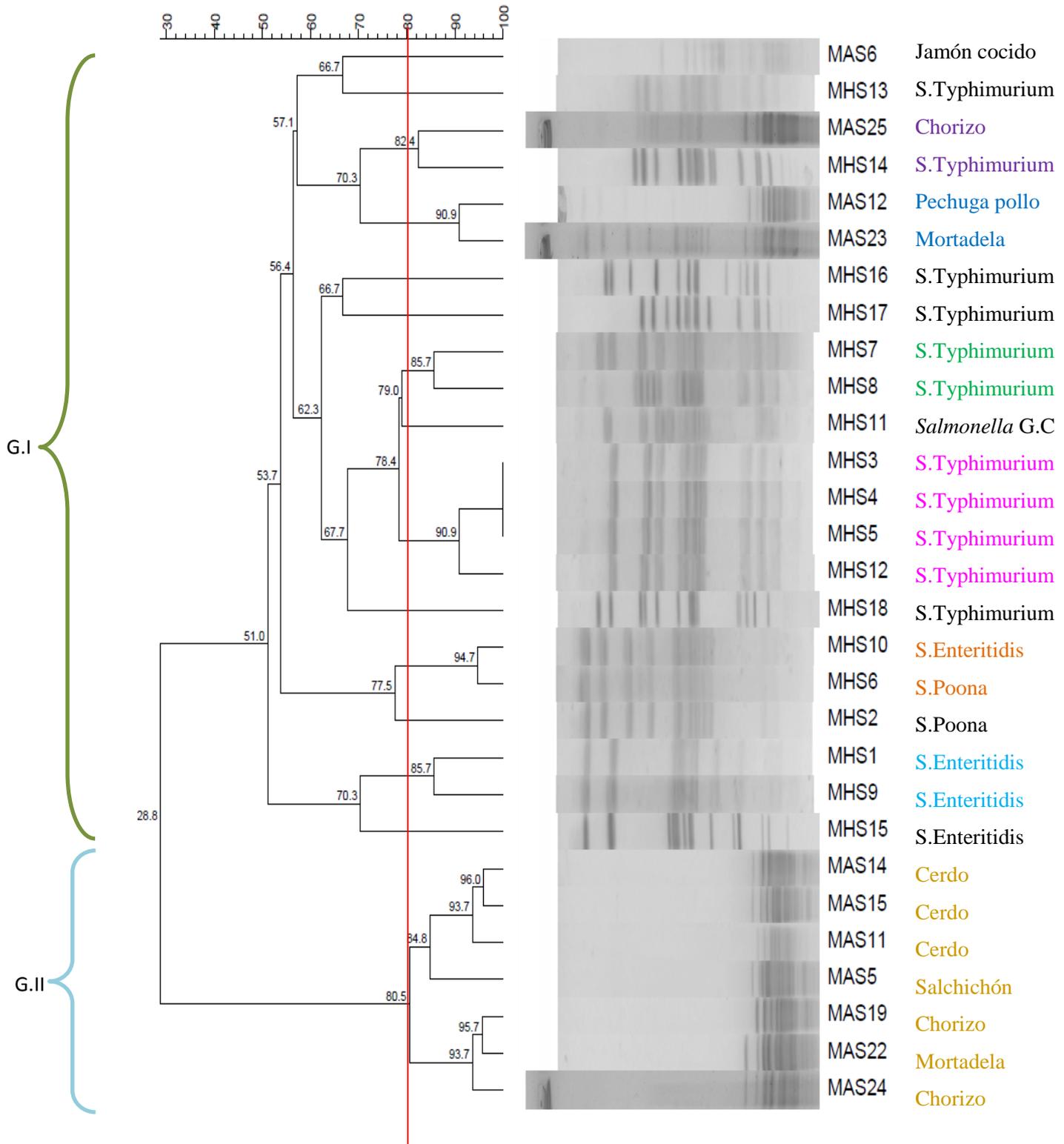


Figura 2. Dendrograma resultado de la realización de la técnica de PFGE sobre las cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos (MAS) y de origen clínico (MHS).

3.2. *Yersinia*.

3.2.1. Incidencia de *Yersinia enterocolitica*.

3.2.1.1. Procedentes de muestras de alimentos

Sobre un total de 336 muestras estudiadas, se encontraron 70 (20,83%) muestras sospechosas de contener *Yersinia enterocolitica*. De dichas muestras se aislaron 70 presuntas *Yersinia*. En la Tabla 12 se presenta la distribución de las cepas presuntas *Yersinia enterocolitica* aisladas en función del producto alimenticio y del periodo del año en que se tomaron las muestras. Existe una distribución bastante uniforme acerca de la época del año y del producto del que procede cada cepa.

Tabla 12. Prevalencia de presuntas *Yersinia enterocolitica* en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo.

Producto (n=n° muestras)	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
Jamón cocido (n=48)	3*	7 (1**)	2	2
Pechuga cocida de pavo (n=48)	5 (2**)	2 (1**)	3	1
Mortadela (n=48)	1	2	0	0
Chorizo (n=48)	2	2	2	2
Salchichón (n=48)	2 (1**)	3	4	0
Pechuga de pollo (n=48)	4 (2**)	6 (5**)	2	1
Lomo fresco de cerdo (n=48)	4 (1**)	5 (5**)	1	2

* De cada muestra se aisló una única cepa de *Yersinia*.

** Cepas confirmadas fenotípicamente como *Yersinia enterocolitica*.

3.2.1.2. Procedentes de pacientes del Hospital de León.

De cada una de las 295 muestras de pacientes del Hospital se aisló una cepa con morfología característica de *Yersinia*.

3.2.2. Identificación de cepas aisladas.

3.2.2.1. Cepas procedentes de muestras de alimentos.

Sólo 18 de las 70 cepas aisladas comparten perfil fenotípico con la cepa que se utilizó de referencia (CECT4315), cuyas características bioquímicas se reflejan a continuación en la tabla 13.

Tabla 13. Perfil fenotípico de la cepa de colección *Yersinia enterocolitica* CECT4315

Gram	Oxidasa	Catalasa	Glucosa	Sacarosa	Lactosa	Ureasa	LIA	Movilidad	
								25°C	37°C
-	-	+	+	+	-	+	+	+	-

Los resultados iniciales obtenidos con las galerías API20E no fueron concluyentes ya que únicamente incluían en el género a dos de las cepas de origen alimenticio que compartían perfil fenotípico con la cepa de referencia. Ante dicha dificultad, nos planteamos si el sistema sirve o no para adscribir a especie las cepas del género *Yersinia*, lo cual se recoge en varios estudios, como por ejemplo, el llevado a cabo por Alberti F., en 1998, que indica que el sistema API 20E no es capaz de discriminar cepas de *Yersinia ruckeri* de las cepas de *Hafnia alvei*. La revisión bibliográfica acerca del uso del API 20E para la identificación de *Yersinia* pone de manifiesto que no permite distinguir cepas patógenas de no patógenas, por lo que sería necesario otro tipo de pruebas para la adscripción de dichas cepas a género y especie (Skurnik et al., 2011).

Para confirmar estos resultados se llevaron a cabo las pruebas discrepantes de manera independiente. Los resultados finales valorados con el sistema ApiWeb[™] (Biomérieux) permitían adscribir 8 de ellas a *Yersinia enterocolitica* con porcentajes de identificación del 96%.

3.2.2.2. Cepas procedentes de muestras clínicas.

De las 295 cepas procedentes de muestras clínicas aisladas, únicamente en diez se detectó la presencia del gen *yst*. Estas diez mostraron un perfil fenotípico idéntico al de la cepa de referencia CECT4315 de *Yersinia enterocolitica* (tabla 13) y además,

mediante el sistema API 20E se adscribían a dicha especie con porcentaje de identificación superior al 95%.

3.2.3. Incidencia del gen *yst* en cepas de *Yersinia enterocolitica*.

La investigación de la presencia del gen que codifica para la toxina termoestable Yst de *Yersinia enterocolitica*, mostró que (a) ninguna de las cepas de origen alimenticio contenían dicho gen y (b) todas las cepas clínicas lo poseían.

El gen *yst* únicamente está presente en cepas patogénicas (Delor et al., 1990), por lo que suponemos que las cepas aisladas de muestras de carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo se incluyen en un biotipo 1A no patogénico (ambiental) o bien de un biotipo de baja patogenicidad como el 2, 3, 4 o 5 (Wauters et al., 1987). Si bien, en nuestro caso no se realizaron pruebas adicionales para determinar el biotipo de las cepas.

Ante estos resultados, no se consideró necesario continuar con el estudio de la evaluación de la similitud genética entre las cepas de *Yersinia enterocolitica* aisladas de alimentos y las procedentes de casos de gastroenteritis.

4. CONCLUSIONES.

La prevalencia de *Salmonella* en productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León se sitúa en niveles similares a los encontrados en otros estudios de prevalencia realizados en el ámbito europeo, siendo particularmente preocupante la importante prevalencia en los productos cárnicos listos para el consumo (entre un 2% y un 6% dependiendo del tipo de producto).

Sin embargo, el riesgo sanitario por *Salmonella* asociado a este tipo de productos se considera bajo, pues las cepas de origen alimentario son genéticamente diferentes de las cepas involucradas en casos clínicos diagnosticados en la misma localización geográfica en la que se comercializan los productos alimenticios, si bien en casos puntuales existe una mayor similitud genética entre alguna cepa de origen alimentario y alguna clínica que la que se presenta entre cepas clínicas aisladas del mismo paciente.

Si bien las cepas de *Salmonella* de origen cárnico objeto de este estudio presentaban una capacidad de resistencia a compuestos antimicrobianos inferior a las cepas de origen clínico, es preocupante en términos sanitarios la presencia entre estas últimas de alguna (en torno al 5%) multirresistente.

La prevalencia de *Yersinia enterocolitica* en carnes frescas y en productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León es baja y el riesgo sanitario para los consumidores es escaso dado que la prevalencia de cepas patógenas de *Yersinia enterocolitica* es previsiblemente inferior al 1% en carnes frescas y al 0,4% en productos cárnicos listos para el consumo.

5. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abdel-Haq, N. M., Papadopol, R., Asmar, B. I. y Brown, W. J. (2006). Antibiotic susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* recovered from children over a 12-year period. *International journal of antimicrobial agents*, 27(5), 460-463.
2. Anonymous. (2009). Drug-resistance *Salmonella*. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>, Último acceso Noviembre 2010.
3. Bhunia, A. K. (2008). Biosensors and Bio-Based Methods for the Separation and Detection of Foodborne Pathogens. *Advances in food and nutrition research*, 54, 1-44.
4. Bottone, E. J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: Overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection*, 1(4), 323-333.
5. Boyce, J. M., Evans Jr., D. J., Evans, D. G. y DuPont, H. L. (1979). Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infection and immunity*, 25(2), 532-537.
6. Cabedo, L., Barrot, P.L., & Canelles, A. (2008). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection*, 71(4), 855-859.
7. Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32(3-4), 243-259.
8. Castañeda, P. E., Díaz Aparicio, E., Hernández Andrade, L. y Jaramillo Arango, C. J. (2001). Identification and typing of *Yersinia enterocolitica* biotypes and serotypes isolated. *Revista de saude publica*, 35(4), 380-384.
9. Centro Nacional de Epidemiología. (2009). Infecciones por *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 1998-2008. Boletín Epidemiológico Semanal, 17(18). Consultado el May 29, 2013, de <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/121/120>.
10. Cervallos, C., Hernández-Pezzi, G., Torres, A., Ordóñez, P., Villarrubia, S., & Bleda, M. J. (2005). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España. 2003. (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*, 13(3), 25-36.
11. Cover, T. L. y Aber, R. C. (1989). *Yersinia enterocolitica*. *New England Journal of Medicine*, 321(1), 16-24.
12. Crump, J. A., Luby, S. P., & Mintz, E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), 346-353.
13. Crump, J. A., & Mintz, E. D. (2010). Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clinical Infectious Diseases*, 50(2), 241-246.
14. Daly, M., Villa, L., Pezzella, C., Fanning, S., & Carattoli, A. (2005). Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(4), 558-561.
15. Delor, I. y Cornelis, G. R. (1992). Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infection and immunity*, 60(10), 4269-4277.

16. Delor, I., Kaeckenbeeck, A., Wauters, G. y Cornelis, G. R. (1990). Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic *Yersiniae*. *Infection and immunity*, 58(9), 2983-2988.
17. Dominguez, C., Gomez, I., & Zumalacarregui, J. (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1), 165-168.
18. Duffy, G., Cloak, O., O'Sullivan, M., Guillet, A., Sheridan, J., Blair, I., & McDowell, D. (1999). The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. on irish retail meat products. *Food Microbiology*, 16(6), 623-631.
19. Echeita, A., Aladueña, A., González, R., Díez, R., de la Fuente, M., Cerdán, F., Gutiérrez, R. (2005a). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. años 2002-2003 (I).13, 73.
20. Echeita, A.M., Aladueña, M.A., Díez, R., Arroyo, M., Cerdán, F., Gutiérrez, R., Ángel Usera, M. (2005b). Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(3), 127-134.
21. Echeita, A., Aladueña, A., González, R., Díez, R., de la Fuente, M., Cerdán, F., Gutiérrez, R. (2005c). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. años 2002-2003 (II).13, 85.
22. EFSA. (2009). The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *EFSA J.*, 223, 21-108.
23. EFSA. (2010). Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. Disponible en <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1496.pdf>, último acceso en mayo 2013.
24. EFSA. (2012a). Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2010. Disponible en www.efsa.europa.eu/en/press/news/120308.htm, último acceso en mayo 2013.
25. EFSA (2012b). *Salmonella*. Food-borne Zoonotic Diseases. Disponible en <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/Salmonella.htm>, último acceso en mayo 2013.
26. EFSA. (2012c). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal* 2012; 10(3):2598.
27. European Centre for Disease Prevention and Control: Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control, 2008. Disponible en http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0812_SUR_Annual_Epidemiological_Report_2008.pdf, último acceso en mayo 2013.
28. Euzéby, J.P. (2013). *Salmonella*. "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" (disponible en <http://www.bacterio.cict.fr/s/Salmonella.html>, ultimo acceso en mayo de 2013).
29. Euzéby, J.P. (2013). *Yersinia*. "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" (disponible en <http://www.bacterio.cict.fr/xz/Yersinia.html>, ultimo acceso en mayo de 2013).

30. Feng, P. y Weagant, S. D. (2001). In Pouch-Downes, F. & Ito, K. (Eds.), *Yersinia* (4^a ed.) pp. 421 American Public Health Association, Washington, D.C.
31. Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A. y Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS immunology and medical microbiology*, 47(3), 315-329.
32. Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., Siitonen, A. y Korkeala, H. (2006). Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs. *Journal of medical microbiology*, 55(6), 747-749.
33. Galanis, E., Wong, Danilo M.L.F., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Wegener, H. C. (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 12(3), 381-388.
34. García-Feliz, C., Collazos, J. A., Carvajal, A., Herrera, S., Echeita, M. A., & Rubio, P. (2008). Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolates from apparently healthy and clinically ill finishing pigs in Spain. *Zoonoses and Public Health*, 55(4), 195-205.
35. Gledel, J. (1995). *Salmonella*. In Bourgeoise, C.M., Mescle, J.F. & Zucca, J. (Ed.), *Microbiología alimentaria*, 55-66. Acribia, Zaragoza, España.
36. Gonzalez-Hevia, M. A., & Mendoza, M. C. (1995). Differentiation of strains from a food-borne outbreak of *Salmonella enterica* by phenotypic and genetic typing methods. *European Journal of Epidemiology*, 11(4), 479-482.
37. Gonzalez-Hevia, M. A., & Mendoza, M. C. (1995). Polymorphism of rRNA genes and plasmid analysis in the typing of *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis from a spanish health area. *The New Microbiologica: Official Journal of the Italian Society for Medical, Odontoiatric, and Clinical Microbiology (SIMMOC)*, 18(4), 377-384.
38. González-Hevia, M. Á., Martín, M. C., Lobato, M. J., Gutiérrez, F., Solano, P., & Álvarez-Riesgo, J. A. (1999). *Salmonella* and salmonellosis in the Principado de Asturias (Spain) during a seven-year period (1990-1996). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 17(4), 166-170.
39. Goverde, R. L. J., Huis In't Veld, J. H. J., Kusters, J. G. y Mooi, F. R. (1998). The psychrotrophic bacterium *Yersinia enterocolitica* requires expression of *pnp*, the gene for polynucleotide phosphorylase, for growth at low temperature (5°C). *Molecular microbiology*, 28(3), 555-569.
40. Gray, L. D. (1995). *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. *Manual of Clinical Microbiology*, 6, 450-456.
41. Grimont, P. A., & Weill, F. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serotipos. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France*,
42. Guerra, B., Soto, S., Cal, S., & Mendoza, M. C. (2000). Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(8), 2166-2169.
43. Hanes, D., Miliotis, M., & Bier, J. (2003). Nontyphoid *Salmonella*. *International Handbook of Foodborne Pathogens*, 137-149.
44. Hannu, T., Mattila, L., Nuorti, J. P., Ruutu, P., Mikkola, J., Siitonen, A. y Leirisalo-Repo, M. (2003). Reactive arthritis after an outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O:3 infection. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(9), 866-869.
45. Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology* Academic Pr., London.

46. Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2-3), 95-102.
47. Hernández-Pezzi, G., Torres, A., Ordóñez, P., & Cevallos, C. (2004). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 1993-2002 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*, 12(52), 289.
48. Hsueh, P., Teng, L., Tseng, S., Chang, C., Wan, J., Yan, J., Luh, K. (2004). Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* typhimurium and choleraesuis from pigs to humans, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, 10(1), 60-68.
49. Humphrey, T. (2004). *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nature Reviews Microbiology*, 2(6), 504-509.
50. Humphrey, T., & Jørgensen, F. (2006). Pathogens on meat and infection in animals - establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples. *Meat Science*, 74(1), 89-97.
51. Hur, J., Jawale, C., & Lee, J. H. (2012). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*, 45(2), 819-830.
52. Ibrahim, A., Liesack, W. y Stackebrandt, E. (1992). Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of clinical microbiology*, 30(8), 1942-1947.
53. Isberg, R. R. y Leong, J. M. (1990). Multiple $\beta 1$ chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, 60(5), 861-871.
54. ISO. (2002). In ISO (Ed.), ISO 6579:2002 Horizontal method for the detection of *Salmonella*, including *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi. ISO, Ginebra, Suiza.
55. Jalava, K., Hakkinen, M., Valkonen, M., Nakari, U., Palo, T., Hallanvuori, S., Nuorti, J. P. (2006). An outbreak of gastrointestinal illness and erythema nodosum from grated carrots contaminated with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases*, 194(9), 1209-1216.
56. Jones, B. D., & Falkow, S. (1996). Salmonellosis: Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants. *Annual review of immunology*, 14(1), 533-561.
57. Jones, G. W., Rabert, D. K., Svinarich, D. M., & Whitfield, H. J. (1982). Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella* Typhimurium with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infection and Immunity*, 38(2), 476-486.
58. Jordan, E., Egan, J., Dullea, C., Ward, J., McGillicuddy, K., Murray, G., Rafter, P. (2006). *Salmonella* surveillance in raw and cooked meat and meat products in the republic of Ireland from 2002 to 2004. *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 66-70.
59. Josefsen, M. H., Löfström, C., Olsen, K. P. E., Molbak, K., & Hoorfar, J. (2011). *Salmonella*. In D. Liu (Ed.), *Molecular detection of human bacterial pathogens* (pp. 1023) CRC Press, Boca-Raton, Florida (USA).
60. Kleckner, N. (1981). Transposable elements in prokaryotes. *Annual Review of Genetics*, 15, 341-404.
61. Le Minor, L., & Popoff, M. Y. (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: Request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 465-468.

62. Liebert C.A., Hall R.M., Summers A.O. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 507-22
63. Liu, D. (2011). *Molecular detection of human bacterial pathogens* CRC Press, Boca-Raton, Florida (USA).
64. Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., & Finlay, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: Big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2(2), 145-156.
65. Martínez Álvarez, N. (2007). Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo (Oviedo).
66. Mendoza, M. d. C., Herrero, A., & Rodicio, M. R. (2009). Ingeniería evolutiva en *Salmonella*: La emergencia de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia a antimicrobianos en serotipos no tifoideos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 37-43.
67. Meunier, D., Baucheron, S., Chaslus-Dancla, E., Martel, J., & Cloeckaert, A. (2003). Florfenicol resistance in *Salmonella enterica* serotipo newport mediated by a plasmid related to R55 from klebsiella pneumoniae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(4), 1007-1009.
68. Meunier, D., Boyd, D., Mulvey, M. R., Baucheron, S., Mammina, C., Nastasi, A., Cloeckaert, A. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in serotype Paratyphi B. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4), 430-433.
69. Mikulskis, A. V., Delor, I., Thi, V. H. y Cornelis, G. R. (2006). Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Molecular microbiology*, 14(5), 905-915.
70. Miller, S. I., Hohmann, E. L., & Pegues, D. A. (1995). *Salmonella* (including *Salmonella* Typhi). In G. L. Mandell, R. G. Douglas & J. E. Bennet (Eds.), *Principles and practice of infectious diseases* (4^a Ed), Churchill Livingstone, New York.
71. Miller, V. (1992). *Yersinia* invasion genes and their products. Studies of single gene products provide insight into basic requirements for pathogenesis. *ASM American Society for Microbiology News*, 58(1), 26-33.
72. Miller, V. y Falkow, S. (1988). Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infection and immunity*, 56(5), 1242-1248.
73. Mims, C. A., Playfair, J. H. L., Roitt, I. M., Wakelin, D., & William, R. The organisms. 1993. *Medical Microbiology*, Mims, C.A., (Ed), Mosby Europe Limited: London, 3-1.
74. Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2008). *Food microbiology: An introduction* (2^a Ed.). Amer Society for Microbiology, Washington, D.C.
75. Morpeth, S. C., & Thielman, N. M. (2006). Diarrhea in patients with AIDS. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 9(1), 23-37.
76. Mossel, D. A., Moreno, B., & Struijk, C. B. (2002). *Microbiología de los alimentos* (2^a ed.). Acribia, Zaragoza.
77. Mulvey, M. R., Boyd, D. A., Olson, A. B., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2006). The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes and Infection*, 8(7), 1915-1922.
78. Paerregaard, A., Espersen, F., Jensen, O. M. y Skurnik, M. (1991). Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: Growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in

- surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infection and immunity*, 59(1), 253-260.
79. Pai, C. H., Mors, V. y Seemayer, T. A. (1980). Experimental *Yersinia enterocolitica* enteritis in rabbits. *Infection and immunity*, 28(1), 238-244.
80. Pepe, J. C., Badger, J. L. y Miller, V. L. (1994). Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Molecular microbiology*, 11(1), 123-135.
81. Pepe, J. C. y Miller, V. L. (1993). *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6473-6477.
82. Pepe, J. C. y Miller, V. L. (1993). The biological role of invasin during a *Yersinia enterocolitica* infection. *Infectious agents and disease*, 2(4), 236-241.
83. Pestka, J., & Witt, M. (1985). An overview of immune function. *Food Technol.*, 39 (1), 83-90.
84. Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M. N., Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18(2), 263 – 269.
85. Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Tükel, Ç., Akçelik, M., & Bäumler, A. J. (2006). Capsule-mediated immune evasion: A new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infection and Immunity*, 74(1), 19-27.
86. Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C., Gyles, C. L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6(4), 271-279.
87. Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J. V., & Woodward, M. J. (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 208-216.
88. Ray, S. M., Ahuja, S. D., Blake, P. A., Farley, M. M., Samuel, M., Fiorentino, T., Van Gilder, T. (2004). Population-based surveillance for *Yersinia enterocolitica* infections in FoodNet sites, 1996-1999: Higher risk of disease in infants and minority populations. *Clinical Infectious Diseases*, 38(SUPPL. 3), S181-S189.
89. Robins-Browne, R. M., Tzipori, S., Gonis, G., Hayes, J., Withers, M. y Prpic, J. K. (1985). The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* infection in gnotobiotic piglets. *Journal of medical microbiology*, 19(3), 297-308.
90. Rodríguez, M., de Diego, I., Martínez, N., Rosario Rodicio, M., & Carmen Mendoza, M. (2006). Nontyphoidal *Salmonella* causing focal infections in patients admitted at a Spanish general hospital during an 11-year period (1991-2001). *International Journal of Medical Microbiology*, 296(4-5), 211-222.
91. Rodríguez, M., De Diego, I., & Mendoza, M. C. (1998). Extraintestinal salmonellosis in a general hospital (1991 to 1996): Relationships between *Salmonella* genomic groups and clinical presentations. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(11), 3291-3296.
92. Sansonetti, P. (2002). Host-pathogen interactions: The seduction of molecular cross talk. *Gut*, 50(SUPPL. 3), iii2-iii8.

93. Scherer, C. A., & Miller, S. I. (2001). Molecular pathogenesis of *Salmonella*. *Principles of Bacterial Pathogenesis*, 265-333.
94. Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 14-56.
95. Schiemann, D. (1979). Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Canadian journal of microbiology*, 25(11), 1298-1304.
96. Schleifstein, J. y Coleman, M. (1939). An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *P. pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *NY State J. Med.*, 39, 1749-1753.
97. Servicio de Información Microbiológica (2012). Instituto de la Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid). Datos procedentes de <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/sistema-informacion-microbiologica.shtml>, Último acceso Mayo 2012.
98. Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2004). Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate-and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2959-2965.
99. Skurnik, M., Radström, P., Knutsson, R., Segerman, B., Hallanvuori, S., Lambert, S. T., Fredriksson-Ahomaa, M. (2011). *Yersinia*. In D. Liu (Ed.), *Molecular detection of human bacterial pathogens* (pp. 1089) CRC Press.
100. Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
101. Terti, R., Granfors, K., Lahesmaa-Rantala, R. y Toivanen, A. (1989). Serum opsonic capacity against *Yersinia enterocolitica* O:3 in yersiniosis patients with or without reactive arthritis. *Clinical and experimental immunology*, 76(2), 227-232.
102. Terti, R., Vuento, R., Mikkola, P., Granfors, K., Makela, A. -. y Toivanen, A. (1989). Clinical manifestations of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(7), 587-591.
103. EFSA & ECDC (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Disponible en <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zoonoses-food-outbreaks-report-2011-ecdc-efsa.pdf>, ultimo acceso mayo 2013.
104. Tindall, B., Grimont, P., Garrity, G., & Euzéby, J. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 521-524.
105. Usera, M. A., Aladueña, A., Díez, M., De la fuente, R., Gutiérrez, R., Cerdán, P., Echeita, A. (2001a). Análisis de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 2000. *Boletín epidemiológico semanal*, 9, 221.
106. Usera, M. A., Aladueña, A., Díez, M., De la fuente, R., Gutiérrez, R., Cerdán, P., Echeita, A. (2003). Análisis de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España en el año 2001. *Boletín epidemiológico semanal* 11, 133.

107. Usera, M. A. (1996). Interregional foodborne salmonellosis outbreak due to powdered infant formula contaminated with lactose-fermenting *Salmonella* Virchow. *European Journal of Epidemiology*, 12(4), 377-381.
108. Usera, M. A., Bellod, P., Carbonell, C., & Echeita, A. (1995). Multiple outbreaks caused by *Salmonella* serotype Enteritidis in a restaurant. [Múltiples brotes por *Salmonella* serotipo Enteritidis en una empresa de restauración.] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 13(1), 68-69.
109. Usera, M. A., Cano, R., & Echeita, A. (1995). Serotype distribution of *Salmonella* sp. in Spain over the 1988-1992 period. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 13(3), 138-145.
110. Usera, M. A., Popovic, T., Bopp, C. A., & Strockbine, N. A. (1994). Molecular subtyping of *Salmonella* Enteritidis phage type 8 strains from the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(1), 194-198.
111. Usera, M. A., Rodriguez, A., Echeita, A., & Cano, R. (1998). Multiple analysis of a foodborne outbreak caused by infant formula contaminated by an atypical *Salmonella* Virchow strain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(8), 551-555.
112. Uyttendaele, M., De Troy, P., & Debevere, J. (1999). Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. *Journal of Food Protection*, 62(7), 735-740.
113. Uyttendaele, M., Debevere, J., Lips, R., & Neyts, K. (1998). Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1), 1-8.
114. Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Olsen, J. E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 125(2), 229-255.
115. Wallis, T. S., & Galyov, E. E. (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Molecular Microbiology*, 36(5), 997-1005.
116. Wauters, G., Kandolo, K. y Janssens, M. (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to microbiology and immunology*, 9, 14-21.
117. Wauters, G., Aleksic, S., Charlier, J. y Schulze, G. (1991). Somatic and flagellar antigens of *Yersinia enterocolitica* and related species. *Contributions to microbiology and immunology*, 12, 239-243.
118. Weill, F. -, Guesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demartin, M., Polomack, L., & Grimont, P. A. D. (2006). Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 700-708.
119. WHO Global Salm-Surv South America Working Group, WHO Global SalmSurv. A WHO Global Salm-Surv Retrospective Study Examining *Salmonella* Serotypes in South America, 2000: Dominance of *Salmonella* Serotype Enteritidis. International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, 2002. WHO, Ginebra, Suiza.
120. Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Hecht, D. W., Swenson, J. M. (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. 25(1), 1-177.

121. Winblad, S., Niléhn, B. y Jonsson, M. (1966). Two further cases, bacteriologically verified, of human infection with "Pasteurella X" (syn. *Yersinia enterocolitica*). *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 67(4), 537-541.
122. Winblad, S., Niléhn, B. y Sternby, N. H. (1966). *Yersinia enterocolitica* (*Pasteurella x*) in human enteric infections. *British medical journal*, 2(5526), 1363-1366.
123. Winokur, P. L., Brueggemann, A., DeSalvo, D. L., Hoffmann, L., Apley, M. D., Uhlenhopp, E. K., Doern, G. V. (2000). Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(10), 2777-2783.
124. Yoke-Kqueen, C., Learn-Han, L., Noorzaleha, A., Son, R., Sabrina, S., Jiun-Horng, S., & Chai-Hoon, K. (2008). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry in Malaysia. *Letters in Applied Microbiology*, 46(3), 318-324.
125. Zhao, S., White, D. G., Friedman, S. L., Glenn, A., Blickenstaff, K., Ayers, S. L., McDermott, P. F. (2008). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serotipo Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6656-6662.
126. Zhou, D., & Galán, J. (2001). *Salmonella* entry into host cells: The work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes and Infection*, 3(14-15), 1293-1298.

Capítulo V. Incidencia de *E. coli* productor de toxinas Shiga y *E. coli* Enteropatógeno y evaluación comparativa con cepas de origen clínico

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. *Escherichia coli* como agente de gastroenteritis.

Escherichia coli (*E. coli*) es probablemente el organismo más estudiado en Microbiología. Desde su primera descripción (Escherich, 1885), se convirtió en el organismo modelo de muchas investigaciones microbiológicas, tanto que a menudo se olvida que su principal nicho ecológico es el tracto digestivo del hombre y de la mayoría de los animales de sangre caliente. *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos a las pocas horas de vida mediando una relación de beneficio mutuo con el hospedador (Nataro et al., 1998). Cepas no patógenas de *E. coli* pueden producir infecciones en individuos inmunodeprimidos o en circunstancias en las que son capaces de atravesar las barreras gastrointestinales. Además de dichas cepas, existe una serie de ellas consideradas patógenas que han adquirido características específicas que les confieren virulencia y les permiten adaptarse a nuevos nichos y causar, incluso en individuos totalmente sanos, un amplio espectro de complicaciones clínicas (Karper et al., 2004). Dichas características de virulencia están frecuentemente codificadas en elementos móviles que pueden ser transferidos entre cepas dando lugar a una mayor probabilidad de combinaciones patógenas (Karper et al., 2004).

La importancia del estudio de la prevalencia de esta bacteria radica no tanto en el número de casos anuales sino en la elevada patogenicidad de determinadas cepas pertenecientes principalmente al serotipo O157:H7 (cepas productoras de toxinas Shiga), así como por su reducida dosis infectiva y el gran número de afectados en la mayor parte de los brotes (Elizaquível et al., 2011).

El informe anual emitido por la EFSA en 2012 recogió que en el año 2010 tuvieron lugar 4000 casos de infección por *E. coli* productor de toxinas Shiga en la Unión Europea (UE), lo que supone un aumento del 12% con respecto al año anterior. De los 4000 casos, dieciocho tuvieron lugar en España, de los que 17 se correspondían con el serotipo O157:H7 (EFSA, 2012).

1.2. Características y taxonomía de *Escherichia coli*.

Según Garrity et al. (2004), el género *Escherichia* está encuadrado dentro del Phylum Proteobacteria, en la Clase Gammaproteobacteria, Orden Enterobacteriales, incluido en la Familia *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* (*E. coli*) es la especie tipo del género *Escherichia* (Blanco et al., 2004), cuyas características generales son las siguientes (Welch et al., 2006; Elizaquível et al., 2011):

- Bacilos Gram negativos, catalasa positivos, oxidasa y ureasa negativos.
- No formadores de esporas.
- Anaerobios facultativos, con un amplio rango de temperatura de incubación que oscila entre los 7 y los 46,2°C, aunque su óptimo se encuentra en 37-42°C.
- Se multiplican en medios cuyo pH que oscila entre 5,5-8 siendo las condiciones de neutralidad las más adecuadas para su crecimiento.
- Reducen nitritos y producen gas y ácidos cuando se cultivan en presencia de hidratos de carbono.
- Son indol y rojo de metilo positivos.
- Son capaces de utilizar la lactosa a diferencia de *Salmonella* y *Shigella*, y por regla general, usan el sorbitol a excepción de las cepas productoras de toxinas Shiga correspondientes al serotipo O157:H7.
- Pueden ser inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos.
- Sus necesidades nutricionales son sencillas.

E. coli es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa del aparato digestivo de la mayor parte de los animales y del hombre (Margall et al., 1997; Schroeder et al., 2004; Todar, 2008) y por tanto, se elimina por las heces al exterior.

La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, pero algunas de ellas pueden causar enfermedad tanto en el hombre como en animales. El criterio que se ha utilizado durante muchos años para diferenciar los *E. coli* patógenos de los comensales, ha sido la determinación del antígeno somático, pero ha sido necesario conocer la fórmula antigénica completa, así como la determinación de otras características de virulencia, para considerar a una cepa como patógena (Margall et al., 1997; Delicato et al., 2003; Mellata et al., 2003; Ewers et al., 2005; Todar, 2008). De acuerdo con el esquema de Kauffman, *E. coli* se

clasifica serológicamente por los antígenos somáticos (O), flagelar (H) y capsular (K). Los antígenos O definen un serogrupo, y una combinación específica de antígenos O y H definen el serotipo de un aislamiento. Los problemas de este tipo de clasificación para tratar de separar las cepas patógenas de las no patógenas propias de la microbiota normal del organismo radican en su limitada especificidad y sensibilidad así como en lo tedioso y poco económico que supone su realización, que en la práctica sólo es llevada en laboratorios de referencia (Nataro et al., 1998). Como alternativa más reciente para la identificación de estas cepas patógenas se combina la detección de marcadores fenotípicos con pruebas para la detección de los genes que codifican para dichos rasgos. Esta detección se lleva a cabo mediante la técnica de PCR, para la cual se han desarrollado con éxito cebadores que nos permiten amplificar genes que forman parte de cada una de los grupos de *E. coli* patógenos.

Sin embargo, la presencia de factores de virulencia asociados a elementos genéticos móviles supone una dificultad añadida a la hora de categorizar dichas cepas en patotipos (Karper et al., 2004). Actualmente, se reconocen seis grupos patógenos de *E. coli* asociadas a infecciones gastrointestinales. Adicionalmente, existen cepas patógenas de *E. coli* causantes de infecciones urinarias (*E. coli* uropatógeno, UPEC) y otras septicemia y meningitis (*E. coli* asociada a sepsis-meningitis, MNEC), que constituyen los patotipos extraintestinales (ExPEC), (Karper et al., 2004).

Las cepas patógenas de *E. coli* asociadas a infecciones gastrointestinales se engloban en diferentes grupos o categorías, con unas características y mecanismos de virulencia determinados que actúan conjuntamente para potenciar su patogenicidad, produciendo infecciones y síndromes diferentes (Blanco et al., 2002). Estos grupos son:

- *E. coli* Enteropatógeno (EPEC): Fue el primer patotipo descrito. Las cepas de EPEC causan la lesión de adhesión y borrado (A/E-attaching and effacing) de las microvellosidades de los enterocitos (Margall et al., 1997) y no producen toxinas Shiga (Levine et al., 1987), ni poseen capacidad invasiva *in vivo*. La adhesión a células intestinales está relacionada con la expresión de la fimbria BFP (Bundle Forming Pilus), necesaria para el desequilibrio de electrolitos que desemboca en la producción de diarrea.

En el hombre produce una diarrea líquida con mucosidad acompañada de vómitos, deshidratación y fiebre, pero no de sangre. Sus síntomas suelen durar varios días pero

se han descrito también procesos crónicos (Elizaquível et al., 2011). Es frecuente en los países desarrollados y en los países en vía de desarrollo. Se considera como una de las principales causas de diarrea infantil, afectando a niños menores de 2 años (Margall et al., 1997; Nataro et al., 1998).

Se han descrito dos subgrupos dentro de este patotipo (Hernandes et al., 2009):

- EPEC típicos (tEPEC) que son más homogéneos en cuanto a sus características de virulencia, por un lado presentan unos codificados por la isla de patogenicidad LEE (por su siglas en inglés, de “*Locus of enterocyte effacement*”) y que son (i) proteínas de adhesión a la membrana (intimina) y su receptor Tir en la célula eucariota, (ii) los componentes del sistema de secreción III, (iii) los reguladores, (iv) los translocadores, (v) y los chaperones y efectores capaces de modificar los procesos de señalización celular. Por otra parte, también albergan el plásmido EAF (“EPEC Adherence Factor”), (Trabulsi et al., 2002; Garmendia et al., 2005a).

Están asociados a diarreas en niños menores de un año, pero su frecuencia es baja. No suele aparecer en adultos y normalmente está asociado a otros procesos patogénicos (Trabulsi et al., 2002).

- EPEC atípicos (aEPEC), son aquellos que han perdido el plásmido EAF pero causan diarrea y poseen factores de virulencia adicionales (Elizaquível et al., 2011). Sus mecanismos de patogenicidad no se conocen en su totalidad, ya que se está constituyendo como patógeno emergente de importancia en países desarrollados, relacionado con más casos de procesos diarreicos que las cepas del grupo tEPEC (Trabulsi et al., 2002; Beutin et al., 2006). Dentro del mismo encontramos aquellos serotipos cuyos factores de virulencia están codificados en LEE únicamente y aquellos que además de dichos factores también pueden expresar otros que se encuentran fuera de la isla de patogenicidad LEE, tales como una toxina enteroagregativa termoestable (EAST1) (Trabulsi et al., 2002).

- *E. coli* Enterotoxigénico (ETEC): Junto con las cepas de EPEC son los patógenos responsables de la diarrea del viajero o de origen alimentario por alimentos importados, muy frecuentes en países subdesarrollados (Todar, 2008). Se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y se produce la liberación de enterotoxinas (termolábil “LT” y termoestable “ST”), responsables del cuadro clínico. En el

hombre se produce una diarrea líquida profusa, sin sangre ni material purulento y sin fiebre (Margall et al., 1997).

Las fimbrias responsables de la adhesión de los ETEC son específicas de hospedador, por ello, las cepas causantes de diarrea en humanos son diferentes a las aisladas en animales. Por ejemplo la fimbria K-88 se ha detectado en aislados de origen porcino, la K-99 en terneros y corderos y las CFAI y CFAII en aislados humanos (Todar, 2008).

Los factores de virulencia están codificados en plásmidos transmisibles (Elizaquível et al., 2011).

En animales es muy frecuente, afecta a individuos jóvenes y recién destetados, ocasionando importantes pérdidas económicas en el ganado bovino, ovino, caprino y porcino (Blanco et al., 1991, 1993, 1996).

- *E. coli* Enteroinvasivo (EIEC): El grupo EIEC y *Shigella* spp. se encuentran relacionados genética y bioquímicamente. Se asocia fundamentalmente con brotes de origen alimentario por alimentos importados (Margall et al., 1997). El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon por pinocitosis, rotura de la vacuola en el interior celular y proliferación de la bacteria pudiendo extenderse a células adyacentes, sin producción de toxinas LT y ST, dando lugar a colitis inflamatoria invasiva y/o a una diarrea disenteriforme acuosa que se manifiesta con sangre y mucosidad en heces acompañada de fiebre y dolor abdominal (Todar, 2008). En algunos casos sólo se produce diarrea, siendo difícil diferenciarla de la producida por ETEC (Rodríguez-Ángeles, 2002).

- *E. coli* Enteroagregativo (EAEC): La infección por EAEC se ha asociado con la diarrea infantil en países en vías de desarrollo, puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente (Rodríguez-Ángeles, 2002). Las cepas de EAEC son *E. coli* que presentan un tipo de fimbrias (“Aggregative Adherence Fimbriae”, AAF) que les permiten adherirse de un modo agregativo (Todar, 2008) a la mucosa del intestino grueso y delgado, produciendo un aumento de la secreción de mucus que atrapa a las bacterias y que permite su autoaglutinación en una fina película en el epitelio intestinal. Posteriormente estas bacterias liberan la enterotoxina termoestable, ST, responsable del cuadro clínico y de las lesiones histopatológicas a nivel intestinal

(Blanco et al., 2002). Se trata de una diarrea persistente acuosa, mucoide e incluso sanguinolenta, de varios días de duración.

- *E. coli* Difusoadherente (DAEC): La bacteria se adhiere al azar a las microvellosidades intestinales deformándolas. No produce toxinas. Provoca diarrea acuosa libre de sangre (Nataro et al., 1998). Estas cepas están implicadas en diarreas particularmente asociadas a niños de edad inferior a 12 meses.

- *E. coli* Productor de Toxinas Shiga (STEC): El grupo de STEC son importantes patógenos emergentes, que causan patologías muy graves en los seres humanos. Su nombre se debe a la producción de las toxinas Shiga (Cortés, 2007; Todar, 2008).

Las cepas STEC se caracterizan por su capacidad de producir citotoxinas que tienen la capacidad de inhibir la síntesis proteica en células eucariotas. Estas toxinas fueron denominadas en un primer momento como Verotoxinas (VT, por sus siglas en inglés Verotoxins), por su efecto citotóxico en células de la línea Vero (Konowalchuk et al., 1977). Pocos años después, se observó que también producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por anticuerpos anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'Brien et al., 1982), y se las denominó toxinas Shiga (Stx, por sus siglas en inglés, de Shiga Toxins). Por lo tanto, la denominación de VTEC (por sus siglas en inglés, de Verotoxigenic *E. coli*) y STEC son equivalentes y definen a todas las cepas *E. coli* que producen una o más toxinas de la familia Stx (VT).

Pero la importancia de STEC como patógeno humano cobró notoriedad en 1983, cuando se produjeron dos brotes de diarrea sanguinolenta grave, denominada Colitis Hemorrágica (CH), en los estados de Michigan y Oregón (EE.UU.) causados por el consumo de hamburguesas, identificándose por primera vez el serotipo O157:H7 como patógeno humano (Riley et al., 1983). Karmali et al. (1983) a su vez investigaron la asociación de casos esporádicos de Síndrome Urémico Hemolítico con la presencia de citotoxinas producidas por *E. coli* en heces.

El término *Escherichia coli* Enterohemorrágico (EHEC, por sus siglas en inglés, de Enterohemorrhagic *E. coli*) es utilizado frecuentemente para describir un sub-grupo de cepas STEC responsables de causar cuadros graves en el hombre de Colitis

Hemorrágica (CH) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), del cual *E. coli* O157:H7 es la cepa prototipo.

Además de expresar las toxinas Stx, este grupo bacteriano posee factores de virulencia adicionales, como la isla de patogenicidad LEE, que codifica para un sistema de secreción tipo III y proteínas efectoras homólogas a aquellas producidas por EPEC (Kaper et al., 2004).

Sin embargo, existen cepas STEC LEE-negativas capaces de causar enfermedad grave, por lo tanto resulta adecuada la utilización de un término más general, como STEC, para referirse a todas las cepas de *E. coli* capaces de producir Stx.

Los rumiantes pueden actuar como portadores asintomáticos de cepas de STEC potencialmente patógenas para el hombre (Blanco et al., 2002; Cortés, 2007). Se han aislado STEC en otras especies animales como en ganado porcino, gatos y perros (Beutin et al., 1993), sin embargo la frecuencia de aislamiento (7,5%; 13,8% y 4,8% respectivamente) ha sido inferior a la obtenida en rumiantes.

El serotipo O157:H7 es el más importante dentro de este grupo, vinculándose frecuentemente con infecciones humanas en todo el mundo, provocando numerosos brotes de Colitis Hemorrágica especialmente en Canadá, EE.UU., Japón y el Reino Unido (Karmali, 1989; Blanco et al., 1997; Blanco et al., 2003). En España, los casos esporádicos de infecciones intestinales por STEC O157 son relativamente frecuentes y se han producido algunos brotes causados principalmente por el serotipo O157:H7 (Blanco et al., 2003). Los programas nacionales de vigilancia tienden a concentrarse en el serotipo O157:H7, las infecciones en el hombre se presentan con mayor frecuencia como brotes de transmisión alimentaria en comunidades tales como familias, colegios, guarderías y residencias de ancianos (Cortés, 2007).

Aparte del serotipo O157:H7, los serotipos O26:H11 y O111:H⁻ son los más prevalentes en casos de Colitis Hemorrágica en humanos. Si bien, existen otros implicados en la producción tanto de Colitis Hemorrágica y como de SUH, los cuales se asocian generalmente con serotipos de STEC que poseen el gen que codifica para la intimina (*eae*), (Blanco et al., 2003). Sin embargo, la producción de intimina no es imprescindible para la patogénesis, ya que existen casos de desarrollo de SUH causados por cepas de STEC no O157 *eae*-negativas como por ejemplo el serotipo O104:H21 y O113:H21 (Blanco et al., 2003).

Asimismo, más recientemente, se han descrito cepas atípicas de *E. coli* productoras de Toxinas Shiga que también pueden causar enfermedad y la ocurrencia de grandes brotes, como el descrito a comienzos de mayo de 2011 en Alemania y que se extendió a 13 países miembros de la Unión Europea, Canadá y EE.UU., asociado a una cepa de *E. coli* O104:H4 Stx2+ y Eae-, causando aproximadamente 3.500 casos de infección, incluyendo 810 casos de Síndrome Urémico Hemolítico y 39 muertes (Bielaszewska et al., 2011). La particularidad de este brote fue el predominio de mujeres adultas implicadas, complicaciones neurológicas graves y las características de la cepa involucrada, ya que la misma no fue una “típica” STEC virulenta, sino un tipo híbrido no habitual que portaba la codificación mediada por fagos para Stx2 pero tenía una base genética de EAEC, por lo que a esta cepa se la denominó *E. coli* Enteroagregativo productor de Toxina Shiga (Bielaszewska et al., 2011).

Si bien la mayoría de los estudios están orientados a la detección de *E. coli* O157, en la actualidad han aumentado los esfuerzos para detectar los diferentes serotipos de STEC. A diferencia de lo que ocurre con O157:H7, que no fermenta sorbitol y no posee actividad β -glucuronidasa, los serotipos de STEC no-O157 no presentan marcadores fenotípicos diferenciales comparados con las *E. coli* comensales. Por lo tanto, para su identificación se requiere la aplicación de estrategias más complejas, como la serotipificación y diferentes técnicas de biología molecular para amplificar genes que codifican para factores de virulencia específicos, entre otras (Elizaquível et al., 2011).

La principal vía de transmisión de STEC son los alimentos contaminados a partir de heces animales. Otras formas de transmisión incluyen la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, el contacto directo del hombre con los animales, y persona a persona por la ruta fecal-oral. Es importante destacar que la dosis infectiva capaz de ocasionar enfermedad por parte de este grupo bacteriano es inferior a 100 bacterias (Elizaquível et al., 2011).

La ingestión de STEC puede conducir al estado de portador asintomático del microorganismo; casos esporádicos o brotes de diarrea, Colitis Hemorrágica o Síndrome Urémico Hemolítico, una complicación sistémica grave caracterizada por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia (Kaper et al., 2004). Los riñones constituyen el principal órgano afectado, pero

también otros órganos como el páncreas, los pulmones, el corazón y el sistema nervioso central pueden resultar dañados.

La infección y desarrollo de la enfermedad puede ocurrir tras la ingesta de una dosis bacteriana tan baja como 100 unidades formadoras de colonias (Elizaquível et al., 2011). El período de incubación promedio de la infección por STEC es de 3 días (con un rango de 1-8 días). Después de ese período, un alto porcentaje de pacientes presenta diarrea acuosa y aproximadamente el 30% evoluciona a diarrea sanguinolenta o CH en los días 5-6, presentando evidencia de edema de la mucosa, dolores abdominales agudos (frecuente en niños), y en algunos casos pueden presentarse vómitos, pero no es frecuente la aparición de fiebre. Aunque en la mayoría de los casos la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente del 5 al 10% de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe un tratamiento específico, sino sintomáticos. Aproximadamente la mitad de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% precisa de transfusión sanguínea (Rivas et al., 2006 y 2008).

Entre los factores predictivos del desarrollo de SUH se incluyen (i) edades extremas (Cimolai et al., 1994; Buteau et al., 2000), (ii) leucocitosis (Bell et al., 1997; Buteau et al., 2000), (iii) tratamiento con agentes reductores de motilidad o antidiarreicos (Cimolai et al., 1994; Bell et al., 1997), (iv) fiebre (Bell et al., 1997), (v) período prodrómico corto (Buteau et al., 2000), y en algunos casos (vi) diarrea sanguinolenta (Carter et al., 1987).

En algunos pacientes, los síntomas de SUH aparecen 6-8 días después del inicio de la diarrea e incluyen: anemia hemolítica microangiopática (hematocrito <30%), trombocitopenia (<150.000 plaquetas/mm³), e insuficiencia renal aguda. En otros pacientes, puede observarse un período sin síntomas entre la diarrea y la aparición de SUH; mientras que en algunos pacientes, el SUH aparece conjuntamente con el período de diarrea. STEC fue reconocido como agente causal de la forma infecciosa de SUH por Kaplan et al. (1990) y fueron Karmali et al. (1983) quienes establecieron la asociación entre el SUH y las cepas de STEC.

En los últimos años, el diagnóstico precoz de la enfermedad y el mejor manejo de la insuficiencia renal aguda y de la anemia disminuyó la letalidad durante el período agudo, siendo en la actualidad del 3 al 5%. Sin embargo, un 5% de niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años procedimientos de diálisis o trasplante renal. Otro 20% continúa con microhematuria y grados variables

de proteinuria, pudiendo desarrollar insuficiencia renal crónica terminal en lapsos variables que pueden llegar a décadas (Spizzirri et al., 1997).

1.3. Mecanismos de patogenicidad asociados a *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga.

Las cepas de *E. coli* patógenas colonizan la superficie de la mucosa intestinal a pesar de los peristaltismos y la competencia por los nutrientes que se desarrolla con la microbiota propia del intestino del individuo afectado, incluyendo otras cepas de *E. coli*. Las cepas de *E. coli* diarreogénicas poseen fimbrias que permiten la adherencia y colonización a la mucosa del intestino delgado. Dentro del grupo de STEC encontramos los siguientes factores de virulencia:

- 1.3.1. Producción de las toxinas Stx1 y Stx2. Constituyen el principal factor de virulencia en estas cepas y están codificados en bacteriófago Lambda. La implicación de la producción de Stx en las enfermedades intestinales difiere del organismo que la padezca. Pero la conclusión de diversos estudios es que la capacidad de cepas de EHEC de producir lesiones de adherencia y borrado (A/E) es suficiente para causar procesos diarreicos no sanguinolentos pero que la producción de Stx es esencial en el desarrollo de diarreas sanguinolentas y Colitis Hemorrágicas. En cuanto a pacientes que desarrollan el Síndrome Urémico Hemolítico, se asume que por el daño producido en el epitelio, la actuación del lipopolisacárido y otros mediadores de procesos inflamatorios, la bacteria pasa a sangre aunque no haya estudios de detección de la misma en sangre de dichos pacientes. Esto se apoya en la afirmación de que pacientes con diarrea sanguinolenta provocada por el serotipo O157:H7 están más predispuestos a sufrir SUH que los que sufren procesos diarreicos no sanguinolentos (Boyce et al., 1995).

Datos epidemiológicos sugieren que la Stx2 posee una importancia superior a la Stx1 en el desarrollo de SUH ya que cepas que expresan únicamente Stx2 están asociadas de manera más firme al progreso de SUH que los que sólo expresan Stx1 o incluso ambas (Boyce et al., 1995). Estudios sobre células del endotelio renal (Waldolkowski et al., 1990) y en ratones (Louise et al., 1995) sugieren que Stx2 induce una mayor citotoxicidad que Stx1.

1.3.2. Producción de enterohemolisina. El plásmido 60-MDa comúnmente encontrado en cepas O157:H7 (aunque también aparece en la mayoría de los STEC no O157:H7) posee genes que codifican para una hemolisina de la cual no existen datos que confirmen su implicación en la patogénesis de la enfermedad (Schmidt et al., 1995).

1.3.3. Producción de factores de adherencia intestinal. El único factor de adherencia de O157:H7 que se ha demostrado que juega un papel importante en la colonización intestinal es la intimina codificada por el gen *eae*, ya que la mutación del mismo provoca la no existencia de lesiones A/E y parece no colonizar las células intestinales (Tzipori et al., 1987; Donnenberg et al., 1993; McKee et al., 1995). A esto se le añade la respuesta obtenida en pacientes de SUH con la incorporación de anticuerpos anti-intimina (McKee et al., 1996) y la reducción en la virulencia de cepas EPEC mutadas en el gen *eae*. La intimina expresada en cepas EPEC posee una secuencia diferente de los demás serotipos y se ha postulado que esa secuencia provoca la asociación de EPEC al intestino delgado y de EHEC al intestino grueso. Así, en lechones, cepas salvajes de EPEC provocan lesiones A/E en intestino delgado y grueso mientras que cepas salvajes de EHEC causan lesiones únicamente en el intestino grueso. Por otra parte al clonar un gen *eae* de EPEC e introducirlo en una cepa de EHEC con el *eae* mutado, el híbrido (EHEC que expresa la intimina codificada por el *eae* de EPEC) causa lesiones A/E en ambos. Además el volumen de la diarrea producidos por estos híbridos es mayor que el que se produce en los infectados por cepas EHEC y este aumento de volumen está directamente relacionado con el área que ha sido colonizada en el intestino. Estos estudios demuestran, al menos en lechones, que la intimina es esencial para la colonización del intestino grueso por cepas de EHEC (Yu et al., 1992).

Además de la intimina existen otros factores de adherencia que fueron descritos a partir del aislamiento de cepas STEC no O157:H7 que han perdido el gen *eae* pero siguen provocando diarreas sanguinolentas o SUH en humanos, un ejemplo lo tenemos en el serotipo O113:H21 (Dytoc et al., 1994).

1.3.4. Plásmido pO157, que se encuentra altamente conservado en todas las cepas de *E. coli* O157:H7 y aunque también lo presentan otros serotipos, no se encuentra en todas las cepas de STEC aisladas de humanos (Beutin et al., 1993). En este plásmido se codifica una enterohemolisina descrita en 1987 por Levine et al., y una

catalasa-peroxidasa de función desconocida (Brunner et al., 1996). La función de este plásmido en la patogénesis de cepas EHEC es desconocida (Elizaquível et al., 2011).

1.3.5. Sistema de transporte del hierro propio de *E. coli* O157:H7, que permite al organismo el uso de la hemoglobina como fuente de hierro (Elizaquível et al., 2011).

1.3.6. Lipopolisacárido O157. Potencia la citotoxicidad de las toxinas Stx en las células del endotelio vascular *in vitro* pero sus efectos *in vivo* no están claros (Elizaquível et al., 2011).

1.4. Distribución de resistencia a antimicrobianos.

- La resistencia antimicrobianos en bacterias patógenas en general, y en cepas de *E. coli* en particular es un problema sanitario de importancia creciente según el informe de resistencia a antibióticos del año 2010, emitido por la EFSA en 2012.
- Así, entre las cepas de STEC aisladas de alimentos en la UE la frecuencia de resistencia a antimicrobianos oscilaba entre el 4% y el 38%, dependiendo del origen y del antimicrobiano (EFSA, 2012).
- Adicionalmente, para determinadas cepas de *E. coli* el empleo de un tipo u otro de antibiótico puede afectar al desarrollo del mecanismo patogénico del cuadro clínico, como se puso de manifiesto como consecuencia del brote del año 2011 por *E. coli* O104:H4 *stx2+/eae-* (Zhang et al., 2000; Bielaszewska et al., 2011).

1.5. Justificación del trabajo presentado en este capítulo.

En particular las enfermedades producidas por los tipos verotoxigénicos de *E. coli* constituyen una de las zoonosis alimentarias más frecuentes e importantes en el hombre debido a la gravedad de los cuadros clínicos y al número de afectados, pudiendo suponer un grave riesgo para la salud pública. La infección humana se produce por agua o alimentos contaminados, por transmisión directa persona-persona o por animales infectados (Elizaquível et al., 2011).

Por su importancia sanitaria y su posible relación con las carnes y productos cárnicos listos para el consumo, esta investigación se centró en la evaluación de la prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga, valorando además como marcador adicional de virulencia la capacidad genética para producir intimina (gen *eae*).

1.6. Objetivos.

En consecuencia y dentro del objetivo general de tratar de aportar datos significativos que permitan una evaluación cuantitativa del riesgo para la salud asociado a la ingesta de *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga, los objetivos concretos del trabajo presentado en este capítulo fueron:

- Establecer la prevalencia de *E. coli* Productora de Toxinas Shiga en los productos alimenticios de origen cárnico en el momento de su comercialización en los centros de venta en la ciudad de León.
- Evaluar la importancia sanitaria de las cepas presuntamente patógenas aisladas de carnes y productos cárnicos mediante la estimación de su similitud genética con las cepas aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.
- Determinar la distribución de la capacidad de resistencia a antimicrobianos entre las cepas de *E. coli* presuntamente patógenas presentes en las carnes y productos cárnicos listos para el consumo y entre las cepas de la misma especie involucradas en casos de gastroenteritis.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Toma de muestras.

2.1.1. Muestras de alimentos. Se analizaron 336 muestras procedentes de diversos productos cárnicos (carne fresca de diversas especies, productos listos para el consumo), adquiridos en varios supermercados de la ciudad de León cuyos productos tenían un origen (suministrador) diferente. Se llevaron a cabo muestreos regulares (toma de muestras semanal) en dos periodos de tiempo; uno durante la campaña 2008-2009 y otro durante la campaña 2009-2010. Estos muestreos han sido descritos en el capítulo de *Aeromonas*.

2.1.2. Muestras procedentes de pacientes de Hospital de León. Se aislaron 426 cepas de *E. coli* a partir de muestras procedentes de pacientes con gastroenteritis cedidas por el Hospital de León en el periodo de tiempo de marzo a mayo de 2011 ambos inclusive. Las muestras nos fueron enviadas en placas de *Sorbitol MacConkey Agar with Cefixime and Tellurite* (CT-SMAC, Oxoid).

2.2. Detección y aislamiento de *E. coli* (ISO 16654:2001).

2.2.1. Muestras de alimentos. A partir de 25 g del alimento, se realizaron homogeneizados en bolsa de Stomacher con 225 ml de *Modified Tryptone Soya Broth* (mTSB, Oxoid) suplementado con 1 ml de Novobiocina y se incubaron 24 horas a 41,5°C. A continuación, se procedió a la concentración del serotipo *E. coli* O157 mediante separación inmunomagnética, empleando partículas inmunomagnéticas de poliestireno comerciales en cuya superficie estaban inmovilizados anticuerpos específicos frente al serotipo O157 de *E. coli* (Dynabeads® anti-*E. coli* O157 Life Technologies S.A., Alcobendas, Madrid). Para realizar la separación inmunomagnética, se depositó en un tubo *ependorf* de 1,5 ml, 1 ml del caldo de enriquecimiento (mTSB) y se le añadieron 20 µl de *Dynabeads* (aproximadamente 2×10^6 partículas magnéticas), se agitaron en una noria durante 30 minutos y se colocó en una placa magnética durante tres minutos. A continuación, se

eliminó el sobrenadante con cuidado para evitar el arrastre de las partículas que estaban adheridas a la pared del tubo que contacta con la placa magnética. Se realizaron tres lavados con 1 ml de tampón fosfato (PBS, Oxoid) con un 0,5% de Tween 20, repitiendo tras cada lavado la agitación en la noria y la separación magnética (Invitrogen, disponible en <http://www.invitrogen.com/search/global/searchAction.action?query=dynabeads+anti-e.coli+o157&resultPage=1&resultsPerPage=15&autocomplete=true>). El precipitado final se resuspendió en 100 µl del tampón y se sembraron por duplicado 25 µl de la solución en dos medios selectivos que nos permitieron obtener colonias aisladas. Los medios utilizados fueron *Sorbitol MacConkey Agar with Cefixime and Tellurite* (CT-SMAC, Oxoid) y *O157:H7 ID-Medium* (Biomérieux). En el primero la presencia de sorbitol nos permitió diferenciar *E. coli* O157:H7 que forma colonias no coloreadas o semi-transparentes de las *E. coli* no-O157:H7 que tienen un color rojo-rosa. El segundo medio contiene dos sustratos cromogénicos: uno para la detección de β-D-Glucuronidasa y otro para la detección de β-D-Galactosidasa. Las cepas *E. coli* O157:H7 poseen únicamente actividad β-D-Glucuronidasa proporcionando, en este medio, colonias verde azuladas mientras las cepas no-O157:H7 poseen ambas actividades y obtenemos colonias moradas-rosáceas. Ambos cultivos se incubaron durante 24 horas a 37°C y a continuación, se procedió a la confirmación e identificación de las colonias sospechosas.

2.2.2. Muestras procedentes de pacientes de Hospital de León. Se enriquecieron las muestras recibidas en *Nutrient Broth* (Oxoid) durante 24 horas a 37°C y a continuación, se aislaron en el medio CT-SMAC descrito en el punto anterior siguiendo el mismo procedimiento.

2.3. Identificación de las cepas aisladas. De cada medio de cultivo se escogieron varias colonias típicas para su posterior identificación mediante pruebas bioquímicas (Harrigan, 1998). Las pruebas bioquímicas llevadas a cabo para la identificación de *E. coli* fueron las siguientes:

- Tinción de Gram (realizada según lo descrito en el capítulo de *Aeromonas*). *E. coli* es una bacteria Gram negativa.

- Oxidasa y catalasa (realizada según lo descrito en el capítulo de *Aeromonas*). Las cepas *E. coli* son oxidasa negativas y catalasa positivas.
- Fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa, con formación de ácido y gas, y detección de la producción de ácido sulfhídrico. Los resultados se obtuvieron a partir de las pruebas rápidas de identificación realizadas en TSI, descrita previamente, en el capítulo de *Salmonella*. *E. coli* es glucosa positiva y sacarosa y lactosa positiva.
- Presencia de la enzima lisina descarboxilasa (prueba descrita previamente en el capítulo de *Salmonella*). *E. coli* es capaz de descarboxilar la lisina, por lo tanto el medio se alcaliniza y no vira a amarillo.
- Citrato (realizada según el procedimiento descrito en el capítulo de *Salmonella*). *E. coli* no utiliza el citrato como fuente de carbono y por lo tanto el medio mantiene un color verdoso.
- Pruebas del Rojo de metilo y de Voges-Proskauer (realizada según el procedimiento descrito en el capítulo de *Salmonella*). *E. coli* es Rojo de Metilo positiva y Voges-Proskauer negativa.
- Indol (realizada según el procedimiento descrito en el capítulo de *Salmonella*). Las bacterias indol positivas como *Escherichia coli*, producen triptofanasa, una enzima que usa el triptófano produciendo indol y otros productos. Esta prueba permite diferenciar *E. coli* de otros grupos de enterobacterias ya que resulta positiva en un 99% de los casos (Nataro et al., 1998).

2.4. Búsqueda de los principales genes marcadores de virulencia asociados a *E. coli* O157:H7.

En todas las cepas con morfología característica de *E. coli* O157:H7 aisladas de los medios CT-SMAC y O157:H7 ID-Medium, se investigó la presencia de los genes que codifican para las toxinas Stx1 y Stx2, y para la intimina según se describe a continuación.

2.4.1. Extracción del ADN (realizada como se describe en el capítulo de *Aeromonas*).

2.4.2. Determinación de genes marcadores de virulencia. Utilizando métodos basados en la técnica de PCR se investigó, en las cepas previamente identificadas, la presencia de genes asociados a la patogenicidad (genes *stx1* y *stx2* así como el gen *eae*).

Se llevó a cabo la reacción en volúmenes finales de 50 µl por muestra que contenían:

- 20 µl Master Mix (5PRIME, VWR International Eurolab S.L. Barcelona, España)
- 1 µl cebador 1 (a una concentración de 250 nM), (XX Integrated DNA Technologies Inc).
- 1 µl cebador 2 (a una concentración de 250 nM), (XX Integrated DNA Technologies Inc).
- 23 µl agua destilada miliQ.
- 5 µl de la solución de ADN bacteriano.

Una vez preparada la mezcla de reacción se introdujo en un termociclador (*Mastercycler Eppendorf-Netheler-Hinz*) para realizar la amplificación. Las condiciones de la amplificación se señalan en la correspondiente referencia de la Tabla 1 para cada gen buscado.

Tabla 1. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en la PCR para la detección de los genes *stx1* y *stx 2*, así como del gen *eae* (Paton & Paton, 1998)

GENES	SECUENCIA (5'-3')	Unión al cebador (°C)	Tamaño del amplificado (pb)
<i>stx1</i> F <i>stx1</i> R	ATA AAT TGC CAT TCG TTG ACT AC AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	61	180
<i>stx2</i> F <i>stx2</i> R	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G		255
<i>eae</i> F <i>eae</i> R	GAC CCG GCA CAA GCA TAA CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	59	384

Aparte de las muestras de ADN sospechosas de poseer dichos genes de virulencia, se utilizaron tres controles:

- Control positivo: Bacteria previamente identificada poseedora de los genes de virulencia buscados. Utilizamos cepa *E. coli* CECT4076.
- Control negativo: Bacteria previamente identificada que no posee los genes que buscamos y sirve para comprobar la especificidad de la reacción. Se utilizó la cepa de colección CECT4315 de *Yersinia enterocolitica*.
- Blanco de reacción: Se sustituyó la muestra de ADN por agua destilada miliQ realizando el protocolo de la forma habitual.

La realización de la electroforesis y el registro de resultados se llevaron a cabo por el procedimiento ya descrito en el capítulo de *Aeromonas*.

2.4.3. Caracterización adicional de las cepas de *E. coli* productoras de Toxina(s) Shiga.

Con las cepas aisladas de pacientes de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital de León, que poseían alguno de los genes que codifican para las toxinas Stx1 y Stx2 o ambos, se llevaron a cabo varias pruebas de identificación más exhaustiva de sus marcadores de virulencia así como su serotipificación. Todas ellas se realizaron en el Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España).

Los marcadores de virulencia investigados mediante PCR fueron:

- Genes que codifican para las toxinas Shiga stx1 (VT1a y VT1b, Pollard, et al, 1990) y stx2 (SLTII1 y SLTII2, Olsen, et al, 1995) y los subtipos de estos genes (<http://www.ssi.dk/English/HealthdataandICT/NationalReferenceLaboratories/HW> O Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia* and *Klebsiella*.aspx).

-
- Genes que codifican para los antígenos O157 (somático O157rfbE, cebadores O157AF y O157AR) (Desmarchelier, et al, 1998), y H7 (flagelar fliCh7, cebadores flich7-F y flich7-R) (Gannon, et al, 1997).
 - Gen que codifica para la intimina (*eae*, SK1 y SK2, y su variante *eaeγ1*, AE19 y AE20) (Gannon, et al, 1993; Oswald, et al, 2000).
 - Genes que codifican para la enterohemolisina HlyA, cuyos cebadores son HlyA-a y HlyA-b (Wang, et al, 2002).
 - Genes que codifican para la subtilasa (*SubAB*, cebadores RTsubABF y RTsubABR) (Paton, et al, 2004) y sus dos variantes alélicas (*SubAB₁* y *SubAB₂*, cuyos cebadores son SubAF, RTsubABR y SubA-startF, RTsubABR, respectivamente), (Michelacci, et al, 2013), la adhesina autoaglutinante (*saa*, cuyos cebadores son SAADF y SAADR) (Paton & Paton, 2002) y el “toxigenic invasión loci A” (*tia*, cuyos cebadores son tia_lo y tia_sense) (Tozzoli, et al, 2010).

Las condiciones fundamentales de realización de las técnicas de amplificación para la búsqueda de dichos marcadores de virulencia se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción de los cebadores así como el tamaño de amplicones originados en la PCR para la detección de los genes marcadores de virulencia de las cepas de *E. coli* productoras de Toxina(s) Shiga.

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Referencias
VT1a VT1b	GAAGAGTCCGTGGGATTACG AGCGATGCAGCTATTAATAA	130	Pollard, et al., 1990
SLTIII1 SLTIII2	CTTCGGTATCCTATTCCCGG GGATGCATCTCTGGTCATTG	448	Olsen, et al, 1995
SK1 SK2	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	881	Oswald, et al, 2000
HlyA-a HlyA-b	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC	569	Wang, et al, 2002
O157AF O157AR	AAGATTGCGCTGAAGCCTTG CATTGGCATCGTGTGGACAG	497	Desmarchelier, et al, 1998
FLICH7-F FLICH7-R	GCGCTGTCGAGTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625	Gannon, et al, 1997
AE 19 AE 20	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA TCAGCGTGGTTGGATCAACCT	1087	Gannon, et al, 1993
SAADF SAADR	CGTGATGAACAGGCTATTGC ATGGACATGCCTGTGGCAAC	119	Paton & Paton, 2002
tia_lo tia_sense	TCCATGCGAAGTTGTTATCA TTCTCTTTTACCCTGCTTTTTCG	580	Tozzoli, et al, 2010
RTsubABF RTsubABR	GCAGATAAATACCCTTCACTTG ATCACCAGTCCACTCAGCC	230	Paton, et al, 2004
SubAF RTsubABR	GTACGGACTAACAGGGAAGT ATCACCAGTCCACTCAGCC	1300	Michelacci, et al, 2013
SubA-startF RTsubABR	CCCTGTAACATATTGACCAGCA ATCACCAGTCCACTCAGCC	1200	
stx1d-F1 stx1d-R1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA	203	Staten Serum Institute
stx2a-F2 stx2a-R3 stx2a-R2	GCGATACTGRGBACTGTGGCC CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG GGCCACCTTCACTGTGAATGTG	349 347	
stx2b-F1 stx2b-R1	AAATATGAAGAAGATATTGTAGCGGC CAGCAAATCCTGAACCTGACG	251	
stx2c-F1 stx2c-R2	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	177	
stx2d-F1 stx2d-R1 stx2d-R2	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG TTYCCGGCCACTTTTACTGTG GCCTGATGCACAGGTAAGGAC	179 280	
stx2e-F1 stx2e-R2	CGGAGTATCGGGGAGAGGC CTTCCTGACACCTCACAGTAAAGGT	411	
stx2f-F1 stx2f-R1	TGGGCGTCATTCCTGGTTG TAATGGCCGCCCTGTCTCC	424	
stx2g-F1 stx2g-R1	CACCGGTAGTTATATTCTGTGGATATC GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	573	

*Realizado en el Centro Nacional de Microbiología (Instituto Carlos III, Madrid)

2.4.4. Investigación de la presencia del gen que codifica para la fimbria BFP en las cepas de *E. coli* poseedoras del gen de la intimina (*eae+*), (Gunzburg et al., 1995)

Las condiciones de la PCR para la investigación de gen que codifica para la fimbria BFP en cuanto a sus cebadores y temperatura de actuación, así como el tamaño del amplicón resultante se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en la PCR para la detección del gen que codifica para la fimbria BFP (Gunzburg et al., 1995)

CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	Unión al cebador (°C)	Tamaño del amplificado (pb)
EP1-BFP	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	56	326
EP2-BFP	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		

Se utilizaron controles y blanco de reacción de igual forma que en el caso de la PCR para la investigación de los genes que codifican para las toxinas Shiga y para la intimina. La realización de la electroforesis y el registro de resultados se llevaron a cabo por el procedimiento ya descrito en el capítulo de *Aeromonas*.

2.6. Evaluación de la similitud genética entre las cepas de *E. coli* aisladas de los productos alimenticios antes mencionados y de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.

Se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), descrita en el capítulo de *Aeromonas* y cuyo protocolo se encuentra recogido en la página de <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx>, con ciertas modificaciones que se describen a continuación.

Tabla 4. Resumen de las condiciones de trabajo de la técnica PFGE realizada en las cepas de *E. coli* aisladas tanto de muestras de alimentos como de muestras de pacientes del Hospital de León

<i>Initial Switch Time</i>	6,76 s
<i>Final Switch Time</i>	35,38 s
Voltaje	6
<i>Included Angle</i>	120°
<i>Run Time</i>	19 horas

Los resultados fueron procesados del mismo modo en que ha sido descrito en el capítulo de *Aeromonas*.

2.7. Pruebas de resistencia a antimicrobianos. Se utilizó el método de referencia establecido por el “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) en el año 2005 mediante discos de difusión de cantidades conocidas de antimicrobianos. En el caso de *E. coli*, el antibiograma se llevó a cabo estudiando la susceptibilidad de las 23 cepas (13 de origen cárnico y 10 procedentes de casos gastroenteritis diagnosticados en el Hospital de León) que poseían el gen que codifica para la intimina (*eae*) sobre trece antimicrobianos cuyo nombre y concentración se recogen en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen de la batería de antimicrobianos utilizados en el análisis de posibles resistencias de cepas de *E. coli*.

Antimicrobiano	Abreviatura	Concentración (por disco en µg)
Ampicilina	AMP	10
Amoxicilina + Ácido clavulánico	AMC	30
Cefalotina	CEF	10
Ácido Nalidíxico	NA	30
Tetraciclina	TE	30
Gentamicina	CN	10
Kanamicina	K	30
Compuestos sulfonamidas	S3	300
Estreptomina	S	10
Ciprofloxacino	CIP	5
Cloranfenicol	C	30
Cefotaxima	CTX	30
Trimetoprima-sulfametoxazol	STX	25

Los antimicrobianos fueron suministrados por BioRad en formatos de 200 discos (4x50) por antibiótico.

Para llevar a cabo el antibiograma, se llevó a cabo el protocolo según se ha descrito en el capítulo correspondiente a *Aeromonas*, a excepción de que la incubación fue a 37°C. Para evaluar la posible resistencia o sensibilidad de cada cepa a cada antibiótico se utilizaron los límites establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* para enterobacterias, que se presentan en la tabla 2A de Winkler et al., (2005), y que se reproducen en la tabla 6.

Tabla 6. Criterios para evaluar el carácter de resistencia a antimicrobianos para enterobacterias establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (Winkler et al., 2005)

Antimicrobiano	Resistente*	Intermedio*	Sensible*
Ampicilina	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicilina + Ácido clavulánico	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefalotina	≤ 14	15-17	≥ 18
Ácido nalidíxico	≤ 13	14-18	≥ 19
Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamicina	≤ 13	14-17	≥ 18
Compuestos sulfonamidas	≤ 12	13-16	≥ 17
Estreptomina	≤ 11	12-14	≥ 15
Ciprofloxacino	≤ 15	16-20	≥ 21
Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
Trimetoprima-sulfametoxazol	≤ 10	11-15	≥ 16

*Diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Incidencia de *E. coli* productor de toxinas Shiga.

3.1.1. En muestras de alimentos.

Sobre un total de 336 muestras estudiadas, se aislaron 112 cepas sospechosas de ser *E. coli* O157:H7, procedentes de un total de 99 muestras (29,46%). La realización de las pruebas de identificación permitió adscribir al género *Escherichia* a 36 de las cepas aisladas, que presentaron el siguiente perfil fenotípico: tinción de Gram -, oxidasa -, catalasa +, glucosa +, lactosa y/o sacarosa +, descarboxilan la lisina, rojo de metilo + y Voges Proskauer -, indol + (no usa el triptófano) y citrato -. Genotípicamente los genes que codifican para las toxinas Shiga no fueron encontrados en ninguna de ellas, sin embargo el gen que codifica para la intimina, *eae*, fue encontrado en 13 cepas procedentes de 9 muestras, 4 de ellas (7 cepas) tomadas en invierno del 2008 y las otras 5 (6 cepas) en verano del 2010. De las cepas aisladas en invierno dos son sorbitol negativo mientras que de las aisladas en verano, 4 tienen esta característica.

En la tabla 7 se presenta la distribución de las cepas de *E. coli eae+* en función de los productos alimenticios y de la época de adquisición de los mismos.

Tabla 7. Prevalencia de cepas de *E. coli eae+* en diferentes muestras de carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo

Producto (n=nº muestras)	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO
Jamón cocido (n=48)	0	0	1 (1*)	0
Pechuga cocida de pavo (n=48)	0	0	1 (1*)	0
Mortadela (n=48)	4 (2*)	0	0	0
Chorizo (n=48)	2 (1*)	0	3 (2*)	0
Salchichón (n=48)	0	0	1 (1*)	0
Pechuga de pollo (n=48)	1 (1*)	0	0	0
Lomo fresco de cerdo (n=48)	0	0	0	0

* Número de muestras de las que proceden los aislados

Según los datos recogidos por la EFSA en el resumen del año 2010 sobre los casos de infecciones por STEC en la UE, se manifestó que la carne de aves de corral así como la de cerdo estuvieron implicadas en un 10,8% y 1,6% de los mismos, respectivamente (EFSA, 2012). De los casos en los que estuvieron involucradas carnes de aves de corral un 0,6% se produjo en España y un 0,1% de las cepas aisladas se correspondió con el serotipo O157. Sin embargo, en el caso de las cepas de origen porcino fueron aisladas en su totalidad en casos de infección por STEC en España y un 1,4% de ellas se identificaron con el serotipo O157 (EFSA, 2012).

La incidencia de *E. coli* no fue superior en las carnes frescas que en los productos listos para el consumo, que sería el resultado esperado, teniendo en cuenta que los productos listos para el consumo sufren un tratamiento tecnológico, bien de calor en el caso de los productos cocidos o bien de curado en el caso del chorizo y el salchichón.

En los últimos años se han producido varios brotes provocados por *E. coli* STEC en los que estuvieron implicados productos cárnicos listos para el consumo (Conedera et al., 2007; Sartz et al., 2008; Schimmer et al., 2008; Sekse et al., 2009; Holck et al., 2011), en su mayor parte asociados a embutidos en cuya elaboración se había empleado carne de vacuno. En la revisión bibliográfica realizada no hemos encontrado datos significativos en relación con la prevalencia de *E. coli* STEC en carnes de cerdo o en productos cárnicos elaborados con carnes diferentes de las de los rumiantes.

Por otra parte, la información relativa a la posible presencia simultánea de cepas STEC y EPEC en productos cárnicos aunque escasa (Alonso et al., 2012), pone de manifiesto que tal posibilidad es poco frecuente.

3.1.2. En pacientes del Hospital de León.

De las 426 muestras procedentes de casos de gastroenteritis diagnosticados, se obtuvieron 4 cepas productoras de toxinas Shiga y 10 cepas de *E. coli eae* + no productoras de toxinas Shiga. Las cepas productoras de toxinas Shiga fueron caracterizadas y serotipadas en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) y los resultados de dichas pruebas se recogen en la tabla 8.

La frecuencia de aislamiento de *E. coli* STEC en casos de gastroenteritis diagnosticados en el Hospital de León en el período objeto de este estudio (0,94%) es significativamente superior a la recogida en el Servicio de Información Microbiológica. En éste, que se elabora a partir de los datos suministrados por 55 laboratorios de 12 Comunidades Autónomas, durante los años 2010, 2011 y 2012 se registraron 66 aislamientos de *E. coli* STEC entre 32684 casos de gastroenteritis por bacterias (prevalencia de 0,20%).

Tal y como se señaló previamente, la prevalencia de *E. coli* STEC en los productos cárnicos objeto de este estudio no justifica esta importante tasa de prevalencia del agente en los casos humanos de gastroenteritis.

Tabla 8. Resumen de los genes marcadores de virulencia de las cepas clínicas productoras de toxinas Shiga de origen clínico y su serotipificación.

CEPA	Fecha aislamiento	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	Subtipos <i>Stx</i>	<i>Eae</i>	Hly A	Saa	SubAB	tia	Serotipo
EPEC59	18/03/2011	-	+	<i>Stx2b</i>	-	+	-	+	+	O146:H21
EPEC65	18/03/2011	+	-	<i>Stx1a</i>	+	+	-	-	-	O26:H11
EPEC74	18/03/2011	+	-	<i>Stx1c</i>	-	+	-	-	-	ND*
EPEC180	01/04/2011	+	-	<i>Stx1a</i>	+	+	-	-	-	ND*

*ND, significa no determinado.

Ninguna de las cuatro cepas productoras de Toxina(s) Shiga amplificó los genes que codifican para los antígenos O157 y H7.

Según los datos del Servicio de Información Microbiológica recogidos durante los años 2010, 2011 y 2012, la prevalencia de cepas STEC no-O157 es muy baja, 0,012%, con respecto al número de casos totales de casos de gastroenteritis diagnosticados en 55 laboratorios pertenecientes a 12 CCAA.

La cepa de *E. coli*, denominada EPEC65, se asoció al serotipo O26:H11 que como ya comentamos anteriormente (Blanco et al., 2003) es uno de los más prevalentes en el desarrollo de Colitis Hemorrágicas y SUH en humanos. Sin embargo, el serotipo O146:H21, correspondiente a la cepa de *E. coli* denominada EPEC59, se aisló con mayor frecuencia en ovejas (Blanco et al., 2003). Esta cepa posee el gen que codifica para la Stx2, el cual según ha sido sugerido por datos epidemiológicos posee una importancia patogénica superior a la Stx1 en el desarrollo de SUH (Boyce et al., 1995). Sin embargo, no tenemos datos sobre si los pacientes portadores de dichas cepas desarrollaron Colitis Hemorrágica o Síndrome Urémico Hemolítico.

Por otra parte, aunque sabemos que las cepas STEC *eae+* pueden ser más patógenas (Yu et al., 1992), el aislamiento de cepas STEC *eae-* (tabla 8), pone de manifiesto que las cepas *eae-* son significativas como agentes de gastroenteritis.

Las 10 cepas no productoras de toxinas Shiga y sí con el gen *eae* que codifica para la intimina presuponemos que pertenecen al patotipo Enteropatógeno y la no presencia del BFP nos indica que pertenecen al subtipo atípico (Trabulsi et al., 2002). Su perfil fenotípico permitió adscribirlas a género y la única diferencia bioquímica entre ellas era que cinco fueron sorbitol positivo y cinco sorbitol negativo.

Las cepas de aEPEC están estrechamente relacionadas con las cepas de *E. coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en características genéticas, serotipos, producción de toxinas, reservorio y otros factores epidemiológicos (Trabulsi et al., 2002). Aunque sus mecanismos de patogenicidad no se conocen en su totalidad, las cepas de aEPEC están emergiendo como patógenos en países desarrollados (Trabulsi et al., 2002).

3.2. Resistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas de *E. coli* Enteropatógeno

En la tabla 9 se presenta a frecuencia de resistencia a los distintos antimicrobianos de las cepas de *E. coli eae+* en función de su origen (alimentos o casos clínicos).

Tabla 9. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de *E. coli eae+* procedentes de carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo y de casos clínicos.

Antimicrobiano	Alimentos			Casos clínicos		
	R*	I*	S*	R*	I*	S*
Ampicilina	46,15	0	53,85	30	0	70
Amoxicilina + Ácido clavulánico	7,70	0	92,30	0	0	100
Cefalotina	46,15	0	53,85	0	0	100
Ácido nalidíxico	61,53	0	38,47	30	0	70
Tetraciclina	61,53	0	38,47	30	0	70
Gentamicina	15,38	0	84,62	10	0	90
Kanamicina	23,07	0	76,93	30	0	70
Compuestos sulfonamidas	38,46	0	61,54	10	0	90
Estreptomina	61,53	0	38,47	30	0	70
Ciprofloxacino	38,46	0	61,54	0	0	100
Cloranfenicol	30,77	0	69,23	0	0	100
Cefotaxima	30,77	0	69,23	0	0	100
Trimetoprima-sulfametoxazol	53,84	0	46,16	10	0	90

*Porcentaje de cepas R=Resistente, I=Intermedia y S=Sensible.

Los mayores porcentajes de resistencia a compuestos antimicrobianos aparecieron en las cepas de origen alimentario, y fueron resistencias al ácido nalidíxico, tetraciclina y estreptomina (61,53%, Tabla 7), seguido de trimetoprima-sulfametoxazol (53,84%) y ampicilina y cefalotina (46,15%). Por otra parte en las cepas de origen clínico, obtuvimos resultados muy diferentes, ya que todas ellas fueron susceptibles a la mezcla de amoxicilina con ácido clavulánico, cefalotina, ciprofloxacino, cloranfenicol y cefotaxima (tabla7). Los mayores porcentajes de resistencia de las cepas clínicas se mostraron ante ampicilina, ácido nalidíxico, tetraciclina, estreptomina y kanamicina (30%, tabla 7).

Los resultados obtenidos nos muestran una heterogeneidad de perfiles de resistencia que indica que los niveles de multiresistencia son muy superiores en las cepas de origen alimenticio. Cabe destacar que tenemos 7 cepas que muestran susceptibilidad a la totalidad de los antimicrobianos probados. De estas 7 cepas, tres son de origen cárnico (no se relacionan ni en producto de procedencia ni en época de aislamiento) y cuatro clínicas, todas ellas fenotípicamente idénticas salvo por el sorbitol, negativo en todos los casos salvo en la cepa EPEC156.

Los perfiles de multirresistencia encontrados tanto en cepas procedentes de carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo como en las cepas de origen clínico se recogen en la tabla 10.

Tabla 10. Perfiles de multirresistencia a antimicrobianos mostrados por las cepas de *E. coli eae+*.

Cepa	Origen	AMP	S	KF	NA	CTX	TE	AMC	SXT	CN	CIP	K	C	S3
E2	Mortadela	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S
E5	Pechuga de pollo	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R
E29	Chorizo	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R
E103	Pechuga de pavo	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R
E105	Salchichón	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R
E109	Chorizo	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R
EPEC322	Clínico	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R

No se muestra un perfil de resistencia mayoritario debido a la existencia de una gran variabilidad, sobre la cual cabe destacar las cepas E103 y E109 aisladas de muestras de pechuga de pavo y chorizo en el periodo de verano del 2010 respectivamente y que son idénticas fenotípicamente, comparten un perfil de resistencia a antimicrobianos (tabla 10) y son similares en un 87,8% en la comparación de sus perfiles de PFGE tal y como se señala más adelante.

Además de estas dos cepas multirresistentes, nos encontramos con otras cinco cepas de *E. coli eae+* que muestran perfiles de resistencias elevados aunque heterogéneos, cuatro de ellas de origen alimenticio y una de origen clínico (tabla 10).

Cabe destacar que los perfiles de resistencia a antimicrobianos de las cepas que provienen de la misma muestra no son idénticos, es más, en el caso de las cepas E109 y E110 (aisladas de chorizo), la primera es resistente a todos los antimicrobianos probados salvo a amoxicilina clavulánico, gentamicina y kanamicina, mientras que la cepa E110 es susceptible a todos ellos.

El informe de resistencia a antibióticos de los principales microorganismos patógenos durante el año 2010 publicado por la EFSA en 2012, mostró los datos recogidos únicamente por Dinamarca y Suecia para cepas STEC. Estos datos revelan la existencia de

una resistencia moderada a sulfonamidas (15% y 17%, respectivamente), a ampicilina (16% y 10%, respectivamente), a tetraciclina (13% y 8%, respectivamente) y a estreptomycin (15% y 4%, respectivamente) en cepas aisladas de carne de pollo. Mientras que en las cepas aisladas de carne de cerdo, los datos de resistencias únicamente proceden de Dinamarca y muestran resistencias importantes a estreptomycin (38%), ampicilina y tetraciclina (24%), sulfonamidas (19%) y trimetoprima-sulfametoxazol (16%).

Por otra parte, es necesario reseñar que los informes emitidos tanto por la EFSA como por el Sistema de Información Microbiológica no muestran datos referentes a casos y/o brotes producidos por *E. coli* Enteropatógeno, ni a su resistencia a antimicrobianos.

Los resultados obtenidos, a pesar de que las pocas cepas aisladas no son *E. coli* STEC, muestran que los porcentajes de resistencia a antimicrobianos son elevados, comparativamente con los datos emitidos por la EFSA en el año 2010 (EFSA, 2012).

La adquisición de resistencias a compuestos antimicrobianos está mediada por muchos factores, liderados por el uso abusivo de los mismos en medicina humana y animal, nutrición animal y agricultura (Baum et al., 2005), esto explica por ejemplo la aparición de resistencias al cloranfenicol (30,77% de las cepas aisladas de alimentos frente al 0% de las clínicas, tabla 9) cuando es un antibiótico cuyo uso en producción animal no está permitido en España (Álvarez-Fernández et al., 2012). Se han llevado a cabo numerosos estudios acerca del impacto que supone la difusión de la adquisición de dichas resistencias en bacterias patógenas pero existe mucha menos información acerca de las consecuencias en bacterias comensales, como es el caso de *E. coli* en el tracto gastrointestinal tanto humano como animal, y que pueden suponer un importante medio aceptor y donador de genes que codifican para las resistencias a los antimicrobianos (Sáenz et al., 2001). La inclusión de varios de estos genes en integrones constituye un método efectivo de difusión de resistencias entre bacterias procedentes de varios ecosistemas (Sáenz et al., 2004). En *Enterobacteriaceae* los mecanismos principales de adquisición de resistencias residen en los elementos genéticos móviles en concreto los integrones de clase I y las mutaciones (Baum et al., 2005).

Según un estudio acerca de la prevalencia de *E. coli* resistentes a antimicrobianos, se asume que la población general supone un gran reservorio de dichas bacterias resistentes (Erb et al., 2007) pero existen pocos informes sobre el particular. Se ha señalado que existe

una mayor prevalencia de bacterias resistentes a antimicrobianos en México, Turquía y España, lo cual se relaciona con las diferencias en la prescripción de los mismos, en su disponibilidad de venta, la legislación en medicina veterinaria y la higiene en las medidas de control (Erb et al., 2007).

En medicina humana no existe un consenso acerca de la terapia antimicrobiana en pacientes con cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga. Wong et al., en el año 2000, describe la existencia de un riesgo en niños que reciben tratamiento antibiótico en el desarrollo de SUH con *E. coli* O157:H7. En el estudio de Zhang et al., en el 2000, se muestra un aumento de expresión de las toxinas Shiga en ratones tratados con quinolonas. Sin embargo, otros autores sugieren que una terapia antibiótica en momentos tempranos de la infección puede frenar su curso.

Un problema añadido es el caso del uso de antimicrobianos en la producción animal, que se ha considerado como uno de los posibles conductos para la adquisición humana de bacterias resistentes a antimicrobianos, aunque los antimicrobianos utilizados en medicina veterinaria suelen diferir de los utilizados en la medicina humana (Khachatourians 1998). A pesar de las diferencias, medicamentos antimicrobianos utilizados para la terapia humana a menudo tienen importantes similitudes estructurales a los utilizados en producción animal (Saénz et al., 2001). Por ejemplo, la resistencia a la apramicina, un medicamento veterinario, podría fomentar la resistencia a la gentamicina, un compuesto estructuralmente similar que se especifica para uso en seres humanos (Mathew et al. 2003). Según lo establecido en el trabajo llevado a cabo por Sáenz et al., en 2001, los niveles de resistencia a gentamicina en *broilers* y productos alimenticios derivados son muy superiores a los establecidos en cerdos, y la existencia de diferentes perfiles en muestras de cerdo pueden explicarse por las diferencias individuales en cuanto a edad en el matadero (Sáenz et al., 2001). Nuestras muestras resistentes a gentamicina (tabla 9) se corresponden con una muestra de mortadela, una de salchichón y una muestra clínica de heces.

Lo mismo ocurre con el ciprofloxacino, las tetraciclinas y ampicilina debido al uso de enrofloxacino en medicina veterinaria en pavos y *broilers* en mayor proporción que en cerdos. Esto provoca la aparición de resistencias a ciprofloxacino, tetraciclina y ampicilina en estos animales así como en los productos alimenticios derivados (Sáenz et al., 2001), lo que podría justificar los datos de dos de nuestras cepas resistentes (tabla 10) que proceden de pechuga de pollo (E5) y de pechuga de pavo (E103). Sin embargo, también hemos

encontrado estas resistencias en muestras de origen porcino, cepas E104 y E109 (tabla 10), cuya resistencia suponemos que puede deberse a una transmisión de genes que codifiquen para ella.

Varios estudios llevados a cabo en años recientes demuestran la existencia de una gran variabilidad de perfiles y que la causa de los mismos reside en la presencia de elementos genéticos móviles principalmente, pero que no podemos infravalorar la importancia de los factores ambientales cuyos cambios pueden modificar la expresión de los genes que codifican para dichas resistencias (Graves et al., 2011; Han et al., 2013; Maal-Bared et al., 2013).

En el año 2000, la OMS propuso una actuación, “Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food” para evitar el uso abusivo de los mismos como aditivos en alimentación animal y sugirió estrategias alternativas como vacunación en masa de recién nacidos, nuevos sistemas de alimentación y mejora las prácticas de manejo (McEwen and Fedorka-Cray, 2002).

3.5. Evaluación de la similitud genética entre las cepas aisladas de los productos alimenticios sobre los que se realiza el estudio y las aisladas de casos de gastroenteritis en hospitales de la misma localidad de venta de los alimentos.

Los resultados que se obtuvieron al realizar el PFGE mostraron un dendrograma compuesto por seis grupos (nombrados con números romanos) y cuatro cepas no agrupadas a un porcentaje de similitud del 80% tomando como referencia el “Coeficiente de Dice”. Dicho dendrograma se muestra en la figura 1. Todos los grupos salvo el grupo I se componen bien de cepas de origen clínico o bien de origen alimentario.

Los cinco primeros grupos se parecen entre sí con un porcentaje del 71,1 % y todos ellos se asemejan al grupo VI en un 65 % (figura 1).

El grupo I se compone de una cepa de origen clínico que se parece a cinco cepas de origen cárnico en un 81%. La única diferencia entre ellas en cuanto a características fenotípicas es que la cepa E25 procedente de una muestra de mortadela aislada en invierno del 2008 es sorbitol negativo. Las cepas E25, E26 y E27 proceden de la misma muestra de mortadela y se diferencian por la morfología de las colonias, en su perfil de resistencia a

antimicrobianos, así como porque E25 es sorbitol negativo, como ya se comentó anteriormente (figura 1).

Las cepas E27 y E28 son idénticas en su perfil de PFGE y prácticamente idénticas en su perfil de resistencia a antimicrobianos pero proceden de muestras diferentes. Estas cepas se parecen en un 93,8% a la E26 (procede de la misma muestra que E27). Estas tres cepas de origen cárnico se parecen a la cepa C294 de origen clínico en un 84,3% diferenciándose únicamente en 2 bandas. Las cepas mencionadas se parecen en un 81% con las otras dos cepas de origen alimenticio, E2 y E25, que cierran el grupo I.

El grupo I se parece en un 74,1% a una cepa de origen clínico no agrupada al nivel de similitud del 80% en PFGE. Dicha cepa, denominada EPEC322, es idéntica fenotípicamente a las cepas que conforman el grupo I y es sorbitol positiva. Su perfil de resistencia a antimicrobianos no muestra una relación idéntica con los anteriores pero comparte varias resistencias con el resto de cepas, por ejemplo con E29 que es resistente a los mismos antimicrobianos que EPEC322, entre otros (tabla 10).

El grupo II está compuesto por dos cepas sorbitol positivo aisladas de muestras diferentes de pechuga de pavo y chorizo, respectivamente (porcentaje de similitud 87,8%, una única banda de diferencia). Estas cepas comparten un perfil idéntico de multirresistencia a antimicrobiano (tabla 10).

El grupo III está formado por tres cepas sorbitol negativo de origen clínico idénticas. Las cepas son EPEC171 y EPEC196 pertenecen al mismo paciente tomadas en semanas consecutivas, y a su vez son idénticas a la cepa EPEC198 (procedente de un paciente diferente) lo cual podríamos suponer que puede significar que ambos pacientes están relacionados bien por parentesco o por coincidencia en restauración colectiva. Los perfiles de resistencias de las tres cepas muestran sensibilidad absoluta a los antimicrobianos testados, por lo que suponemos que no existió ninguna complicación en el tratamiento del paciente.

Los grupos II y III se parecen entre sí un 74,7%, mientras que sus características en lo que respecta a resistencia a antimicrobianos no coinciden, ya que las cepas del grupo III son susceptibles a la totalidad de los antimicrobianos probados.

El grupo IV contiene dos cepas sorbitol negativo de origen cárnico, E29 y E104 (ambas aisladas de muestras de chorizo, una de ellas aislada en invierno del 2008 y la otra en verano del 2010). Dichas cepas se parecen entre sí en un 80%, pero su perfil de resistencia a antimicrobianos solo muestra resistencia común a ampicilina y estreptomicina (tablas 9 y 10).

La cepa E29 fue aislada de la misma muestra que la cepa E28 incluida en el grupo I, y se parecen con porcentaje del 71,1% (figura 1) y comparten resistencias a estreptomicina, ácido nalidíxico, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol.

Estas cepas se parecen a su vez en un 76,7% con la cepa E5 aislada de pechuga de pollo, que comparte resistencia a ampicilina y ciprofloxacino con la cepa E104, mientras que con la cepa E29 comparte la resistencia a ampicilina, cefalotina, ácido nalidíxico, tetraciclina y sulfonamidas (tabla 10).

El grupo V está formado por tres cepas aisladas de pacientes diferentes con gastroenteritis diagnosticados en el Hospital de León que se parecen entre sí un 80,6% según su perfil de PFGE (figura 1) y cuyo perfil de resistencia a antibióticos es muy diferente, ya que la cepa EPEC156 es susceptible a todos ellos, mientras que la EPEC212 es resistente a ampicilina y tetraciclina y la EPEC289 además de a esos dos antimicrobianos, lo es a ácido nalidíxico y estreptomicina.

Los grupos IV y V, compuestos de cepas de origen cárnico y de origen clínico respectivamente, se parecen entre sí en un 72,9%.

El grupo VI está compuesto por tres cepas de origen cárnico sorbitol negativo (jamón cocido E102, chorizo E110 y salchichón E105) aisladas en el periodo de verano del 2010, y entre la E102 y la E110 existen dos bandas de diferencia que constituyen un porcentaje de similitud del 92,9%, y se diferencian en 4 y dos bandas respectivamente con la E105 (88,1%). Las cepas E102 y E110 muestran sensibilidad absoluta a los antimicrobianos probados mientras que E105 es una cepa multirresistente (cefalotina, ácido nalidíxico, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, ciprofloxacino, kanamicina, cloranfenicol y sulfonamidas), (tabla 10).

Las otras dos cepas, denominadas EPEC147 y EPEC22 que no se incluyen en los grupos con porcentaje de similitud del 80% se aislaron de pacientes diferentes y comparten la resistencia a kanamicina. Además, la cepa EPEC22 es resistente a gentamicina.

Como conclusión, cabe destacar que no fueron encontradas coincidencias reseñables entre los perfiles de PFGE y los de resistencia a antimicrobianos.

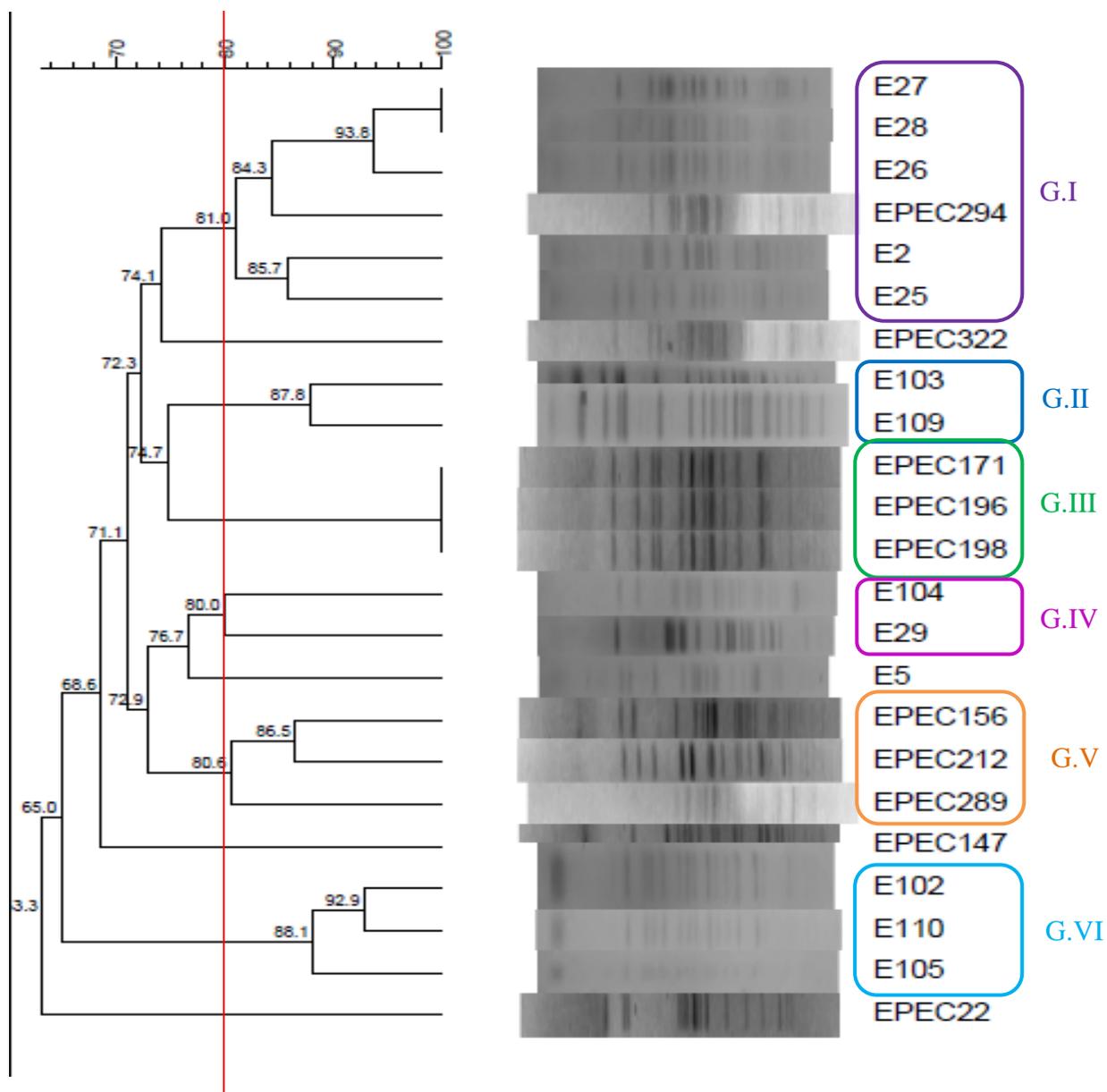


Figura 1. Dendrograma resultado de la realización de la técnica de PFGE sobre las cepas de *E. coli* Enteropatógeno aisladas de alimentos (E) y de origen clínico (EPEC).

4. CONCLUSIONES.

La baja prevalencia de STEC en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León es tranquilizante en términos sanitarios, y no parece ser responsable de la elevada incidencia de STEC en casos de gastroenteritis diagnosticados en la ciudad de León, que es notablemente superior a la media nacional.

La presencia de cepas de *E. coli* portadoras del gen de la intimina (*eae+*) en todos los tipos de productos cárnicos listos para el consumo estudiados, junto con la elevada capacidad de estas cepas de resistir la acción de diversos antimicrobianos es en principio preocupante, si bien, la importancia sanitaria de este hallazgo previsiblemente tiene un carácter leve pues las cepas de *E. coli eae+* aisladas de alimentos y las aisladas de casos de gastroenteritis diagnosticados en la misma localidad son sustancialmente diferentes en términos genéticos y de resistencia a antimicrobianos.

Determinados clones de *E. coli eae+* están particularmente extendidos, como lo prueba que alguno pueda ser aislado en productos diferentes (como chorizo y mortadela de distintos suministradores y comercialización diferenciada) y que alguno se aísle de pacientes no relacionados epidemiológicamente.

5. BIBLIOGRAFIA.

1. Álvarez-Fernández, E., Domínguez-Rodríguez, J., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of housing systems on microbial load and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from eggs produced for human consumption. *Journal of Food Protection*, 75(5), 847-853.
2. Bell, B. P., Griffin, P. M., Lozano, P., Christie, D. L., Kobayashi, J. M., & Tarr, P. I. (1997). Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics*, 100(1), e12-e12.
3. Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S., & Scheutz, F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(9), 2483-2488.
4. Beutin, L. (2006). Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(7), 299-305.
5. Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Karch, H. (2011). Characterization of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of Haemolytic Uremic Syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(9), 671-676.
6. Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Alonso, M., González, E., & Bernárdez, M. (2002). Enterobacterias: Características generales. género *Escherichia*. *Manual De Microbiología Veterinaria*, 301-325.
7. Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M., & Blanco, J. (2004). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga Toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 311-319.
8. Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M., González, E., Blanco, J. (2004). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga Toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-ξ). *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 645-651.
9. Blanco, M., Padola, N. L., Krüger, A., Sanz, M. E., Blanco, J. E., González, E. A., Etcheverría, A. I. (2004). Virulence genes and intimin types of Shiga-Toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology*, 7(4), 269-276.
10. Blanco, J., Alonso, M. P., Blanco, M., & González, E. A. (1991). Pathogenic mechanisms of *E. coli* strains that produces extra-intestinal infections. [Mecanismos de patogénesis de *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 9(10), 640-651.
11. Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., González, E. A., Bernárdez, M. I., Usera, M. A. (2003). Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental Biology and Medicine*, 228(4), 345-351.

12. Blanco, J., Cid, D., Blanco, J. E., Blanco, M., Ruiz Santa Quiteira, J. A., & De La Fuente, R. (1996). Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs in Spain. *Veterinary Microbiology*, 49(3-4), 209-217.
13. Blanco, J., González, E. A., Blanco, M., Garabal, J. I., Alonso, M. P., Fernández, S., Guinee, P. A. M. (1991). Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with infant diarrhoea in Galicia, north-western Spain. *Journal of Medical Microbiology*, 35(3), 162-167.
14. Blanco, J., González, E. A., Espinosa, P., Blanco, M., Garabal, J. I., & Alonso, M. P. (1992). Enterotoxigenic and necrotizing *Escherichia coli* in human diarrhoea in Spain. *European Journal of Epidemiology*, 8(4), 548-552.
15. Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (1995). Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxicogenic *Escherichia coli* in food and clinical samples. Role of animals as reservoirs of strains pathogenic for humans. *Microbiología SEM*, 11(1), 97-110.
16. Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Rioja, L., & Duchá, J. (1994). Serotypes, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic and healthy rabbits in Spain. *Veterinary Microbiology*, 38(3), 193-201.
17. Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J. E., Alonso, M. P., Abalia, I., Rodríguez, E., Umanan, A. (1995). Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from community acquired urinary tract infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 13(4), 236-241.
18. Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J. E., González, E. A., Garabal, J. I., Cantalapiedra, A., & Goicoa, A. (1993). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from calves. *Medicina Veterinaria*, 10(3), 154+156-158+160+162.
19. Blanco, M., Blanco, J. E., & Blanco, J. (1993). Toxic properties of enteroinvasive *Escherichia coli*. [Propiedades tóxicas de los *Escherichia coli* enteroinvasivos.] *Microbiología SEM*, 9(2), 149-152.
20. Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., González, E. A., Alonso, M. P., Maas, H., & Jansen, W. H. (1996). Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *European Journal of Epidemiology*, 12(1), 13-19.
21. Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Mora, A., Prado, C., Alonso, M. P., Juárez, A. (1997). Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary Microbiology*, 54(3-4), 309-319.
22. Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., & Blanco, J. (1996). Avian septicemic *Escherichia coli*: Serotypes, virulence factors, antibiotic resistance and vaccination. *Medicina Veterinaria*, 13(10), 525-526+529.
23. Boyce, T. G., Swerdlow, D. L., & Griffin, P. M. (1995). *Escherichia coli* O157: H7 and the hemolytic-uremic syndrome. *New England Journal of Medicine*, 333(6), 364-368.
24. Brunder, W., Schmidt, H., & Karch, H. (1996). KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, 142(11), 3305-3315.
25. Buteau, C., Proulx, F., Chaibou, M., Raymond, D., Clermont, M., Mariscalco, M. M., Seidman, E. (2000). Leukocytosis in children with *Escherichia coli* O157:H7 enteritis developing the Hemolytic-Uremic Syndrome. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 19(7), 642-647.

26. Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A. K., Harvey, B., Hockin, J. C., Karmali, M. A., Lior, H. (1987). A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated Hemorrhagic Colitis in a nursing home. *New England Journal of Medicine*, 317(24), 1496-1500.
27. Cimolai, N., Basalyga, S., Mah, D. G., Morrison, B. J., & Carter, J. E. (1994). A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Clinical Nephrology*, 42(2), 85-89.
28. Conedera, G., Mattiazzi, E., Russo, F., Chiesa, E., Scorzato, I., Grandesso, S., Caprioli, A. (2007). Short report: A family outbreak of *Escherichia coli* O157 Haemorrhagic Colitis caused by pork meat salami. *Epidemiology and Infection*, 135(2), 311-314.
29. Cortés, M. C. (2007). El ganado caprino como reservorio de bacterias enteropatógenas potencialmente zoonóticas. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid).
30. Delicato, E. R., De Brito, B. G., Gaziri, L. C. J., & Vidotto, M. C. (2003). Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, 94(2), 97-103.
31. Desmarchelier, P. M., Bilge, S. S., Fegan, N., Mills, L., Vary, J. C., & Tarr, P. I. (1998). A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the rfb locus encoding O157 lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), 1801-1804.
32. Donnenberg, M. S., Tacket, C. O., James, S. P., Losonsky, G., Nataro, J. P., Wasserman, S. S., Levine, M. M. (1993). Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Journal of Clinical Investigation*, 92(3), 1412-1417.
33. Donnenberg, M. S., Tzipori, S., McKee, M. L., O'Brien, A. D., Alroy, J., & Kaper, J. B. (1993). The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *Journal of Clinical Investigation*, 92(3), 1418-1424.
34. Donnenberg, M. S., Yu, J., & Kaper, J. B. (1993). A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, 175(15), 4670-4680.
35. Dytoc, M. T., Ismaili, A., Philpott, D. J., Soni, R., Brunton, J. L., & Sherman, P. M. (1994). Distinct binding properties of *eaeA*-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infection and Immunity*, 62(8), 3494-3505.
36. EFSA. (2012). Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2010. Disponible en <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120308.htm>, último acceso en mayo 2013.
37. EFSA. (2012). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal* 2012; 10(3):2598.
38. Elizaguível, P., Sánchez, G., & Aznar, R. (2011). *Escherichia*. In D. Liu (Ed.), *Molecular detection of human bacterial pathogens* (pp. 869) CRC Press, Boca-Raton, Florida (USA).
39. Erb, A., Stürmer, T., Marre, R., & Brenner, H. (2007). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: Overview of geographical, temporal, and methodological variations. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(2), 83-90.

40. Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H., & Wieler, L. H. (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 49(2), 269-273.
41. Gannon, V., Rashed, M., King, R. K., & Thomas, E. (1993). Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1268-1274.
42. Gannon, V., D'souza, S., Graham, T., King, R., Rahn, K., & Read, S. (1997). Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3), 656-662.
43. Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*, 73(5), 2573-2585.
44. Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Taxonomic Outline of the Prokaryotes: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 439-447.
45. Graves, A. K., Liwimbi, L., Israel, D. W., van Heugten, E., Robinson, B., Cahoon, C. W., & Lubbers, J. F. (2011). Distribution of ten antibiotic resistance genes in *E. coli* isolates from swine manure, lagoon effluent and soil collected from a lagoon waste application field. *Folia Microbiologica*, 56(2), 131-137.
46. Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G., & Riley, L. W. (1995). Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(5), 1375-1377.
47. Han, N., Zhang, S., Wang, P., & Wang, C. (2013). Characterization of antibiotic resistance *E. coli* and antibiotic resistance genes in aquatic environment of taihu lake, China. *Applied Mechanics and Materials*, 295, 630-634.
48. Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology* Academic Pr., London.
49. Hernandez, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A. M., & Gomes, T. A. T. (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 297(2), 137-149.
50. Holck, A. L., Axelsson, L., Rode, T. M., Høy, M., Måge, I., Alvseike, O., Heir, E. (2011). Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. *Meat Science*, 89(3), 286-295.
51. Invitrogen. Disponible en <http://www.invitrogen.com/search/global/searchAction.action?query=dynabeads+anti-e.coli+o157&resultPage=1&resultsPerPage=15&autocomplete=true>, último acceso mayo 2013.
52. ISO. (2001). In ISO (Ed.), ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO, Ginebra, Suiza.
53. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
54. Kaplan, B. S., Cleary, T. G., & Obrig, T. G. (1990). Recent advances in understanding the pathogenesis of the Hemolytic Uremic Syndromes. *Pediatric Nephrology*, 4(3), 276-283.
55. Karmali, M. A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(1), 15-38.

56. Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., & Steele, B. T. (1983). *Escherichia coli* cytotoxin, Haemolytic-Uraemic Syndrome, and Haemorrhagic Colitis. *Lancet*, 2(8362), 1299-1300.
57. Khachatourians, G. G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Cmaj*, 159(9), 1129-1136.
58. Konowalchuk, J., Speirs, J., & Stavric, S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 18(3), 775-779.
59. Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases*, 155(3), 377-389.
60. Levine, M. M., Xu, J., Kaper, J. B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Wachsmuth, K. (1987). A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 156(1), 175-182.
61. Liu, D. (2011). *Molecular detection of human bacterial pathogens* CRC Press., Boca-Raton, Florida (USA).
62. Louise, C. B., & Obrig, T. G. (1995). Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *Journal of Infectious Diseases*, 172(5), 1397-1401.
63. Maal-Bared, R., Bartlett, K. H., Bowie, W. R., & Hall, E. R. (2013). Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Science of the Total Environment*, 443, 315-323.
64. Margall, N., Domínguez, Á., Prats, G., & Salleras, L. (1997). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. [*Escherichia coli* Enterohemorrágico] *Revista Española De Salud Pública*, 71(5), 437-443.
65. Mathew, A. G., Arnett, D. B., Cullen, P., & Ebner, P. D. (2003). Characterization of resistance patterns and detection of apramycin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from swine exposed to various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 89(1), 11-20.
66. McEwen, S. A., & Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34(SUPPL. 3), S93-S106.
67. McKee, M. L., Melton-Celsa, A. R., Moxley, R. A., Francis, D. H., & O'Brien, A. D. (1995). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, 63(9), 3739-3744.
68. McKee, M. L., & O'Brien, A. D. (1995). Investigation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. *Infection and Immunity*, 63(5), 2070-2074.
69. McKee, M. L., & O'Brien, A. D. (1996). Truncated Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 intimin (EaeA) fusion proteins promote adherence of EHEC strains to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, 64(6), 2225-2233.
70. Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss III, R., Brown, P. K., Arné, P., Fairbrother, J. M. (2003). Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infection and Immunity*, 71(1), 536-540.
71. Michelacci, V., Tozzoli, R., Caprioli, A., Martínez, R., Scheutz, F., Grande, L., Morabito, S. (2013). A new pathogenicity island carrying an allelic variant of the subtilase cytotoxin is common among Shiga

- toxin producing *Escherichia coli* of human and ovine origin. *Clinical Microbiology and Infection*. 9(3): E49-E56.
72. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.
73. O'Brien, A. D., LaVeck, G. D., Thompson, M. R., & Formal, S. B. (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 146(6), 763-769.
74. Olsen, J., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P., Olsvik, Ø. (1995). Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 28(1), 1-78.
75. Ostroff, S. M. (1989). Epidemiology and complications of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Journal of the American Medical Association*, 262(24), 3408-3408.
76. Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., & Caprioli, A. (2000). Typing of intimin genes in human and animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli*: Characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, 68(1), 64-71.
77. Paton, A. W., & Paton, J. C. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for Stx1, Stx2, EaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* HlyA, rfb(O111), and rfb(O157). *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 598-602.
78. Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 450-479.
79. Paton, A. W., & Paton, J. C. (2002). Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 271-274.
80. Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H., & Paton, J. C. (2004). A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(1), 35-46.
81. Penteado, A. S., Ugrinovich, L. A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Pestana De Castro, A. F. (2002). Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 89(1), 41-51.
82. Pollard, D., Johnson, W., Lior, H., Tyler, S., & Rozee, K. (1990). Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 540-545.
83. Riley, L. W., Remis, R. S., & Helgerson, S. D. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, 308(12), 681-685.
84. Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., & Leotta, G. A. (2006). The epidemiology of Hemolytic Uremic Syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. [Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión] *Medicina*, 66(SUPPL. 3), 27-32.
85. Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C. D., Balbi, L., García, B., Hoekstra, R. M. (2006). Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated

- from Hemolytic Uremic Syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 88-96.
86. Rivas, M., Sosa-Estani, S., Rangel, J., Caletti, M. G., Vallés, P., Roldán, C. D., Griffin, P. M. (2008). Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 763-771.
87. Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. *Salud Publica De Mexico*, 44(5), 464-475.
88. Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996-4001.
89. Sáenz, Y., Zarazaga, M., Brias, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(4), 353-358.
90. Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forshell, L., Alsterlund, R., Lofdahl, S., Hansson, H. (2008). An outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in Southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and Infection*, 136(3), 370.
91. Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H., Lassen, J., Lindstedt, B., Brandal, L. T., Aavitsland, P. (2008). Outbreak of Haemolytic Uraemic Syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103: H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infectious Diseases*, 8(1), 41-54.
92. Schmidt, H., Beutin, L., & Karch, H. (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity*, 63(3), 1055-1061.
93. Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J., & Karch, H. (1995). Development of PCR for screening of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), 701-705.
94. Schroeder, C. M., White, D. G., & Meng, J. (2004). Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 21(3), 249-255.
95. Sekse, C., O'Sullivan, K., Granum, P. E., Rørvik, L. M., Wasteson, Y., & Jørgensen, H. J. (2009). An outbreak of *Escherichia coli* O103: H25—Bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. *International Journal of Food Microbiology*, 133(3), 259-264.
96. Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman, London, UK.
97. Spizzirri, F. D., Pérez, N., Suarez, A., Cobenas, C., Rabman, R. C., Siegler, R. L., & Pavia, A. T. (1997). Hemolytic Uremic Syndrome: Presence or absence of diarrheal prodromes. *Journal of Pediatrics*, 131(6), 937-938.
98. Spizzirri, F. D., Rahman, R. C., Bibiloni, N., Ruscasso, J. D., & Amoreo, O. R. (1997). Childhood Hemolytic Uremic Syndrome in Argentina: Long-term follow-up and prognostic features. *Pediatric Nephrology*, 11(2), 156-160.
99. Todar, K. (2008). "Pathogenic *E. coli*". Disponible en <http://www.textbookofbacteriology.net/> último acceso mayo 2013.

100. Tozzoli, R., Caprioli, A., Cappannella, S., Michelacci, V., Marziano, M. L., & Morabito, S. (2010). Production of the subtilase AB5 cytotoxin by Shiga toxin-negative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 178-183.
101. Trabulsi, L. R., Keller, R., & Tardelli Gomes, T. A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8(5), 508-513.
102. Tzipori, S., Karch, H., Wachsmuth, K. I., Robins-Browne, R. M., O'Brien, A. D., Lior, H., Levine, M. M. (1987). Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity*, 55(12), 3117-3125.
103. Von Baum, H., & Marre, R. (2005). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 503-511.
104. Wadolowski, E. A., Burris, J. A., & O'Brien, A. D. (1990). Mouse model for colonization and disease caused by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Infection and Immunity*, 58(8), 2438-2445.
105. Wang, G., Clark, C. G., & Rodgers, F. G. (2002). Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157: H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3613-3619.
106. Welch, R. A. (2006). The genus *Escherichia*. In *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*, (3rd ed. vol. 6), Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. & Stackebrand, E. (Eds.) New York: Springer Science, pp. 60-71.
107. Wikler, M. A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Hecht, D. W., Swenson, J. M. (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 27 (1), 1-177.
108. Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L., & Tarr, P. I. (2000). The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1930-1936.
109. Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M. A., Jordan, D. M., Francetic, O., Kaper, J. B., Girón, J. A. (2007). Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3519-3529.
110. Yu, J., & Kaper, J. B. (1992). Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, 6(3), 411-417.
111. Zhang, X., McDaniel, A. D., Wolf, L. E., Keusch, G. T., Waldor, M. K., & Acheson, D. W. K. (2000). Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 664-670.

Capítulo VI. Caracterización del riesgo asociado a la presencia de *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli* Enteropatógeno en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León

1. INTRODUCCIÓN.

La evaluación del riesgo consiste en la valoración científica de los efectos nocivos para la salud que son o pueden ser consecuencia de la exposición humana a peligros transmitidos por los alimentos. La ingesta de alimentos puede conllevar un riesgo biológico por la posible presencia de los siguientes tipos de peligros de interés para la salud pública:

- Peligros macrobiológicos, como los insectos, peligrosos tanto por sí mismos como por ser vehículo de microorganismos patógenos.
- Peligros microbiológicos, que son los responsables directos de las infecciones alimentarias y los primarios de algunas intoxicaciones alimentarias. Están constituidos por parásitos, bacterias, virus y priones. Los efectos que desencadenan pueden ser (i) directos, cuando causan infección y/o invasión de los tejidos o (ii) indirectos, que son los daños derivados de la producción de toxinas.

De todos ellos, la presencia de bacterias patógenas en los alimentos constituye uno de los problemas de mayor importancia a nivel mundial. El resultado de la evaluación de los riesgos que provocan es una estimación de la probabilidad de que se produzcan efectos adversos (conocidos o potenciales) para la salud de una población dada, así como de la gravedad de dichos efectos adversos. Dicho resultado final, que aportará una estimación cualitativa y/o cuantitativa de la dimensión de la consecuencia sanitaria así como una información de las incertidumbres asociadas a dicha estimación, se realiza mediante un proceso denominado caracterización del riesgo, que es consecuencia de otras tres etapas previas: identificación del peligro, caracterización del mismo y evaluación de la exposición al mismo.

Cuando se aplica a peligros microbiológicos se habla de evaluación del riesgo microbiológico y si, como es el caso, se aplica a las situaciones de transmisión alimentaria de dichos peligros hablaremos de la evaluación del riesgo microbiológico asociado al consumo de productos alimenticios.

Las enfermedades humanas de origen microbiano asociadas al consumo de alimentos constituyen una preocupación mundial en la seguridad alimentaria. Se ha estimado que en

el año 2008 fallecieron 2.464.425 personas en el mundo como consecuencia de enfermedades diarreicas. En los países industrializados, la incidencia de enfermedades de transmisión alimentaria también es importante y así se estima que hasta un 30% de la población de estos países industrializados padece alguna enfermedad de transmisión alimentaria (WHO, 2004).

En España durante el período comprendido entre 1992 y 2007, dentro del sistema de enfermedades de declaración obligatoria, se ha informado de 14.096 brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos producidos, que afectaron a 185.878 personas. Aunque ha variado con los años, la cifra de hospitalizaciones se acerca, por término medio, al 10% de los afectados. El número de fallecidos asociados a esos brotes se ha situado entre 3 y 16 por año. El agente etiológico primario de dichos brotes no ha podido ser establecido en la tercera parte de los brotes aproximadamente y, salvo algo menos de un 3% de los brotes, el resto se han asociado a bacterias y virus patógenos. Sin embargo, hay que considerar que para evaluar la incidencia real de las enfermedades de transmisión alimentaria en España habría que considerar además los casos esporádicos (p.e., los recogidos en el Sistema de Información Microbiológica) y las limitaciones de los sistemas de información sanitaria.

Este contexto justifica la importancia actual de la evaluación del riesgo microbiológico, para el cual ya hace algún tiempo que se han establecido incluso directrices de carácter internacional para su utilización (CAC, 1999). Su desarrollo en las cuatro etapas consideradas se resume a continuación:

1.1. Identificación de los peligros, que consiste en la identificación de los microorganismos capaces de causar efectos adversos para la salud y que pueden estar presentes en un alimento o grupo de alimentos en particular. En definitiva, se trata de establecer una relación de causa-efecto entre un microorganismo concreto y una determinada enfermedad. Los datos necesarios para llevarla a cabo se pueden tomar de varias fuentes, como los datos epidemiológicos de enfermedades humanas, estudios de vigilancia epidemiológica, evidencias clínicas y microbiológicas, entre otros. La limitación principal radica en que dado el carácter limitado de los brotes que son objeto de investigación, probablemente no se han identificado todas las bacterias patógenas que pueden estar presentes en los

alimentos. Asimismo, los gastos asociados a la investigación de los brotes y la falta de datos epidemiológicos fiables o completos suponen dificultades añadidas a la identificación de peligros.

1.2. Caracterización de los peligros, para obtener una estimación cualitativa o cuantitativa de la gravedad, duración y naturaleza de los efectos adversos para la salud asociados a la ingesta de un agente microbiológico con los alimentos que están siendo evaluados. Se trata de estimar la importancia (en forma de porcentaje) de las distintas consecuencias tras la ingestión de un microorganismo patógeno susceptible de causar una infección. Para ello se tienen en cuenta tanto la forma activa del microorganismo como las toxinas que pueden ser producidas por éste. La imprecisión para esta estimación es debida a varias razones:

- La diferente susceptibilidad del huésped al microorganismo en función de factores demográficos (edad, sexo,...), genéticos, inmunitarios y fisiológicos.
- La frecuencia de ataques por un agente patógeno específico puede variar considerablemente.
- La infectividad, virulencia y patogenicidad, así como los factores asociados como la resistencia a antimicrobianos, de una especie patógena son muy variables.
- Las propias características del alimento, ya que son capaces de modificar la capacidad de la bacteria para infectar o afectar de cualquier otra manera al huésped.

1.3. Evaluación de la exposición al peligro, que proporciona una estimación cualitativa y/o cuantitativa ya sea del número de bacterias patógenas o del nivel de toxinas asociados a la ingesta de los alimentos. Este procedimiento depende de tres factores:

- Distribución del peligro:
 - Ecología de la bacteria patógena en cuestión.
 - Elaboración, envasado y almacenamiento del alimento.

- Fases de preparación del alimento que pueden inactivar al agente microbiano.
- Factores culturales relacionados con los consumidores.
- Dinamismo de las poblaciones bacterianas. Para la mayor parte de los peligros microbiológicos de transmisión alimentaria, la supervivencia, la inactivación o la multiplicación son consustanciales con el tiempo y las diferentes etapas por las que pasan los productos alimenticios y sus materias primas a lo largo de la cadena producción-consumo. La estimación de la variación cualitativa y/o cuantitativa de las poblaciones microbianas en un determinado producto alimenticio se realiza por dos procedimientos básicos: (i) las denominadas pruebas del desafío microbiano o pruebas de inoculación microbiana, en las que tras inocular en un producto alimenticio (o en una materia prima alimenticia) un agente microbiano se reproducen las etapas habituales de su procesado y se sigue (mediante el análisis microbiológico de algunas de las muestras inoculadas) la evolución de la población del microorganismo en el alimento conforme transcurren dichas etapas, y (ii) recurrir a modelos matemáticos de predicción del comportamiento microbiano en los que se recogen los principales factores que afectan a la evolución de los microorganismos.
- Patrones de consumo (datos obtenidos en encuestas alimentarias), en particular:
 - Tamaño de las raciones.
 - Frecuencia de consumo.
 - Proporción de la población consumidora de dichos productos.

1.4. Caracterización de los riesgos.

Es el cálculo de la probabilidad de que se produzcan efectos perjudiciales para una determinada población consumidora del producto alimenticio (probabilidad de la infección, probabilidad de morbilidad y probabilidad de mortalidad). El resultado constituye la estimación del potencial de un determinado agente microbiano para causar daño en una

población específica. Esta etapa se puede llevar a cabo de varias formas, como por ejemplo las que se describen a continuación:

- Caracterización cualitativa del riesgo microbiológico, que se emplea en etapas iniciales de valoración de riesgos con el fin de determinar si el riesgo en cuestión es o no de importancia como para ser evaluado con mayor exhaustividad. Se basa en la experiencia adquirida con un alimento específico, el grado de conocimiento de la ecología de las bacterias patógenas, los datos epidemiológicos y la opinión de los expertos sobre peligros asociados a la manera de producir, elaborar, almacenar y preparar los alimentos para el consumo. Algunos ejemplos de caracterización cualitativa del riesgo microbiológico se presentan en FAO/OMS (2009).
- Caracterización semicuantitativa del riesgo microbiológico, que consiste en asignar una puntuación al riesgo (expresión numérica del riesgo) valorado de forma cualitativa acompañada de modelos matemáticos. Un ejemplo de este tipo de caracterización es la realizada mediante el programa “*Risk Ranger*” (<http://www.foodsafetycentre.com.au/docs/RiskRanger.xls>) desarrollado en Australia por Roos y Sumner (2002). Esta herramienta permite ordenar numéricamente los riesgos (0-100) de menor a mayor importancia sanitaria en base a 11 parámetros referidos al peligro, a la frecuencia de consumo del alimento implicado y a la población consumidora del mismo.
- Caracterización cuantitativa del riesgo microbiológico, que proporciona un dato más preciso que los anteriores pero requiere un mayor número de datos y un mayor esfuerzo tanto en tiempo invertido como en personal para el estudio. Se lleva a cabo mediante procedimientos probabilísticos relacionados con la integración de los resultados de la evaluación de la exposición y de la caracterización del peligro (Hass et al., 1999; Akingbade et al., 2013).

1.5. Objetivos.

El objetivo de este trabajo fue categorizar el riesgo asociado a la presencia de cepas potencialmente patógenas de *Aeromonas*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* Enteropatógeno, en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo tal y como son proporcionados a los consumidores en los puntos de venta, con el fin de facilitar la valoración de su importancia sanitaria.

Para la consecución de dicho objetivo se empleó un procedimiento de caracterización semicuantitativa con la ayuda del programa “*Risk Ranger*” antes señalado.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Descripción del programa *Risk Ranger*. Para el logro de los objetivos descritos anteriormente se utilizó una herramienta sencilla y de fácil realización que permite llevar a cabo una evaluación semicuantitativa del riesgo microbiológico. La herramienta en cuestión se denomina “*Risk Ranger*” y es una aplicación desarrollada para ser empleada con la hoja de cálculo Excel (Microsoft Office), que fue desarrollada por dos investigadores de la Universidad de Tasmania (Australia), Roos y Sumner (2002), y está disponible de forma libre y gratuita en la página web del australiano *Food Safety Centre* (<http://www.foodsafetycentre.com.au/docs/RiskRanger.xls>).

Ross y Sumner (2002) consideraron que la herramienta tendría que incorporar todos los factores que afectan al riesgo asociado a un peligro en un producto alimenticio concreto, incluyendo: (i) la gravedad del peligro, (ii) la probabilidad de que la dosis del peligro que causa una enfermedad esté presente en un alimento y (iii) la probabilidad de exposición al peligro en un período de tiempo definido. A su vez, asociados a estos factores, se definieron otros:

- La gravedad de la enfermedad se ve afectada por:
 - (a) las características intrínsecas del patógeno / toxina, y
 - (b) la susceptibilidad de los consumidores.
- La exposición al peligro depende de la cantidad de alimento que se consume en cada comida por la población de interés, de la frecuencia con la que consume el alimento, y del tamaño de la población expuesta.
- La probabilidad de exposición a una dosis infecciosa depende de:
 - (a) tamaño de la porción,
 - (b) probabilidad de contaminación en el producto fresco,
 - (c) nivel inicial de contaminación,
 - (d) probabilidad de contaminación del alimento en etapas posteriores de la cadena.
 - (e) cambios en el nivel del peligro durante el procesado, por ejemplo, los simples efectos de concentración y/o dilución, el crecimiento o la inactivación de los patógenos.

Con estas ideas se desarrolló el software “*Risk Ranger*” que permite ordenar numéricamente los riesgos, en una escala (0-100) de menor a mayor importancia sanitaria, y que se diseñó específicamente para la ordenación de los riesgos de origen biológico. La herramienta tiene en cuenta 11 factores como determinantes del problema sanitario (Tabla 1) y para cada uno de ellos se establecen una serie de categorías a una de las cuales se ha de realizar la asignación que proceda al caso concreto. Dichas categorías llevan asociado un valor numérico de referencia, aunque, para alguno de los factores, el evaluador tiene a su disposición una categoría adicional en la que puede asignar un valor numérico concreto para aquellas situaciones en las que se dispone de un dato más preciso que el establecido para cada categoría.

Los 11 factores determinantes del problema sanitario tienen que ver con: (i) el peligro, su frecuencia en la materia prima y la influencia de diversos factores del procesado (así como de la contaminación posterior a éste) y la preparación culinaria en la consecución de la dosis infectiva (factores 6, 7, 8, 9, 10 y 11), (ii) la frecuencia de consumo del producto alimenticio (factor 3), (iii) la población consumidora (factores 4 y 5) y susceptible (factor 2) y (iv) la gravedad del problema sanitario (factor 1 y parámetro relacionado con el factor 2).

Los valores de estos factores se combinan (Tabla 2) en una primera fase para obtener un valor de “probabilidad de que el producto alimenticio haya alcanzado la dosis infectiva [entendida ésta como la que causa la enfermedad en el 50% de los consumidores] en la unidad de producto que se consume” y otro de “probabilidad de exposición al producto por persona consumidora del producto alimenticio y día” (que considera la frecuencia de consumo). De la multiplicación de estos dos valores entre sí y con un tercer parámetro que refleja la fracción de la población que es susceptible (derivado del factor 2) se obtiene un primer resultado de estimación del riesgo: un valor de “probabilidad de enfermar por día y consumidor del producto”. A partir del anterior, considerando tanto el tamaño de la población consumidora (factor 5), como la fracción de la misma que consume el producto (factor 4) y el correspondiente período de tiempo (1 año) se obtiene un segundo valor de estimación del riesgo: “una predicción del número total de enfermos que se producirán al año en la población objeto de evaluación”. Finalmente, considerando un último factor hasta entonces no considerado (el de gravedad del peligro, factor 1), se calcula un valor numérico de Riesgo Comparativo (RC), valor que

expresa la probabilidad de que se produzca un problema sanitario (cuya dimensión o importancia que también se recoge en el valor de RC, se establece combinando tanto la fracción de la población que enferma como la gravedad de la enfermedad) por día y consumidor de la población considerada en la evaluación (es independiente, por tanto, del tamaño de la población). Este valor de RC se traduce en una escala de Riesgo Relativo (RR), de 0 a 100, cuyos valores extremos corresponden conceptualmente a “0 = no hay ningún riesgo, no se produce ningún enfermo por el consumo del alimento que contiene el peligro” y “100 = toda la población susceptible que consume el alimento conteniendo la dosis infectiva fallece [la dosis infectiva, es pues, dosis letal]”. En términos matemáticos (probabilísticos) el valor 0 de RR (riesgo despreciable) supone “1 infectado (que sufre una enfermedad leve) por cada 10 mil millones de habitantes en 100 años”, es decir un valor de RC de $2,57 * 10^{-17}$, mientras que el valor 100 de RR se corresponde con un valor 1 de RC (probabilidad de fallecimiento diario por consumidor [susceptible] del alimento conteniendo el peligro = 1). Los valores de RR intermedios entre 0 y 100 se corresponden con una escala logarítmica y en la misma un salto de una unidad logarítmica en el valor de RC (multiplicación o división por 10) se traduce en un cambio de 6 unidades en la ordenación del riesgo, es decir, en el valor de RR.

2.2. Evaluación del riesgo empleando el programa *Risk Ranger*.

A partir de los datos de prevalencia de las diferentes bacterias patógenas consideradas en esta Tesis (*Aeromonas*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* Enteropatógeno) en los diversos productos alimenticios objeto del trabajo (carne fresca de cerdo, carne fresca de pollo, productos cárnicos cocidos de origen porcino, productos cárnicos curados de origen porcino y productos cárnicos cocidos de pavo, capítulos II, III, IV y V de esta tesis) y realizando las asunciones que, en cada caso, se describen en el epígrafe de resultados, se calcularon para cada combinación “agente etiológico-producto alimenticio” los valores de Riesgo Relativo (RR) y del resto de parámetros asociados con la ayuda de la versión 2 del programa *Risk Ranger* (Ross y Sumner, 2002) ejecutado sobre la versión 2010 del programa Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Estados Unidos).

Tabla 1. *Risk Ranger* (Ross y Sumner, 2002). Factores que considera, escala a utilizar en cada uno de ellos y valor que se asigna a cada factor en función de la categoría de la escala que se seleccione (Parte 1).

Factores a considerar	Valores numéricos asociados a cada categoría
1. Gravedad del peligro (*):	
Grave –frecuentemente mortal	1
Moderado –precisa habitualmente intervención médica	0,01 (*)
Ligero – a veces se precisa intervención médica	0,001 (*)
Escaso –el paciente raramente precisa atención médica	0,0001 (*)
2. Fracción de la población que es susceptible/Susceptibilidad de la población	
General (100 % población)	1
Ligera-Media (p.e., niños, ancianos) (20%)	5
Poco (sólo viejos, muy jóvenes, diabéticos,) (3%)	30
Muy poco (sólo SIDA, trasplantados,...) (0,1%)	200
3. Frecuencia de consumo	
Diario	365
Semanal	52
Mensual	12
Algunas veces al año	3
Otro valor (especificar)	Días al año que se consume
4. Fracción de la población que lo consume	
Toda (100%)	1
La mayoría (75%)	0,75
Algunos (25%)	0,25
Muy pocos (5%)	0,05
5. Tamaño de la población	Valor (especificar)
6. Proporción del producto contaminado (frecuencia de contaminación de la materia prima): referido a la ración de producto que finalmente será consumido	
Todas las muestras (100%)	1
Común (50%)	0,5
A veces (10%)	0,1
Infrecuente (1%)	0,01
Rara (0,1%)	0,001
Otro valor	Especificar valor

(*) Los términos de gravedad del peligro se corresponden con los de la versión 2 del programa, que reducen por un factor de 10 la importancia de los peligros calificados como “moderados”, “ligeros” o escasos” con relación a lo establecido en la publicación original de Ross y Sumner (2002).

Tabla 1. *Risk Ranger* (Ross y Sumner, 2002). Factores que considera, escala a utilizar en cada uno de ellos y valor que se asigna a cada factor en función de la categoría de la escala que se seleccione (Parte 2)

Factores a considerar	Valores numéricos asociados a cada categoría
7. Efecto del procesado	
Elimina el peligro	0
Habitualmente (99%) lo elimina	0,01
Reduce ligeramente (50%) el peligro	0,5
No afecta al peligro	1
Aumenta ligeramente (x 10) el peligro	10
Aumenta bastante (x 1000) el peligro	1000
Otro valor	Especificar valor
8. Posibilidad de recontaminación tras el proceso	
Ninguna	0
Pequeña (1% de frecuencia)	0,01
Media (50% de frecuencia)	0,5
Otro valor	Especificar valor
9. Efectividad del sistema de control post-procesado	
Bien controlado	1
Controlado	3
No bien controlado	10
Totalmente descontrolado	1000
No afecta al nivel del peligro	1
10. Necesidad de aumento del nivel (tras el procesado) para alcanzar la dosis infectiva (que se establece como aquella necesaria para que el 50% de los consumidores enfermen)	
Ninguna	1
Ligera (* 10)	0,1
Moderada (* 100)	0,01
Significativa (* 10.000)	0,0001
Otro valor	Especificar valor (inferior a 1, preferiblemente un valor de factor 10)
11.- Efecto de la preparación culinaria	
Elimina el peligro	0
Habitualmente (99%) lo elimina	0,01
Lo reduce ligeramente (50%)	0,5
No ejerce efecto	1
Otro valor	Especificar valor (fracción del peligro, en tantos por uno, que permanece en el producto; valor inferior a 1)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En primer lugar, se tomó la decisión de utilizar el programa “*Risk Ranger*”, como herramienta para la evaluación de riesgos que suponen para la población de León las cargas microbianas registradas en las carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo investigados, debido a su sencillez conceptual y de utilización e interpretación.

Para utilizar el programa *Risk Ranger*, se procedió a la selección de los valores correspondientes a cada uno de los 11 factores que considera el modelo y que se presentan en la Tabla 1 del modo que se explica a continuación.

El factor número 1 (Tabla 1) relaciona la bacteria con la gravedad del peligro que supone. Para tomar dicha decisión en relación con las bacterias objeto de este trabajo consideramos en primer lugar la clasificación de la ICMSF (2002). Adicionalmente, y considerando los resultados de la comparación genética entre las cepas clínicas y las aisladas de alimentos que se presentan en cada uno de los capítulos de esta Tesis en los que específicamente se considera cada grupo bacteriano, calificamos como “peligro ligero” a *Campylobacter* y a *Salmonella* mientras que consideramos “escasa” la gravedad de *Aeromonas* y *E. coli* Enteropatógeno. Sin embargo, considerando que la resistencia a los antimicrobianos de las cepas presentes en los alimentos podría incrementar su peligrosidad también procedimos a evaluar el riesgo asociado a las bacterias considerando que tal carácter de resistencia a antimicrobianos suponía un salto de nivel en la escala de gravedad (de ligero a moderado, para *Campylobacter* y *Salmonella*; de escaso a ligero para *Aeromonas* y *E. coli* Enteropatógeno).

El segundo de los factores (Tabla 1) del modelo se asocia a la fracción de la población que es susceptible a dichos peligros. De acuerdo con la información científica de referencia (Riemann y Cliver, 2006) se consideró que toda la población era susceptible a *Campylobacter* y *Salmonella* mientras que para las cepas de *E. coli* Enteropatógeno y *Aeromonas* se estimó que afectan a un grupo más restringido de población que incluye a los principales grupos de riesgo, tales como niños, ancianos, individuos inmunodeprimidos, entre otros (Nataro et al., 1998; Janda et al., 2010; Parker et al., 2010).

El establecimiento de la frecuencia de consumo de los productos alimenticios (factor 3, Tabla 1) se hace en muchas ocasiones a partir de datos poco precisos. En nuestro caso, aún con las limitaciones inherentes al mismo, consideramos los datos recogidos por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en las Encuestas Nacionales de Ingesta Dietética Españolas realizadas entre los años 2009 y 2010 (AESAN, 2011). Así, considerando que cada ración de producto equivale a 100 gramos del mismo, a partir de los valores medios de consumo que, para cada uno de los productos objeto de este trabajo, se incluyen en la referida encuesta, se calculó la frecuencia de consumo de cada ración.

El siguiente factor a dilucidar (factor 4, Tabla 1) se refiere a la proporción de población que consume los productos investigados. En todos los casos se consideró que un 75% de la misma los consume de manera habitual. Aún sin disponer de datos precisos de su tamaño, es de conocimiento común que ciertos sectores de la población, tales como vegetarianos, entre otros, no consumen este tipo de productos alimenticios. Se estimó pues que “la mayoría” de la población consume los productos objeto de este trabajo.

El factor número 5 (Tabla 1) se refiere al tamaño específico de población, en nuestro caso la población estudiada es la de la ciudad de León, donde los productos investigados son comercializados. El dato se tomó del Instituto Nacional de Estadística (INE, 2012).

La proporción de producto contaminado (factor 6, Tabla 1) equivale a los valores que fueron registrados en nuestro trabajo como prevalencia de cada bacteria en cada producto analizado (véase capítulos II, III, IV y V de esta tesis). En los productos de los que no se aislaron cepas se consideró como prevalencia el valor que correspondería al límite de detección del protocolo seguido y, en consecuencia, los valores de riesgo obtenidos deben ser considerados como máximos. Por otra parte, y dada la fácil disponibilidad de datos de prevalencia de bacterias patógenas en carnes frescas y en productos cárnicos listos para el consumo dentro del ámbito de la Unión Europea (informes de la EFSA), se abordó un ejercicio de simulación para estimar en qué medida se vería afectado el riesgo si la prevalencia de las bacterias patógenas objeto de este trabajo en los productos investigados fuera la misma que la media de la Unión Europea. Al efecto,

se consideraron los valores de prevalencia recogidos en el último informe de la EFSA disponible en el momento de realizar el trabajo (EFSA, 2012).

Tanto para las carnes frescas como para los productos cárnicos listos para el consumo, considerando que evaluamos la prevalencia de las bacterias patógenas en los productos en la fase de la venta al consumidor, no consideramos el efecto del procesado, es decir, tomamos los valores de 1, 0 y 1 para los factores 7, 8 y 9 (Tabla 1). Por otra parte, para las carnes frescas consideramos que la preparación culinaria se realiza de manera adecuada, y en consecuencia, que “habitualmente elimina el peligro”, es decir, valor 0,01 para el factor 11 (Tabla 1). En el caso de los productos cárnicos listos para el consumo no es necesaria la realización de ningún tipo de preparación culinaria previa a la ingesta por lo que consideramos un valor de 1 en el citado factor 11 (Tabla 1).

Por último, el factor 10 (Tabla 1) se relaciona con la necesidad o no de que, durante el almacenamiento casero del producto antes del consumo, se produzca una multiplicación bacteriana para que el consumidor ingiera, con la ración habitual, la dosis suficiente del peligro que produciría una infección en el 50% de los consumidores (el valor Dosis Infecciosa 50). La necesidad o no de dicho incremento se decidió en función de las dosis infectivas mínimas de cada uno de los peligros (ICMSF, 1996; Riemann y Cliver, 2006) y considerando, en todos los casos, que el nivel de contaminación microbiana en el producto consumido era baja (del orden de 100 ufc/g).

En la Tabla 2 se presentan los valores del riesgo y de predicción de enfermos por año que, en función de las asunciones antes descritas, proporciona el programa *Risk Ranger* para cada combinación de producto alimenticio-peligro considerada en este trabajo. En las Tablas 3 a 5 se presentan separadamente para cada combinación de producto alimenticio y bacteria patógena considerados en este trabajo (*Campylobacter*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Escherichia coli* Enteropatógeno) los valores de riesgo asociados a los diferentes supuestos antes considerados, es decir, el de un incremento de la gravedad del peligro por la resistencia a antimicrobianos de las bacterias presentes en los alimentos y, para *Campylobacter* y *Salmonella*, el de una prevalencia similar a la media de la Unión Europea.

Tabla 2. Valores del riesgo y predicción de enfermos por año obtenidos para carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en función de la prevalencia de *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *Escherichia coli* Enteropatógeno en dichos productos en los puntos de venta al consumidor.

Alimento	Agente microbiano							
	<i>Aeromonas</i>		<i>Campylobacter</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Escherichia coli</i> Enteropatógeno	
	NR*	Pred. enf/año*	NR	Pred. enf/año	NR	Pred. enf/año	NR	Pred. enf/año
Productos cárnicos cocidos de origen porcino	34	2**	<57*	NP*	54	390	38	6
Productos cárnicos curados de origen porcino	34	2	<57	NP	55	520	38	8
Productos cárnicos cocidos de pavo	42	34	<63	NP	<58	NP	40	17
Pechugas frescas de pollo	32	1	55	701	41	2	23	1
Lomo fresco de cerdo	30	1	49	61	42	3	<21	

*NR, Nivel de Riesgo (se corresponde con el valor de Riesgo Relativo que proporciona el programa *Risk Ranger*, ver Material y Métodos). Pred.enf/año se refiere a la predicción de enfermos por año en la población investigada. Los valores de NR precedidos del símbolo < se asocian al empleo, como valor de prevalencia, del límite de detección del protocolo empleado dado que el valor de NR real no puede ser establecido, se incluye únicamente como referencia y, en consecuencia, se omite el valor relativo a la predicción de enfermos/año que proporciona el programa, y en su lugar se recoge el término NP, sin predicción.

**Redondeando al número entero superior.

Tabla 3. Valores de riesgo asociados a la presencia de *Campylobacter* en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en diferentes supuestos de variación en la prevalencia y en la gravedad del peligro.

Alimento	Agente		
	<i>Campylobacter</i>		
	NR Prev Det*	NR Prev UE*	NR PI*
Productos cárnicos cocidos de origen porcino	<57	55	<63
Productos cárnicos curados de origen porcino	<57	55	<63
Productos cárnicos cocidos de pavo	<63	61	<69
Pechugas frescas de pollo	55	53	61
Lomo fresco de cerdo	49	41	55

*NR Prev Det, significa nivel de riesgo en León (se corresponde con el valor de Riesgo Relativo que proporciona el programa *Risk Ranger* para los valores de prevalencia encontrados en este trabajo), NR Prev UE se refiere al nivel de riesgo tomando los valores medios de prevalencia de la Unión Europea (EFSA, 2012), NR PI (patogenicidad incrementada), equivale al nivel de riesgo asociado a la prevalencia encontrada en este trabajo considerando que las características de las cepas en cuanto a su gran resistencia a antimicrobianos supusieran el salto de un nivel en la escala de gravedad del peligro. Los valores de NR precedidos del símbolo < se asocian al empleo, como valor de prevalencia, del límite de detección del protocolo empleado dado que el valor de NR real no puede ser establecido, se incluye únicamente como referencia.

Tabla 4. Valores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en diferentes supuestos de variación en la prevalencia y en la gravedad del peligro.

Alimento	Agente		
	<i>Salmonella</i>		
	NR Prev Det*	NR Prev UE*	NR PI*
Productos cárnicos cocidos de origen porcino	54	52	60
Productos cárnicos curados de origen porcino	55	57	60
Productos cárnicos cocidos de pavo	<58	NC**	<64
Pechugas frescas de pollo	41	43	46
Lomo fresco de cerdo	42	39	47

*NR Prev Det, significa nivel de riesgo en León (se corresponde con el valor de Riesgo Relativo que proporciona el programa *Risk Ranger* para los valores de prevalencia encontrados en este trabajo), NR Prev UE se refiere al nivel de riesgo tomando los valores medios de prevalencia de la Unión Europea (EFSA, 2012), NR PI (patogenicidad incrementada), equivale al nivel de riesgo asociado a la prevalencia encontrada en este trabajo considerando que las características de las cepas en cuanto a su gran resistencia a antimicrobianos supusieran el salto de un nivel en la escala de gravedad del peligro. Los valores de NR precedidos del símbolo < se asocian al empleo, como valor de prevalencia, del límite de detección del protocolo empleado dado que el valor de NR real no puede ser establecido, se incluye únicamente como referencia.

**NC, No calculado por ausencia de datos de prevalencia a nivel de la UE.

Tabla 5. Valores de riesgo asociados a la presencia de *Aeromonas* en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en diferentes supuestos de variación en la gravedad del peligro.

Alimento	Agente	
	<i>Aeromonas</i>	
	NR Prev Det*	NR PI
Productos cárnicos cocidos de origen porcino	34	51
Productos cárnicos curados de origen porcino	34	51
Productos cárnicos cocidos de pavo	42	59
Pechugas frescas de pollo	32	49
Lomo fresco de cerdo	30	47

*NR Prev Det, significa nivel de riesgo en León (se corresponde con el valor de Riesgo Relativo que proporciona el programa *Risk Ranger* para los valores de prevalencia encontrados en este trabajo), NR PI (patogenicidad incrementada), equivale al nivel de riesgo asociado a la prevalencia encontrada en este trabajo considerando que las características de las cepas en cuanto a su gran resistencia a antimicrobianos supusieran el salto de un nivel en la escala de gravedad del peligro.

Tabla 6. Valores de riesgo asociados a la presencia de *E. coli* Enteropatógeno en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en diferentes supuestos de variación en la gravedad del peligro.

Alimento	Agente	
	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógeno	
	NR Prev Det*	NR PI
Productos cárnicos cocidos de origen porcino	38	44
Productos cárnicos curados de origen porcino	38	44
Productos cárnicos cocidos de pavo	40	46
Pechugas frescas de pollo	23	29
Lomo fresco de cerdo	21	27

*NR Prev Det, significa nivel de riesgo en León (se corresponde con el valor de Riesgo Relativo que proporciona el programa *Risk Ranger* para los valores de prevalencia encontrados en este trabajo), NR PI (patogenicidad incrementada), equivale al nivel de riesgo asociado a la prevalencia encontrada en este trabajo considerando que las características de las cepas en cuanto a su gran resistencia a antimicrobianos supusieran el salto de un nivel en la escala de gravedad del peligro.

Los ejercicios de evaluación del riesgo empleando procedimientos semicuantitativos, como el usado en este trabajo, son especialmente útiles para los gestores de salud pública. Sus resultados permiten no tanto predecir o establecer la importancia precisa de un posible problema sanitario determinado (en el caso que nos ocupa el derivado de la contaminación por una determinada bacteria patógena de un producto alimenticio concreto) como ordenar los diferentes problemas en función de su importancia y, en consecuencia, establecer las prioridades de actuación. Tal modo de gestión no sólo es el esperable en términos de eficacia, sino que en el ámbito europeo es imperativo por razones legales. Así el Reglamento de la Unión Europea que regula el ejercicio de los controles oficiales en el ámbito alimentario (Parlamento Europeo y Consejo, 2004) establece que los controles oficiales (a realizar por los Estados miembros) se efectuarán con regularidad, estarán basados en los riesgos y tendrán la frecuencia apropiada (art. 3.1). En aplicación de tal principio, los planes nacionales de control (oficial de los alimentos) deben estar basados en los riesgos y, en consecuencia, para establecer las prioridades (las frecuencias) de los mismos es necesario disponer de instrumentos que permitan la ordenación de los riesgos.

Con esta finalidad, de ordenación de riesgos para la salud asociados al consumo de alimentos contaminados con peligros de origen microbiano, el programa *Risk Ranger* ha sido empleado en ocasiones diversas y algunos resultados de su empleo han sido reflejados en publicaciones científicas (Sumner et al., 2005; Mataragas et al., 2008). En las mismas, y

para simplificar aún más la ordenación, finalmente los riesgos se categorizan como bajos, moderados o elevados en función de los valores alcanzados para el parámetro “Riesgo Relativo” (que proporciona el programa) y que en esta Tesis hemos identificado como “Nivel de Riesgo”. Así, por ejemplo, en el trabajo de Mataragas et al. (2008) se consideran *bajos* los riesgos con valores (de nivel de riesgo) inferiores a 32, *moderados* los que presentan valores entre 32 y 48 y *elevados* los que muestran un resultado superior a esta última cifra.

En relación con los riesgos asociados a la presencia de *Campylobacter* y *Salmonella* en las carnes y en los productos cárnicos objeto de esta Tesis, los resultados de nuestra evaluación (Tabla 2) proporcionaron valores de riesgo superiores a los que calcularon Mataragas et al. (2008) hace unos años si bien ha de considerarse que, en su caso, emplearon como valores de prevalencia de los peligros los derivados de una búsqueda bibliográfica en diferentes fuentes y como patrones de consumo unos de ámbito internacional (los recogidos en las estadísticas de la FAO). Sin embargo, los valores hallados en nuestro trabajo se encuentran dentro de los rangos hallados en otros estudios. Así, por ejemplo, Sumner et al. (2005) obtuvieron niveles de riesgo entre 48 y 58 (para *Salmonella* en carnes preparadas en los hogares) y entre 40 y 58 (para *Salmonella* en *kebabs*), en ambos casos para un consumo cotidiano (diario para las carnes preparadas en los hogares y semanal para los *kebabs*) por parte de la población australiana.

Uno de los indicadores que puede emplearse para valorar la validez del procedimiento de evaluación del riesgo empleado consiste en comparar los resultados del mismo con los procedentes de los sistemas de información sanitaria. A tal efecto, aunque es un dato aproximado y no es la finalidad última del programa *Risk Ranger*, los datos que proporciona relativos a la predicción de enfermos por año en una población determinada pueden compararse con los que proporcionan los diferentes sistemas de información sanitaria. Así, el Sistema de Información Microbiológica (que recoge datos de diagnósticos realizados en una parte de los hospitales nacionales) registró en los años 2009 y 2010 un total de 5113 y 6334 casos de campilobacteriosis al mismo tiempo que 4320 y 4420 casos de salmonelosis, respectivamente para cada uno de los dos años considerados. Hay que considerar, por otra parte, que la población de la ciudad de León supone alrededor de un 0,3% de la nacional (INE, 2012). Adicionalmente habría que tener en cuenta que el

Sistema de Información Microbiológica, como se ha indicado, recoge datos de únicamente una parte de los hospitales españoles, sin que conozcamos estimaciones precisas de la proporción de los mismos que participan en el sistema (en el año 2009 participaron 53 hospitales de 11 Comunidades Autónomas mientras que en el 2010 lo hicieron 81 de 12 sin que, curiosamente, en ninguno de dichos años, se incorporaran los datos del Hospital de León).

Es pertinente considerar también que, aunque es un sistema de información sanitaria que ya no se sigue empleando, hasta el año 1996 formaban parte de las enfermedades de declaración obligatoria las “toxiinfecciones alimentarias” y “otros procesos diarreicos”. Los datos que allí se recogían procedían de las comunicaciones de los diferentes profesionales médicos que atendían pacientes, bien en sistemas públicos bien en relaciones del ámbito privado. En dicho año (1996) se registraron en España 21188 casos de toxiinfecciones alimentarias” (1777 en Castilla y León) y 2964299 casos de “otros procesos diarreicos” (154321 en Castilla y León).

En las Tablas 7 y 8 se presenta la predicción de enfermos/año para la ciudad de León asociados a las carnes y productos cárnicos contaminados con alguna cepa que pudo identificarse como *Campylobacter* (Tabla 7) o *Salmonella* (Tabla 8) en el trabajo objeto de esta Tesis. Asimismo, y a efectos comparativos, se presenta la predicción de enfermos/año que calcula el programa, para la misma población, a partir de los datos medios de prevalencia de estos agentes en los referidos productos en el ámbito de la Unión Europea (EFSA, 2012).

Considerando pues las características de las cepas aisladas de alimentos (en general, diferentes genéticamente de las procedentes de los casos clínicos) y, en consecuencia, de un previsible poder patógeno diferente, las predicciones de enfermos/año que se recogen en las Tablas 2, 7 y 8 se consideran coherentes con los que proporcionan los sistemas de información sanitaria.

Tabla 7. Predicción de casos de campilobacteriosis por año en la población de la ciudad de León por el consumo de carnes frescas.

Alimento	Pred.enf/año Prev Det*	Pred.enf/año Prev UE**
Pechugas frescas de pollo	701***	9
Lomo fresco de cerdo	61	5

* Con los datos de prevalencia obtenidos en esta Tesis.

** Con los datos de prevalencia medios de la UE en los referidos productos (EFSA, 2012).

*** Obtenidos con el programa *Risk Ranger* (versión 2) con los supuestos señalados en este capítulo.

Tabla 8. Predicción de casos de salmonelosis por año en la población de la ciudad de León por el consumo de carnes frescas y productos cárnicos.

Alimento	Pred.enf/año Prev Det*	Pred.enf/año Prev UE**
Productos cárnicos cocidos de origen porcino	390***	1090
Productos cárnicos curados de origen porcino	520	1090
Pechugas frescas de pollo	2	9
Lomo fresco de cerdo	3	5

* Con los datos de prevalencia obtenidos en esta Tesis.

** Con los datos de prevalencia medios de la UE en los referidos productos (EFSA, 2012).

*** Obtenidos con el programa *Risk Ranger* (versión 2) con los supuestos señalados en este capítulo.

Las predicciones de enfermos/año que se recogen en las Tablas 7 y 8, en el contexto en el que se ha realizado esta evaluación, han de entenderse como “predicciones de infecciones/año”. En función de la falta de similitud genética entre las cepas clínicas aisladas en los hospitales y las encontradas en los productos alimenticios investigados en esta Tesis (véanse capítulos II y III de esta tesis) y lo reflejado en las estadísticas sanitarias (en particular, notificaciones recogidas en el Servicio de Información Microbiológica, que se han comentado previamente en esta discusión) cabe esperar que la mayor parte de estas infecciones que se predicen se resuelvan sin intervención médica. Ha de tenerse en cuenta, sin embargo, que las consecuencias sanitarias asociadas a los niveles de prevalencia hallados en los productos objeto de este trabajo podrían ser mucho más dramáticas en el supuesto de que, por alguna circunstancia la virulencia de todas o algunas de las cepas contaminantes de los productos alimenticios se vea incrementada. Sirva como ejemplo de situaciones “inesperadas” que incrementan la virulencia, la asociada al brote por *E. coli* acaecido en Alemania en el año 2011 (Bielaszewska et al., 2011), asociado a una cepa de *E. coli* con una combinación particularmente peligrosa de genes de virulencia y de defensa frente a mecanismos de lucha frente a las bacterias (antimicrobianos). Al respecto, la importante resistencia a

antimicrobianos de las cepas de *Campylobacter* y *E.coli* Enteropatógeno aisladas de carnes y productos cárnicos (véase capítulos III y V de esta tesis) puede constituir una circunstancia que aumente la gravedad sanitaria asociada a los niveles de prevalencia encontrados para dichas bacterias en los citados productos alimenticios. En particular, si consideramos además, la mayor gravedad de las campilobacteriosis en poblaciones más sensibles (niños, ancianos, inmunodeprimidos) [Allos et al., 2001].

Aunque dentro de las asunciones realizadas para estimar la importancia sanitaria de la contaminación de carnes y productos cárnicos por bacterias patógenas pertenecientes a *Aeromonas*, *Salmonella*, *Campylobacter* o *Escherichia coli* Enteropatógeno se estableció que la gravedad de los peligros se situaba en los rangos de menor peligrosidad de los que contempla el modelo (por la falta de semejanza entre las cepas aisladas de los alimentos y las cepas procedentes de los casos clínicos), en términos de salud pública no debe subestimarse la importancia de la significativa prevalencia encontrada para estas bacterias patógenas. Así, los niveles de riesgo encontrados (Tablas 2 a 5) se sitúan en varios casos en el rango de los que pueden considerarse como “elevados” (superiores a 48 si empleamos el criterio recogido por Moragas et al., 2008). Sería recomendable, por tanto, que la prevalencia de *Salmonella* en productos cárnicos de origen porcino listos para el consumo y de *Campylobacter* en carnes frescas (de aves y de porcino), con valores de nivel de riesgo entre 49 y 55 (Tabla 2) fuera objeto de las correspondientes medidas de control oficial de los productos alimenticios (incluyendo, en primer lugar, el adecuado seguimiento de los niveles de contaminación).

Todo ejercicio de evaluación de riesgo debe ir acompañado de la correspondiente consideración de las incertidumbres asociadas. En este caso, hay que considerar que el modelo empleado incluye una simplificación del complejo proceso de desarrollo de una enfermedad a partir de la contaminación por una cepa bacteriana de un alimento o de una materia prima alimenticia. Así, las categorías de gravedad de los peligros (Tabla 1), que ya fueron objeto de revisión desde la primera publicación del modelo (Ross y Sumner, 2002) pueden considerarse simples para recoger la gran diversidad de patogenicidad presente en las cepas microbianas de un determinado género e incluso de una determinada especie bacteriana (Doyle y Beuchat, 2013). Del mismo modo, el nivel real de contaminación de los productos alimenticios por las bacterias patógenas no ha sido establecida en este trabajo

y se ha asumido que la misma es baja (del orden de 100 ufc/g, como se ha señalado previamente). Finalmente, habría que considerar que la necesidad de aumento de nivel para alcanzar la dosis infectiva (factor 10 de los considerados por el programa *Risk Ranger*, Tabla 1, parte 2) también ha sido categorizado con la falta de precisión asociada al desconocimiento del nivel real de contaminación y a la falta de concreción de los valores de dosis infectiva 50 de cada bacteria considerada en esta tesis, para los que en distintas fuentes bibliográficas de prestigio se sugieren valores bastante diferentes (ICMSF, 1996; Riemann y Cliver, 2006).

Aún con las limitaciones del modelo de evaluación empleado (que se califica únicamente como semicuantitativo), los resultados del mismo ponen claramente de manifiesto la necesidad de establecer con mayor concreción el grado de patogenicidad de las cepas aisladas.

4. CONCLUSIONES.

Las predicciones relativas a la importancia sanitaria de la presencia de bacterias patógenas en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo que proporciona el programa *Risk Ranger* son razonablemente coherentes con los datos que se encuentran en los sistemas oficiales de información sanitaria, lo que, unido a su sencillez conceptual y facilidad de ejecución, justifica su empleo en primera instancia para ordenar los riesgos de origen biológico asociados al consumo de alimentos.

En la ordenación de las actividades de intervención sanitaria en relación con los productos estudiados en este trabajo y los peligros incluidos en el mismo, la mayor atención debe prestarse a la contaminación por *Salmonella* de productos cárnicos de origen porcino listos para el consumo y a la contaminación por *Campylobacter* de las carnes frescas de ave y de cerdo.

La importante prevalencia de estas dos bacterias patógenas en dichos productos alimenticios no sólo en el ámbito español sino en el conjunto de la Unión Europea podría dar lugar a situaciones de crisis alimentarias en el supuesto de que alguna de las cepas contaminantes presentara algún carácter que exacerbara su virulencia. Al respecto, la importante resistencia a compuestos antimicrobianos de las cepas de *Campylobacter* aisladas de las carnes y los productos cárnicos debe verse con especial preocupación, pues pudiera ser uno de los factores que aumentara la virulencia de las cepas.

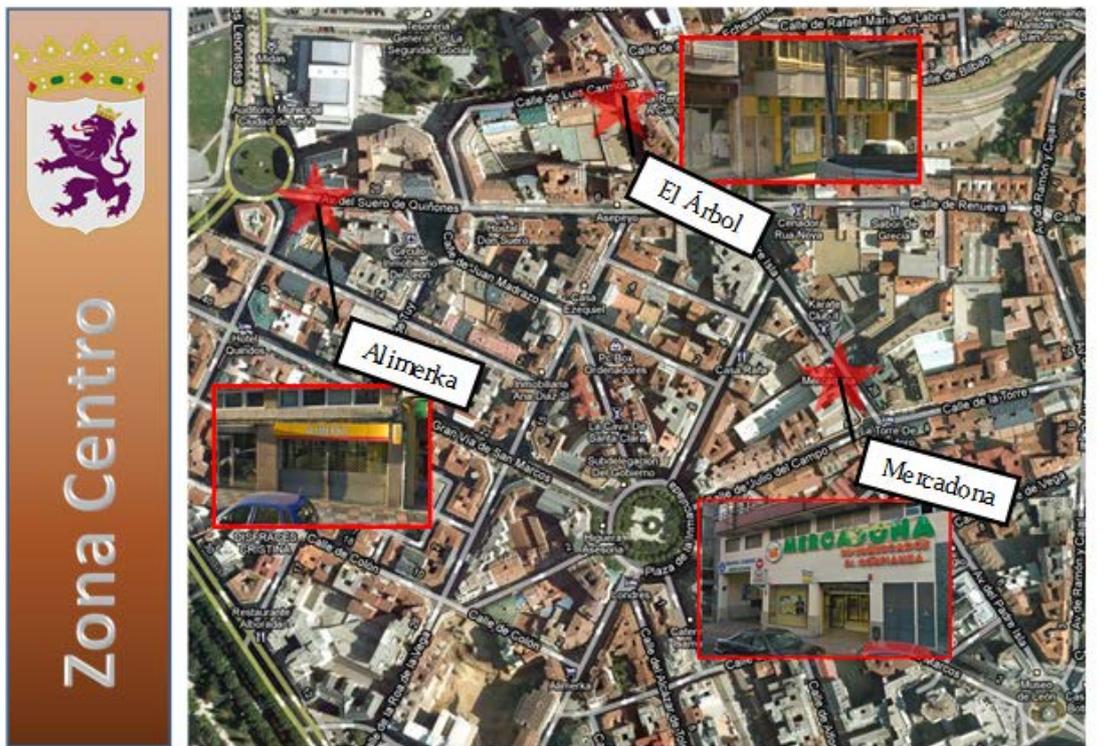
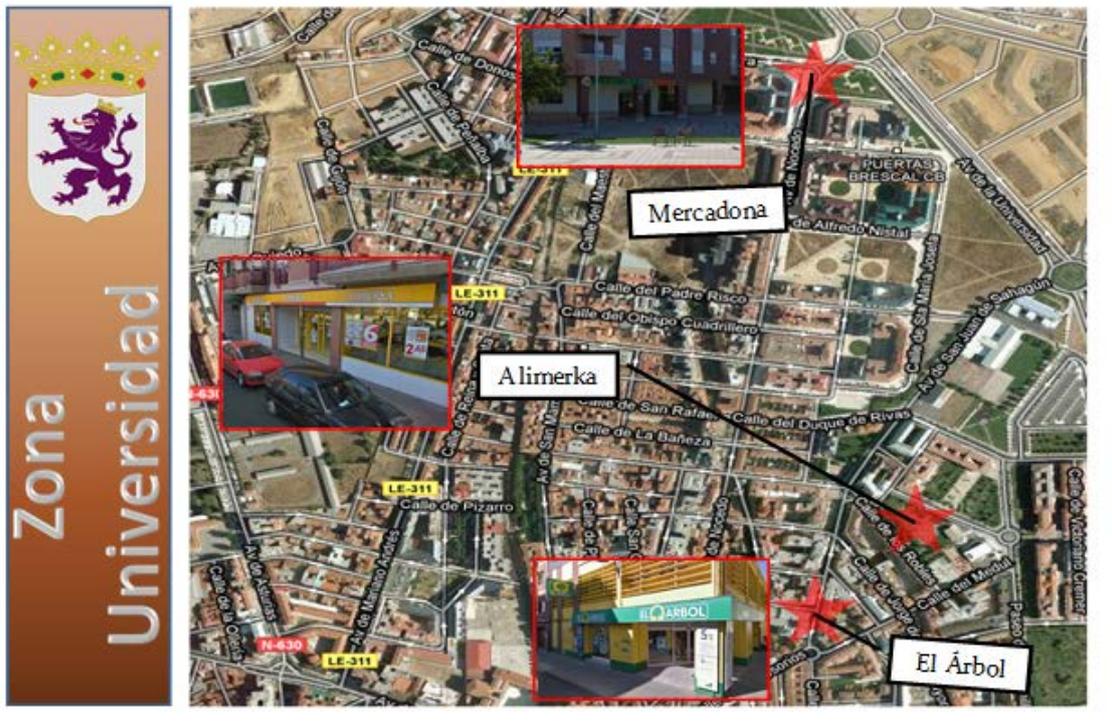
5. BIBLIOGRAFÍA.

1. AESAN (2011). ENIDE (Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española). Disponible http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/datos_consumo/ENIDE.pdf, último acceso en Septiembre del 2013.
2. Akingbade, D., Bauer, N., Dennis, S., Gallgeher, D., Hoelser, K., Kause, J., Silverman, M. & Tiang, J. (2013). The Interagency Retail *Listeria monocytogenes* Risk Assessment Workgroup. Draft interagency. Risk assessment – *Listeria monocytogenes* in retail delicatessens technical report. Disponible en <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/RiskSafetyAssessment/UCM351328.pdf>, último acceso Septiembre de 2013.
3. Allos, B. M. & Acheson, D. (2001). *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), 1201-1206.
4. Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A. & Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet infectious diseases*, 11(9), 671-676.
5. CAC [Codex Alimentarius Commission] (1999). Principios y directrices para la aplicación de la evaluación de riesgos microbiológicos. CAC/GL30 (1999). Comisión del Codex Alimentarius, Roma. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030s.pdf, último acceso junio 2013.
6. Doyle, M.P. & Beuchat (2013) L.R. Food microbiology. Fundamentals and frontiers (4ª ed.) ASM Press, Washington DC, USA.
7. EFSA (2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *The EFSA Journal* 10, 2597.
8. FAO/OMS (2009). Risk characterization of microbiological hazards in food. Guidelines. WHO/FAO Microbiological risk assessment series 17. Disponible en <http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/micro/MRA17.pdf>. Último acceso septiembre 2013.
9. Haas, C. N., Rose, J. B., & Gerba, C. P. (1999). Quantitative microbial risk assessment John Wiley & Sons. New York, USA.
10. ICMSF (1996). Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Chapman & Hall, London, UK.
11. ICMSF (2002). Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management. Kluwer Academic, New York, USA.
12. Instituto Nacional de Estadística (2012). Demografía y Población. Cifras de Población y Censos Demográficos. Disponible en <http://www.ine.es/>. Último acceso junio 2013.
13. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35-73.

14. Mataragas, M., Skandamis, P., & Drosinos, E. (2008). Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1), 1-12.
15. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.
16. Parker, J. L., & Shaw, J. G. (2011). *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, 62(2), 109-118.
17. Parlamento Europeo y Consejo (2004). Reglamento (CE) 882/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales, DOUE L 165, de 30.4.2004, p. 1-68. Modificado por última vez por Reglamento (CE) nº 1791/2006 del Consejo del día 20 de noviembre de 2006, DOUE L363, de 20.12.2006, p.1-80.
18. Riemann, H.P. & Cliver, D.O. (2006). *Foodborne infections and intoxications* (3ª Ed.) Academic Press, London.
19. Ross, T., & Sumner, J. (2002). A simple, spreadsheet-based, food safety risk assessment tool. *International Journal of Food Microbiology*, 77(1), 39-53.
20. Sumner, J., Ross, T., Jenson, I., & Pointon, A. (2005). A risk microbiological profile of the Australian red meat industry: Risk ratings of hazard-product pairings. *International Journal of Food Microbiology*, 105(2), 221-232.
21. WHO (2004). *Mortality and global health estimates: Mortality and morbidity, 2004*. Disponible en <http://apps.who.int/gho/data/node.main.892?lang=en>, último acceso marzo 2013.

Anexo

ANEXO



Mapas correspondientes a los tres supermercados, distribuidos en dos zonas distintas de la ciudad de León donde fueron realizados los muestreos de esta Tesis Doctoral.

Índice de tablas y figuras

ÍNDICE DE TABLAS

- **Capítulo I.** Justificación, planteamiento y objetivos.
 - **Tabla 1.** Agentes causales de los brotes de enfermedades de transmisión alimentaria (no hídrica) registrados en España durante los años 2004-2007.....4

- **Capítulo II.** Incidencia de *Aeromonas* en carnes y productos cárnicos, aproximación a la evaluación de su patogenicidad y comparación genética con cepas de origen clínico del mismo hábitat geográfico.
 - **Tabla 1.** Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en las pruebas para la detección de los genes marcadores de virulencia en *Aeromonas* spp.....27
 - **Tabla 2.** Resumen de las condiciones de trabajo de la técnica PFGE realizada en las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas tanto de muestras de alimentos como de muestras de pacientes del Hospital de León.....30
 - **Tabla 3.** Resumen de la batería de antimicrobianos utilizados en el análisis de posibles resistencias de cepas de *Aeromonas*.....31
 - **Tabla 4.** Criterios para evaluar el carácter de resistencia a antimicrobianos para enterobacterias establecidos por el CLSI.....32
 - **Tabla 5.** Pruebas fisiológicas y bioquímicas diferenciales entre grupos taxonómicos relacionados con el género *Aeromonas*.....33
 - **Tabla 6.** Características bioquímicas que permiten adscribir las cepas a una especie concreta de *Aeromonas*.....34
 - **Tabla 7.** Adscripción a especie de cepas de *Aeromonas* procedentes de carnes, productos cárnicos y casos de gastroenteritis humanas.....35

○ Tabla 8. Cepas de <i>Aeromonas</i> spp. aisladas en diferentes muestras de carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo.....	36
○ Tabla 9. Distribución de genes de virulencia en <i>Aeromonas</i> procedentes de carnes frescas y de casos de gastroenteritis humanas.....	38
○ Tabla 10. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de <i>Aeromonas</i> procedentes de alimentos, agua y casos clínicos.....	42
○ Tabla 11. Perfiles de multirresistencia a antimicrobianos en <i>Aeromonas</i> aisladas de carnes frescas.....	42
• Capítulo III. Incidencia de <i>Campylobacter</i> en carnes frescas y productos cárnicos y comparación genética con cepas de origen clínico.	
○ Tabla 1. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en las PCR realizadas con cepas de <i>Campylobacter</i>	69
○ Tabla 2. Resumen de las condiciones de trabajo de la técnica PFGE realizada en las cepas de <i>Campylobacter</i> spp. aisladas tanto en muestras de alimentos como en muestras de pacientes del Hospital de León.....	71
○ Tabla 3. Descripción de los cebadores y condiciones de PCR utilizados en el AFLP.....	74
○ Tabla 4. Resumen de la batería de antimicrobianos utilizados en el análisis de posibles resistencias de cepas de <i>Campylobacter</i>	75
○ Tabla 5. Criterios para evaluar el carácter de resistencia a antimicrobianos para enterobacterias establecidos por el CLSI.....	76
○ Tabla 6. Cepas de <i>Campylobacter</i> spp. aisladas en diferentes muestras de carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo.....	77

○ Tabla 7. Perfiles genéticos mostrados por las cepas de <i>Campylobacter</i> aisladas.....	80
○ Tabla 8. Perfiles genéticos obtenidos a partir de las cepas de <i>Campylobacter</i> aisladas de muestras de origen alimenticio y las cepas de origen clínico.....	82
○ Tabla 9. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de <i>Campylobacter</i> procedentes de carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo y de casos clínicos.....	84
○ Tabla 10. Perfil de multirresistencia de la totalidad de las cepas aisladas tanto de carnes frescas como de casos clínicos diagnosticados en el Hospital de León.....	86
• Capítulo IV. Incidencia de <i>Salmonella</i> y <i>Yersinia</i> en carnes y productos cárnicos listos para el consumo y estimación de su patogenicidad.	
○ Tabla 1. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en la PCR para la detección del gen <i>invA</i> en cepas de <i>Salmonella</i> y la detección del gen <i>yst</i> en cepas de <i>Yersinia enterocolitica</i>	121
• Tabla 2. Resumen de las condiciones de trabajo de la técnica PFGE realizada en las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas tanto en muestras de alimentos como en muestras de pacientes del Hospital de León.....	122
○ Tabla 3. Resumen de la batería de antimicrobianos utilizados en el análisis de posibles resistencias de cepas de <i>Salmonella</i>	123
○ Tabla 4. Criterios para evaluar el carácter de resistencia a antimicrobianos para enterobacterias establecidos por el CLSI.....	124
○ Tabla 5. Perfil de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas.....	125

○ Tabla 6. Serotipos de <i>Salmonella</i> en casos de gastroenteritis diagnosticados en el Complejo Hospitalario de León.....	126
○ Tabla 7. Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo.....	127
○ Tabla 8. Carnes y productos cárnicos involucrados en los casos de infección de origen alimentario por <i>Salmonella</i> en la UE y en España durante el año 2010.....	127
○ Tabla 9. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de <i>Salmonella</i> procedentes de alimentos y casos clínicos.....	130
○ Tabla 10. Perfiles mayoritarios de resistencia a antimicrobianos mostrados por las cepas aisladas de <i>Salmonella</i> en función de su origen.....	131
○ Tabla 11. Porcentaje de cepas resistentes a antimicrobianos en función de su origen.....	133
○ Tabla 12. Prevalencia de presuntas <i>Yersinia enterocolitica</i> en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo.....	139
○ Tabla 13. Perfil fenotípico de la cepa de colección <i>Yersinia enterocolitica</i> CECT4315.....	140
● Capítulo V. Incidencia de <i>E. coli</i> productor de toxinas Shiga y <i>E. coli</i> Enteropatógeno y evaluación comparativa con cepas de origen clínico.	
○ Tabla 1. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en la PCR para la detección de los genes <i>stx1</i> y <i>stx 2</i> , así como del gen <i>eae</i>	170

○ Tabla 2. Descripción de los cebadores así como el tamaño de amplicones originados en la PCR para la detección de los genes marcadores de virulencia de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de Toxina(s) Shiga.....	173
○ Tabla 3. Descripción de los cebadores y su temperatura de actuación, así como el tamaño de amplicones originados en la PCR para la detección del gen que codifica para la fimbria BFP.....	174
○ Tabla 4. Resumen de las condiciones de trabajo de la técnica PFGE realizada en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas tanto de muestras de alimentos como de muestras de pacientes del Hospital de León.....	175
○ Tabla 5. Resumen de la batería de antimicrobianos utilizados en el análisis de posibles resistencias de cepas de <i>E. coli</i>	175
○ Tabla 6. Criterios para evaluar el carácter de resistencia a antimicrobianos para enterobacterias establecidos por el CLSI.....	176
○ Tabla 7. Prevalencia de cepas de <i>E. coli eae+</i> en diferentes muestras de carnes frescas y de productos cárnicos listos para el consumo.....	177
○ Tabla 8. Resumen de los genes marcadores de virulencia de las cepas clínicas productoras de toxinas Shiga de origen clínico y su serotipificación.....	179
○ Tabla 9. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de <i>E. coli eae+</i> procedentes de carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo y de casos clínicos.....	181
○ Tabla 10. Perfiles de multirresistencia a antimicrobianos mostrados por las cepas de <i>E. coli eae+</i>	182

- **Capítulo VI.** Caracterización del riesgo asociado a la presencia de *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli* Enteropatógeno en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León.
 - **Tabla 1.** *Risk Ranger* (Ross y Sumner, 2002). Factores que considera, escala a utilizar en cada uno de ellos y valor que se asigna a cada factor en función de la categoría de la escala que se seleccione.....208
 - **Tabla 2.** Valores del riesgo y predicción de enfermos por año obtenidos para carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en función de la prevalencia de *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *Escherichia coli* Enteropatógeno en dichos productos en los puntos de venta al consumidor.....213
 - **Tabla 3.** Valores de riesgo asociados a la presencia de *Campylobacter* en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en diferentes supuestos de variación en la prevalencia y en la gravedad del peligro.....213
 - **Tabla 4.** Valores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en diferentes supuestos de variación en la prevalencia y en la gravedad del peligro.....214
 - **Tabla 5.** Valores de riesgo asociados a la presencia de *Aeromonas* en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la ciudad de León en diferentes supuestos de variación en la gravedad del peligro.....214
 - **Tabla 6.** Valores de riesgo asociados a la presencia de *E. coli* Enteropatógeno en carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo comercializados en la

ciudad de León en diferentes supuestos de variación en la gravedad del peligro.....	215
o Tabla 7. Predicción de casos de campilobacteriosis por año en la población de la ciudad de León por el consumo de carnes frescas.....	218
o Tabla 8. Predicción de casos de salmonelosis por año en la población de la ciudad de León por el consumo de carnes frescas y productos cárnicos.....	218

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Capítulo II.** Incidencia de *Aeromonas* en carnes y productos cárnicos, aproximación a la evaluación de su patogenicidad y comparación genética con cepas de origen clínico del mismo hábitat geográfico.
 - **Figura 1.** Distribución de genotipos (combinaciones de genes marcadores de virulencia) en cepas de *Aeromonas* aisladas de pechugas (frescas) de pollo.....39
 - **Figura 2.** Distribución de genotipos (combinaciones de genes marcadores de virulencia) en cepas de *Aeromonas* aisladas de lomo (fresco) de cerdo.....39
 - **Figura 3.** Distribución de genotipos (combinaciones de genes marcadores de virulencia) en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con gastroenteritis diagnosticadas en el Hospital de León.....40
 - **Figura 4.** Dendrograma resultado de la realización de la técnica de PFGE sobre las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de carnes frescas y productos cárnicos listos para el consumo (1A + nº o 2A + nº), cepas clínicas (MHA + nº o Hospital + nº) y cepas procedentes de otros orígenes (FA + nº las de pescado, RMA + nº las de carne de conejo y WA + nº las procedentes de aguas).....46bis

- **Capítulo III.** Incidencia de *Campylobacter* en carnes frescas y productos cárnicos y comparación genética con cepas de origen clínico.
 - **Figura 1.** Dendrograma resultado de la realización de la técnica AFLP sobre las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de alimentos (ALFP1C y AFLP2C) y de origen clínico (AFLPMHC).....89bis

- **Capítulo IV.** Incidencia de *Salmonella* y *Yersinia* en carnes y productos cárnicos listos para el consumo y estimación de su patogenicidad.
 - **Figura 1.** Rutas de transmisión de *Salmonella* (Josefsen et al., 2011).....103
 - **Figura 2.** Dendrograma resultado de la realización de la técnica de PFGE sobre las cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos (MAS) y de origen clínico (MHS).....138

- **Capítulo V.** Incidencia de *E. coli* productor de toxinas Shiga y *E. coli* Enteropatógeno y evaluación comparativa con cepas de origen clínico.
 - **Figura 1.** Dendrograma resultado de la realización de la técnica de PFGE sobre las cepas de *E. coli* Enteropatógeno aisladas de alimentos (E) y de origen clínico (EPEC).....189