

INFECCIONES SIMULTÁNEAS POR CEPAS DE SALMONELLA DE DISTINTOS SEROTIPOS Y PATRONES DE MULTIRRESISTENCIA EN PORCINO DE MATADERO

Garrido, V.¹, San Román, B.¹, Vico, J.P.², Sánchez S.¹, Ciaurriz, P.¹, De Frutos C.³, Mainar-Jaime, R.C.², Grilló, M.J.^{1*}

¹Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNA-Gobierno de Navarra). Carretera de Mutilva, s/n. 31192. Mutilva, Navarra. ²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón. Avda. Montañana, 930. 50059. Zaragoza. ³Laboratorio Central de Veterinaria. Ctra. de Algete, Km 8. 28110. Algete, Madrid. *E-mail: mariajesus.grillo@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis humana es la primera causa de mortalidad por infecciones alimentarias en la Unión Europea (EFSA, 2009). La ingestión de carne y productos derivados del cerdo es la segunda fuente de infección más importante para el ser humano, siendo *Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad Typhimurium (*S. Typhimurium*) el serotipo más frecuentemente asociado a estos brotes. Las infecciones humanas cursan con síntomas de gastroenteritis aguda que, generalmente, remiten en pocos días tras el tratamiento sintomático inicial (hidratación). No obstante, en los casos más severos o los que conllevan complicaciones subsiguientes a la infección es necesario aplicar terapias antimicrobianas, por lo que un riesgo adicional es la aparición de cepas con resistencia a los agentes antimicrobianos (AR). La legislación actual exige el aislamiento, serotipado y estudio de los perfiles de AR, tanto de las cepas causantes de brotes de salmonelosis humana como de las cepas que infectan a los animales (EFSA, 2009). Con el ánimo de proteger la salud de los consumidores, las autoridades sanitarias de la Unión Europea han iniciado estudios encaminados a estimar la prevalencia de salmonelosis porcina en cada Estado Miembro (EM) e identificar los serotipos y perfiles de AR de *Salmonella* más frecuentes (EFSA, 2008a; EFSA, 2008b). El objetivo final de estos estudios es definir objetivos de reducción de prevalencia de salmonelosis porcina para cada EM y contribuir al establecimiento en Europa de programas de control razonables. La prevalencia e identificación de serotipos de *Salmonella* se basan en el cultivo de ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) según los procedimientos descritos en la norma ISO 6579:2002 (ISO, 2005) y el Esquema de Kauffmann-White, y el análisis de los perfiles de AR, según los descritos en los estándares internacionales (CLSI/NCCLS, 2005). Los estudios realizados por la EFSA no han analizado la existencia de animales infectados simultáneamente por varias cepas de *Salmonella*. Para averiguar si este fenómeno ocurre en el porcino de engorde, hemos analizado los serotipos y AR de varias colonias de *Salmonella* spp. aisladas de GLM de un mismo animal, en un total de 14 cerdos de engorde sacrificados en Aragón, entre los años 2008 y 2009 (Vico et al., 2011).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se aisló *Salmonella* spp. en muestras de GLM (25 gramos/animal) de un total de 14 cerdos de engorde sacrificados en diferentes mataderos de Aragón, entre los años 2008 y 2009, siguiendo la norma ISO 6579:2002 (ISO, 2005). Brevemente, las muestras de GLM fueron cultivadas en agua de peptona tamponada (BPW), transferidas a medio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (RPVM) y los cultivos que presentaban el halo típico de *Salmonella* en este medio fueron transferidos a los medios selectivos XLD (Xylosine Lysine Deoxycholate) y BGA (Brilliant Green Agar). De ahí, se repicaron entre 2 y 12 (cuando fue posible) colonias sospechosas de *Salmonella* de cada animal en placas de agar y, tras su identificación bioquímica (urea-indol, lisina-decarboxilasa y TSI) y molecular (amplificación por PCR de los genes *invA* y *hila*), fueron serotipadas en el Centro Nacional de Referencia de Salmonelosis Animales (LCV Algete, Madrid). Una vez confirmados los serotipos, se analizaron los perfiles de AR de cada cepa, utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (CLSI/NCCLS, 2005) con un total de 19 agentes antimicrobianos: los 10 recomendados por la normativa europea para la vigilancia armonizada de salmonelosis animales (DOUE, 2007) (i.e., Ampicilina, Amp; Cloranfenicol, Clor; Estreptomina, Str; Gentamicina, Genta; Sulfisoxazol, Sul; Trimetoprima, Tm; Tetraciclina, Tet; Ácido nalidíxico, Nx; Ciprofloxacino, Cip; y Cefotaxima, Cfx); otros 8 antibióticos utilizados durante el engorde de los animales analizados (i.e., Amoxicilina, Amx; Espectinomina, Spt; Neomicina, Neo; Doxiciclina, Doxi;

Enrofloxacin, En; Ceftiour, Cft; y Colistina, Col); y las asociaciones Amoxicilina-Clavulánico (AmC) y Trimetoprima-Sulfometoxazol (Ts). Las concentraciones utilizadas de cada antimicrobiano y la clasificación de las cepas de *Salmonella* como resistentes, intermedias y sensibles fueron las recomendadas por los estándares internacionales (CLSI/NCCLS, 2005). Como controles se utilizaron *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Typhimurium* DT104. Los perfiles de multi-AR se determinaron según la clasificación por familias de los antimicrobianos utilizados en veterinaria (OIE, 2009), i.e., Aminopenicilinas (A; Amp, Amx y AmC), Anfencólicos (C; Clor), Aminonoglucósidos (S; Str, Spt, Genta y Neo), Sulfonamidas (Su; Sul, Tm y Ts), Tetraciclinas (T; Tet y Dox), Quinolonas (Q1G; Nx), Fluoro-Quinolonas (FQ; Cip y Enro), Cefalosporinas 3G (C3G; Cfx y Cft) y Polipéptidos (Px; Col).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los 14 animales analizados, se aislaron un total de 58 cepas de *Salmonella* spp. pertenecientes a 8 serotipos de 5 serogrupos diferentes, i.e., *S. Typhimurium*, *S. Derby* y *S. Bredeney* del serogrupo B; *S. Rissen* y *S. 6,7 :- : 1-5 (I)* del serogrupo C1; *S. Goldcoast* del serogrupo C2; *S. Kapemba* del serogrupo D1; y *S. arizonae* serotipo 48:z₄,z₂₃,z₃₂ :- (IIIa) del serogrupo Y). Los serotipos más aislados fueron *S. Typhimurium* (18 cepas), *S. Rissen* (14 cepas) y *S. Kapemba* (14 cepas). La mitad de los animales estaban infectados simultáneamente por cepas pertenecientes a 2 o más serotipos de *Salmonella*, encontrándose *S. Typhimurium* junto con *S. Kapemba*, *S. Goldcoast*, *S. Rissen* ó *S. 6,7 :- : 1-5 (I)*, *S. Rissen* junto con *S. arizonae* e incluso se halló un animal infectado por 3 serotipos de 3 serogrupos (*S. Typhimurium*, *S. Kapemba* y *S. arizonae*) simultáneamente.

Por otra parte, el 95% (55 de 58) de las cepas aisladas fueron resistentes a algún antimicrobiano, siendo Sul (49 cepas), Str (46 cepas), Spt y Tet (41 cepas) los agentes frente a los que más AR se observaron. Además, 50 (86,2%) de estas cepas presentaron AR a varios agentes, mostrando 11 perfiles de multi-AR diferentes, entre los que destacaron ACSSuT (14 cepas, 3 de ellas con AR adicional a Q1G), CSSuT (14 cepas) y ASSu (8 cepas). La mayoría (11 de 14; 78,6%) de los animales analizados estaban infectados simultáneamente por cepas de *Salmonella* spp. con 2 o más patrones de AR, coexistiendo en un mismo animal cepas multi-AR con diferentes patrones (5 animales) o con cepas susceptibles a todos (3 animales) o resistentes sólo a uno (3 animales) de los antibióticos analizados. Asimismo, encontramos que el 50% (7 de 14) de los animales analizados estaban infectados por cepas de *S. Typhimurium* con el patrón típico ACSSuT, acompañado o no de AR a Q1G. Observamos que *S. Typhimurium* (19 cepas) y *S. Kapemba* (5 cepas) fueron los serotipos que presentaron AR a mayor número de agentes (5 y 4 familias de antimicrobianos, respectivamente), mientras que *S. Derby* (5 cepas) y *S. Rissen* (15 cepas) sólo presentaron AR a 3 o menos familias. Para los demás serotipos aislados no se analizó si esta relación con el número de AR puesto que sólo se aislaron 1 ó 2 cepas de cada serotipo.

Hasta donde sabemos, es la primera vez que se describe la existencia de infecciones simultáneas por cepas de *Salmonella* de dos o más serotipos y/o patrones de AR en ganado porcino. Esto puede ser debido a que, por motivos prácticos, en los estudios de prevalencia de salmonelosis en animales suele analizarse una sola colonia de *Salmonella* de cada individuo. Desde un punto de vista epidemiológico, este hallazgo podría explicar las diferencias entre los serotipos identificados en los estudios de referencia de diferentes países y modificar sustancialmente algunos de los resultados relativos a los serotipos y perfiles de AR de las cepas de origen porcino que pueden causar brotes de salmonelosis humana. Por ejemplo, aunque *S. Typhimurium* y *S. Rissen* fueron los más prevalentes tanto en este estudio como en el estudio de referencia llevado a cabo en Aragón (Vico et al., 2011), aquí hemos detectado *S. Kapemba* en 3 (21,4 %) de los 14 animales analizados, mientras que en el estudio de referencia se identificó en sólo 11 (1,8%) de los 625 animales analizados. Además, la existencia de infecciones múltiples podría explicar la gran variabilidad de serotipos encontrados en una misma granja (en el 73,3% de las granjas de Aragón estudiadas durante el mismo periodo se identificaron más de 4 serotipos) y también indicar que el número de serotipos y cepas con AR de origen porcino que podrían causar salmonelosis humana es mayor que lo descrito.

Por otra parte, la existencia de infecciones múltiples por cepas del mismo serotipo con diferentes perfiles de AR sugiere la transferencia horizontal de material genético entre bacterias, facilitado por la existencia de plásmidos, transposones, integrones e islas genómicas (Miriagou et al., 2006; Mulvey et al., 2006). Sin embargo, la existencia de infecciones simultáneas por diferentes serotipos de *Salmonella* en un mismo animal sugiere la existencia de reinfecciones y/o múltiples fuentes de infección. Curiosamente, todos los casos de coinfecciones por cepas de distinto serotipo estaban producidas por cepas pertenecientes a diferentes serogrupos. Desde un punto de vista inmunológico, esto podría indicar la existencia en *Salmonella* de una protección específica de serogrupo frente a la reinfección. En caso de confirmarse este aspecto con experimentación adicional, sugeriría la necesidad de desarrollar vacunas polivalentes con antígenos de múltiples serogrupos para conferir una protección eficaz frente a las infecciones por *Salmonella*.

En conclusión, el porcino destinado a consumo humano puede estar infectado simultáneamente por cepas de *Salmonella* pertenecientes a diferentes serotipos y/o perfiles de AR, siendo lo más frecuente la presencia de cepas multi-AR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLSI/NCCLS. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7th. ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- DOUE. 2007. Decisión de la Comisión de 12 de junio de 2007 sobre la vigilancia armonizada de la resistencia a los antimicrobianos en *Salmonella* en aves de corral y cerdos. Diario Oficial de la Unión Europea C(2007) 2421.
- EFSAa. 2008. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs. Part A. EFSA J. 135:1-111.
- EFSAb. 2008. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs. Part B. EFSA J. 206:1-111.
- EFSA. 2009. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. EFSA J 223: 1-312.
- ISO. 2005. International Organisation for Standardisation. ISO 6579:2002/DAM. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in Animal Faeces and in Samples from the Primary Production Stage. Geneve, Suiza.
- Miriagou, V., Carattoli, A. & Fanning, S. 2006. *Microbes Infect* 8: 1923-1930.
- Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B. & Cloeckaert, A. 2006. *Microbes Infect* 8: 1915-1922.
- OIE, 2009, Terrestrial Manual Part 3. 2009. 12 rue de Prony 75017 Paris, France. http://www.oie.int/download/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf.
- Vico, J.P., Rol, I., Garrido, V., San Román, Grilló, M.J. & Mainar-Jaime, R.C. 2011. *J Food Protect* (2011, in press).

Agradecimientos: Trabajo de investigación cofinanciado por el Gobierno de Navarra (proyecto IIQ14064.R11) y el INIA (RTA2007-00065-00-00). Becas de P.C. y S.S., financiadas por el CSIC (JAE-Intro) y el programa Erasmus Mundus 18, respectivamente.

SIMULTANEOUS INFECTION BY SALMONELLA STRAINS OF DIFFERENT SEROTYPES AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS IN FINISHING PIGS

ABSTRACT: *Salmonella* is recognized as a major zoonotic disease, being finishing pigs one of the main sources of infection. Several colonies (2-12, when possible) of *Salmonella* spp. isolated from mesenteric lymph nodes cultures of each finishing pig were characterized for serotype and antimicrobial resistance (AR) against 19 agents. A total of 58 strains, belonging to 8 serotypes of 5 serogroups, and showing 11 different patterns of multi-AR were isolated. Most of the animals were infected simultaneously by 2 or 3 strains of *Salmonella* showing different serogroup and/or AR pattern. The 95% of strains analysed were resistant to at least one agent, showing most of them multi-AR to ACSSuT, CSSuT, CSSuT and ASSu family agents. S. Typhimurium and S. Kapemba were the serotypes showing AR against higher number of agents. To our knowledge, this is the first report on simultaneous infection by different *Salmonella* serotype and AR pattern strains in pigs, a finding that could have epidemiological and immunological relevance.

Keywords: *Salmonella*, finishing pigs, serotypes, antimicrobial resistance.