



**Estudio caso-caso de los factores de riesgo asociados a los episodios esporádicos de gastroenteritis por *Salmonella enterica* 1,4,[5],12;i:-. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF para el tipado de *Salmonella* spp**

**TESIS DOCTORAL**

D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer

Dirigida por:

Dra Rosario Moreno Muñoz

Dr Alberto Arnedo Pena

Junio 2023



**Programa de Doctorado en Ciencias de la Enfermería  
Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I**

**Estudio caso-caso de los factores de riesgo asociados a los episodios esporádicos de gastroenteritis por *Salmonella enterica* 1,4,[5],12;i:-. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF para el tipado de *Salmonella* spp**

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer para optar al grado de doctora por la Universitat Jaume I

M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer

M<sup>a</sup> Rosario Moreno Muñoz

Alberto Arnedo Pena

Castelló de La Plana, junio 2023

## **LICENCIA**

Licencia CREATIVE COMMONS  
Reconocimiento - Compartir igual (BY-SA)



## **FINANCIACIÓN**

La presente Tesis Doctoral no ha recibido financiación para su realización

**Als meus pares  
A Irene i Pau**

## **Agradecimientos**

*Quiero empezar dándoles las gracias a mis directores de tesis, dos de las personas más trabajadoras y generosas con sus conocimientos que conozco. Gracias Alberto por contagiarme el interés por la epidemiología de las infecciones entéricas, por tu ayuda desinteresada, tu amabilidad y tus ánimos, por estar siempre disponible, por tu capacidad de análisis y porque sin tí esto no hubiera sido posible. Gracias Marosi, mi jefa y amiga, por enseñarme a ser mejor tanto a nivel profesional como personal, por tu agudeza mental, por tener siempre tiempo para mí, por tus aportaciones y tu trabajo, y por acompañarme y apoyarme durante todo este proceso.*

*Gracias a mi tutora Loreto Maciá Soler, Coordinadora del programa de Doctorado, por acogerme y orientarme, y por la paciencia que ha tenido respondiendo y solucionando todas las dudas y problemas que me han ido surgiendo.*

*Gracias a todas mis compañeras/amigas del Servicio de Microbiología por su respaldo y por tratarme siempre con cariño. A todas, pero fundamentalmente a las de siempre: Susana, Maria y Bárbara. Gracias a Silvia y al resto del personal Técnico del laboratorio, me siento muy afortunada por compartir el trabajo con ellas.*

*Gràcies mare i pare per voler-me i cuidar-me com ho feu, per confiar tant en mi i respectar totes les meues decisions. Aquest treball va sobretot per a vosaltres perquè és gràcies a vosaltres que he arribat ací. Gràcies als meus germans, els meus seguidors més entusiastes. Gràcies a Jose per acceptar la meua feina tal com és i habilitar-me un agradable espai on concentrar-me i escriure, formem un bon equip. Gràcies als meus fills que m'han fet descobrir l'amor incondicional, espere que no em tingueu en compte les hores que no vos he dedicat i que estigueu orgullosos de mí. Vos vull moltíssim a tots.*

# Índice

Índice de abreviaturas.....	8
Índice de tablas.....	9
Índice de figuras.....	13
RESUMEN/ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN.....	18
1.- GÉNERO SALMONELLA.....	23
1.1.- Características generales.....	23
1.2.- Taxonomía y Nomenclatura.....	24
1.2.1.-Taxonomía.....	24
1.2.2.- Nomenclatura.....	25
1.3.- Cultivo, Identificación y Caracterización bioquímica.....	27
1.4.- Serotipificación y otras formas de tipado.....	31
1.4.1.- Serotipificación.....	31
1.4.2.- Otras formas de tipado.....	34
1.5.- Epidemiología.....	36
1.5.1.- Panorama general.....	36
1.5.2.- Especificidad de hospedador.....	38
1.5.3.- Reservorio y Modo de transmisión.....	39
1.5.4.- Dosis infecciosa.....	40
1.5.5.- Vigilancia y Control.....	41
1.6.- Patogenia y factores de virulencia.....	42
1.7.- Manifestaciones clínicas.....	44

1.7.1.- Salmonelosis no tifoidea.....	45
1.7.2.- Fiebre tifoidea y paratifoidea.....	46
1.8.- Tratamiento antibiótico.....	47
1.9.- Medidas preventivas.....	49
2.- TYPHIMURIUM MONOFÁSICA.....	52
2.1.- Introducción.....	52
2.2.- Mecanismo de Variación de Fase. Base Genética del Fenotipo Monofásico.....	54
2.2.1.- Mecanismo de Variación de Fase.....	54
2.2.2.- Base Genética del Fenotipo Monofásico.....	55
2.3.- Clones.....	57
2.4.- Éxito ecológico.....	60
2.5.- Reservorio principal: el Cerdo.....	61
3.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS. MALDI-TOF.....	64
3.1.- Introducción.....	64
3.2.- Aplicaciones de la Espectrometría de Masas MALDI-TOF.....	66
3.2.1.- Identificación de microorganismos.....	66
3.2.2.- Estudios de tipificación.....	67
3.2.3.- Otras aplicaciones.....	68
3.3.- Plataformas comerciales.....	69
3.4.- MALDI-TOF y <i>Salmonella</i> spp.....	70
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	72
1.-HIPÓTESIS.....	73
2.- OBJETIVOS.....	73

METODOLOGÍA.....	74
1.-DISEÑO.....	75
2.-ÁMBITO DEL ESTUDIO.....	75
3.-POBLACIÓN Y TAMAÑO MUESTRAL.....	77
4.- VARIABLES DEL ESTUDIO DESCRIPTIVO Y DEL ESTUDIO CASO-CASO.....	79
4.1.- Variables primarias.....	79
4.2.- Variables secundarias.....	80
5.- OBTENCIÓN Y RECOGIDA DE DATOS.....	81
5.1.- Estudio observacional descriptivo y estudio caso-caso.....	81
5.2.- Estudio experimental.....	82
6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	84
7.- CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	85
RESULTADOS.....	87
1.- ESTUDIO OBSERVACIONAL DESCRIPTIVO PROSPECTIVO.....	88
1.1.- Estudio general descriptivo.....	88
1.2.- Comparación de los periodos pre y postpandemia.....	96
2.- ESTUDIO PROSPECTIVO CASO-CASO.....	100
2.1.- Características generales de los pacientes incluidos en el estudio caso-caso.....	100
2.2.- Comparación de las variables estudiadas entre el grupo caso 1 (S. 1,4,[5],12:i:-) y el grupo caso 2 (resto de serotipos).....	103
2.3.- Análisis univariante de los factores de riesgo de infección por S. 1,4,[5],12:i:-.....	110

2.4.- Análisis multivariante de los factores de riesgo de infección por S. 1,4,[5],12:i:-.....	113
3.- ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	114
DISCUSIÓN.....	118
.1.-ESTUDIO GENERAL DESCRIPTIVO .....	119
.2.-ESTUDIO CASO-CASO.....	126
.3.-ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	132
CONCLUSIONES.....	135
REFERENCIAS.....	138
ANEXOS.....	176
Anexo I. CUESTIONARIO EPIDEMIOLOGICO/CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS	
Anexo II. TABLA ANONIMIZADORA	
Anexo III. CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS	
Anexo IV. INFORME COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓ	
Anexo V. AUTORIZACIÓN DE LA RESPONSABLE DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA	
Anexo VI. CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL	
Anexo VII. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE ORAL	
Anexo VIII. ANEXO VIII. CONSENTIMIENTO POR ESCRITO	

## Índice de abreviaturas

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight

O: Somático

H: Flagelar

Vi: Virulencia

ASM: Sociedad Americana de Microbiología

OMS: Organización Mundial de la Salud

CDC: Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SH2: Sulfhídrico

EMB: Eosina azul de metileno

SS: Salmonella Shigella

XLD: Xilosa Lisina Desoxicolato

HE: Hektoen

BG: Verde Brillante

LIA: agar Lisina Hierro

TSI: Triple Azúcar Hierro

KIA: agar Kliger

PFGE: Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

MLST: Tipado por Secuenciación de Múltiples Locus

MLVA: Análisis de Polimorfismos en las Secuencias Repetidas en Tándem

ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosómico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

RENAVE: Red Nacional de Vigilancia de la Salud

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

SST3: Sistemas de Secreción de Tipo III

SPI: Isla de Patogenicidad

SST1: Sistema de Secreción de Tipo I

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

XDR: Extremadamente Resistente

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

IS: Elemento de Inserción

A: Ampicilina

C: Cloranfenicol

Su: Sulfonamidas

G: Gentamicina

S: Estreptomicina

T: Tetraciclina

SxT: Trimetoprima Sulfametoxazol o Cotrimoxazol

FDA: Food and Drug Administration

CE-IVD: Conformité Européenne-In Vitro Diagnostic

RUO: Research Use Only

M.I.R.: Médico Interno Residente

F.I.R.: Farmacéutico Interno Residente

SIP: Sistema de Información Poblacional

COVID-19: Enfermedad Infecciosa causada por el SARS-CoV-2

OR: Odds Ratio

IC: Intervalo de Confianza

AMP: Ampicilina

AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulánico

CIP: Ciprofloxacino

SXT: Cotrimoxazol

CTX: Cefotaxima

IPM: Imipenem

## Índice de tablas

Tabla 1. Última actualización del número de serotipos por especie y subespecie del género *Salmonella*

Tabla 2. Características bioquímicas diferenciales de las especies y subespecies de *Salmonella*

Tabla 3. Tamaño muestral para exposiciones a productos porcinos 41% y 62% (diferencia 21%) con error Alpha 5% y diferentes potencias

Tabla 4. Tamaño muestral para Typhimurium/1,4,[5],12:i:-

Tabla 5. Tamaño muestral para Enteritidis

Tabla 6. Biomarcadores propuestos por Dieckmann y Malorny

Tabla 7. Distribución de los pacientes por grupos de edad (n/%)

Tabla 8. Distribución de los pacientes hospitalizados por grupos de edad (n/%)

Tabla 9. Comparación de los casos de salmonelosis en el periodo de septiembre a diciembre (años 2018-2020)

Tabla 10. Comparación de los casos de salmonelosis en el periodo de enero a marzo (años 2019-2021)

Tabla 11. Distribución de todos los serotipos por año de estudio

Tabla 12. Tendencia de los serotipos durante los años 2018-2021.

Tabla 13. Comparación de los serotipos más frecuentes por edad (n=272)

Tabla 14. Comparación de los serotipos más frecuentes por sexo (n=272)

Tabla 15. Distribución de los casos de 1,4,[5],12:i:- y Enteritidis por trimestres (2019-2020)

Tabla 16. Porcentajes de susceptibilidad por antimicrobiano/año y global (n/%)

Tabla 17. Perfiles de Resistencia de las cepas del serotipo 1,4,[5],12:i:-

Tabla 18. Perfiles de Resistencia de las cepas del serotipo Enteritidis

Tabla 19. Perfiles de Resistencia de las cepas del serotipo Montevideo

Tabla 20. Perfiles de Resistencia de las cepas del serotipo Typhimurium

Tabla 21. Distribución de todos los serotipos en dos etapas: pre y post inicio del confinamiento

Tabla 22. Comparación de los porcentajes de sensibilidad a los antimicrobianos estudiados en dos etapas: pre y post inicio del confinamiento

Tabla 23. Distribución de los pacientes por grupos de edad y hospitalización.

Tabla 24. Desglose de las enfermedades crónicas de los pacientes del estudio caso-caso

Tabla 25. Serotipos distintos de 1,4,[5],12:i:- aislados en los pacientes del estudio caso-caso

Tabla 26. Características de los pacientes con infección esporádica por S. 1,4,[5],12:i:- y por otros serotipos

Tabla 27. Comparación por grupos de las manifestaciones clínicas de los pacientes

Tabla 28. Distribución de los pacientes de los dos grupos según perfiles de manifestaciones clínicas

Tabla 29. Pacientes hospitalizados por grupo y franja de edad

Tabla 30. Características de los pacientes de cada grupo según tratamiento ambulatorio u hospitalario

Tabla 31. Comparación de los factores de riesgo entre los casos de los dos grupos

Tabla 32. Comparación del consumo de alimentos en los 15 días previos entre los casos de los dos grupos a estudio

Tabla 33. Análisis multivariante de consumo de determinados productos porcinos como factores de riesgo de infección por S. 1,4,[5],12:i:-

Tabla 34. Diferencias entre los biomarcadores propuestos por Dieckmann y Malorny<sup>282</sup> y los encontrados con VITEK® MS

Tabla 35. Comparación de los resultados de identificación del serotipo Typhimurium/1,4,[5],12:i:- mediante espectrometría de masas con los obtenidos con la serotipificación tradicional

Tabla 36. Comparación de los resultados de identificación del serotipo Enteritidis mediante espectrometría de masas con los obtenidos con la serotipificación tradicional

## Índice de figuras

Figura 1. Colonias de *Salmonella* spp en agar MacConkey y SS

Figura 2. Esquema explicativo del mecanismo de Variación de Fase

Figura 3. Ejemplo de espectro obtenido a partir de una cepa bacteriana

Figura 4. Tendencia de los casos de salmonelosis a lo largo del periodo de estudio

Figura 5. Tendencia estacional de los casos de Enteritidis y del serotipo 1,4,[5],12:i:-

Figura 6. Distribución por meses de los grupos caso 1 y caso 2

Figura 7. Diagrama explicativo de la relación causa-efecto entre el consumo de alimentos (productos porcinos) y el efecto (infección por *S.* 1,4,[5],12:i:-), ajustado por factores de confusión

Figura 8. Espectro obtenido con VITEK® MS, correspondiente a *S.* Enteritidis (biomarcador principal resaltado)

Figura 9. Espectro obtenido con VITEK® MS, correspondiente a *S.* Typhimurium/1,4,[5],12:i:- (biomarcador principal resaltado)

## RESUMEN:

**Objetivos:** Conocer la frecuencia, evolución y sensibilidad antibiótica de los serotipos de *Salmonella* spp encontrados en el Departamento de Salud Castellón. Comprobar si el riesgo de sufrir una infección esporádica por *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- aumenta con el consumo de productos porcinos u otros factores de riesgo. Verificar si el espectrómetro de masas VITEK®MS (bioMérieux) es capaz de diferenciar los serotipos más frecuentes.

**Metodología:** Estudio observacional descriptivo prospectivo de todos los casos con aislamiento de *Salmonella* spp en coprocultivo desde el 16 de septiembre de 2018 al 15 de marzo de 2021 en el laboratorio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón. Se comparó la exposición a productos porcinos y otros factores de riesgo de los pacientes con S. 1,4,[5],12:i (caso 1) con la de los pacientes con infección por otros serotipos (caso 2) mediante un estudio caso-caso. Se utilizaron los picos de proteínas obtenidos con VITEK®MS a partir de las cepas aisladas para diferenciar los serotipos Enteritidis y Typhimurium/1,4,[5],12:i:- (protocolo de Dieckmann y Malorny<sup>281</sup>) empleando como gold-standard la serotipificación tradicional. El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo con el programa Stata® versión 14.

**Resultados:** El grupo de edad con más casos fue el de <5 años. Los hombres (p=0,006), y los pacientes de mayor edad (p=0,000), presentaron más riesgo de ser hospitalizados. Hubo más casos entre finales de primavera y principios de otoño (0,011). Los serotipos más frecuentes fueron: 1,4,[5],12:i:- (43%), Enteritidis (29%) y Montevideo (7,4%). El 52,2% de las cepas fueron sensibles a ampicilina, 65,1% a amoxicilina-clavulánico, 97,4% a ciprofloxacino, 91,2% a cotrimoxazol, 99,3% a cefotaxima y 100% a imipenem. El 89,7% de las cepas de S. 1,4,[5],12:i:- presentaron resistencia a algún antimicrobiano. A partir del confinamiento por la pandemia de COVID-19 los pacientes fueron más mayores (p=0,001) y tuvieron más ingresos (p=0,04), disminuyeron los casos por el serotipo 1,4,[5],12:i:- y aumentaron los de Enteritidis (p=0,000). Comparando los dos grupos del estudio caso-caso, los pacientes con infección por S.

1,4,[5],12:i:- fueron significativamente más jóvenes ( $p=0,000$ ). El consumo de alimentos porcinos curados crudos se asoció significativamente con esta infección en los pacientes de entre 0 y 9 años ( $OR=3,79$ , 95% IC 1,42-10,03,  $p=0,008$ ), y dentro de estos en concreto con la longaniza seca ( $OR=10,04$ , 95% IC 2,72-37,02,  $p=0,001$ ). El espectrómetro VITEK®MS identificó los serotipos Typhimurium/1,4,[5],12:i:- con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del 98,4%, 100%, 100% y 98,6%, respectivamente; para Enteritidis, estos valores fueron todos del 100%.

**Conclusiones:** El serotipo más frecuentemente aislado en casos esporádicos de salmonelosis en nuestro medio es el 1,4,[5],12:i:-, el único relacionado significativamente con la menor edad de los pacientes y el que presenta mayor porcentaje de resistencia a los antimicrobianos estudiados. A partir del confinamiento el serotipo predominante es Enteritidis, los enfermos son más mayores y el porcentaje de hospitalización es más elevado. Los resultados de nuestro estudio caso-caso indican que el consumo de productos porcinos curados-crudos en general, y de longaniza seca en particular (potencia estadística: 99,36%), se asocia significativamente con las infecciones por S.1,4,[5],12:i:- en los pacientes de 0-9 años. VITEK®MS permite una identificación precisa del serotipo Enteritidis.

**Palabras clave:** *Salmonella* 1,4,[5],12:i:-, serotipo, estudio caso-caso, VITEK®MS

## ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study was to investigate the frequency, evolution and antibiotic sensitivity of *Salmonella* spp serotypes found in the Castellón Health Department. To check whether the risk of suffering a sporadic *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- infection increases with the consumption of pork products or other risk factors. To evaluate the potential of the VITEK®MS mass spectrometry system (bioMérieux) for identification the most frequent serotypes.

**Methodology:** From September 16, 2018 to March 15, 2021, a prospective descriptive observational study of *Salmonella gastroenteritis* cases with isolation was carried out in the Microbiology laboratory of Hospital General de Castellón. Exposure to pork products and other risk factors of patients with sporadic *S.* 1,4,[5],12:i:- infections (case 1) was compared with other serotypes (case 2) infections using a case-case study. Protein peaks obtained with VITEK®MS from the isolated strains were used to differentiate Enteritidis and Typhimurium/1,4,[5],12:i:- serotypes (Dieckmann and Malorny<sup>281</sup> protocol) using traditional serotyping as gold-standard. Statistical analysis was carried out with Stata ® version 14.

**Results:** The age group with more cases was <5 years old. Males ( $p=0.006$ ), and older patients ( $p=0.000$ ), had a higher risk of being hospitalized. There were more cases between late spring and early fall ( $0.011$ ). The most frequent serotypes were: 1,4,[5],12:i:- (43%), Enteritidis (29%) and Montevideo (7.4%). Of the strains, 52.2% were sensitive to ampicillin, 65.1% to amoxicillin-clavulanic acid, 97.4% to ciprofloxacin, 91.2% to cotrimoxazole, 99.3% to cefotaxime and 100% to imipenem. Among the *S.* 1,4,[5],12:i:- strains, 89.7% showed resistance to any antimicrobial. After the COVID-19 pandemic lockdown, patients were older ( $p=0.001$ ) and had more admissions ( $p=0.04$ ), serotype 1,4,[5],12:i:- infections decreased while Enteritidis increased ( $p=0.000$ ). Comparing the two groups of the case-case study, patients with *S.* 1,4,[5],12:i:- infection were significantly younger ( $p=0.000$ ). The consumption of raw pork products was significantly associated with this infection in patients aged 0-9 years (OR=3.79, 95% CI 1.42-10.03,  $p=0.008$ ), and particularly with dried pork sausages

(OR=10.04, 95% CI 2.72-37.02, p=0.001). The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the VITEK® MS system to identify Typhimurium/1,4,[5],12:i:- serotypes were 98.4%, 100%, 100% and 98.6%, respectively; for Enteritidis, these values were all 100%.

**Conclusions:** The serotype most frequently isolated in salmonellosis sporadic cases is 1,4,[5],12:i:-, the only one significantly related to the younger age of the patients and the one with the highest antimicrobial resistance rates. After the COVID-19 pandemic lockdown, the predominant serotype is Enteritidis, the patients are older and the hospitalization rate is higher. The results of our case-case study indicate that the consumption of raw pork products and dried pork sausages, is significantly associated with S.1,4,[5],12:i:- infections in patients aged 0-9 years. VITEK®MS allows accurate identification of the Enteritidis serotype.

**Keywords:** *Salmonella* 1,4,[5],12:i:-, serotype, case-case study, VITEK®MS.

# **INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades transmitidas por alimentos, también denominadas intoxicaciones o toxiinfecciones alimentarias, continúan siendo un problema importante para la Salud Pública del que no se encuentran exentos los países desarrollados. Pueden aparecer en forma de casos aislados o como brotes epidémicos de mayor o menor entidad. Generalmente ocasionan manifestaciones clínicas leves de tipo gastrointestinal que suelen ser autolimitadas, siendo la principal la diarrea, pero también pueden presentarse como procesos graves dependiendo, sobre todo, de determinados factores intrínsecos de los pacientes. En cualquier caso, la carga que suponen las enfermedades de transmisión alimentaria es más que considerable; millones de personas las padecen cada año y cientos de miles mueren, sobre todo niños pequeños que viven en regiones pobres. Entre sus principales agentes etiológicos se encuentran *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp no tifoidea y norovirus.

La enterobacteria *Salmonella* es uno de los patógenos causantes de zoonosis con mayor impacto en los humanos. Tradicionalmente las aves de corral y sus productos, particularmente los huevos, se han considerado su reservorio y su fuente de infección principales respectivamente. Esta bacteria fue durante muchos años la primera etiología de las infecciones transmitidas por alimentos en la Unión Europea, pero, a raíz de las medidas que se implementaron con el fin de controlar y reducir la salmonelosis en el sector avícola, a partir del año 2005 pasó a ocupar el segundo puesto por detrás de *Campylobacter* spp. La tendencia decreciente de casos confirmados de gastroenteritis por *Salmonella* spp se mantuvo hasta 2014, año en el que dejaron de disminuir y se estabilizaron<sup>1</sup>. El panorama en España ha sido un poco distinto al de otros países europeos: aunque *Salmonella* spp también se convirtió en la segunda causa de gastroenteritis infecciosa, la disminución de casos sólo se mantuvo hasta 2008 y entre este año y 2015 la tendencia volvió a ser creciente<sup>2</sup>.

*Salmonella* spp se clasifica en serotipos en base a la caracterización de sus antígenos somáticos y flagelares. Aunque ya se han descrito más de 2600, Enteritidis y Typhimurium son los que se identifican en la mayoría de los casos notificados en humanos. El primero es el que se aísla con más frecuencia en

los brotes, mientras que el segundo habitualmente da lugar a casos esporádicos. El estudio de brotes es una práctica habitual de los Servicios de Epidemiología que permite encontrar asociaciones entre las infecciones y determinados productos de consumo que actúan como fuentes de transmisión. Sin embargo, los estudios epidemiológicos de casos esporádicos de salmonelosis son escasos<sup>3</sup>.

En las últimas décadas ha surgido un nuevo serotipo: *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser 1,4,[5],12:i:-<sup>4</sup>. Se trata de una variante monofásica de *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Typhimurium que es incapaz de expresar los antígenos flagelares de segunda fase y que empezó a detectarse en España a partir de 1997. Su incidencia ha ido en aumento tan significativamente que ha pasado de comunicarse de manera anecdótica a ser considerado uno de los serotipos más importantes a nivel mundial. Tanto en Europa como en España es el tercero más frecuentemente identificado a partir de muestras clínicas<sup>1,5</sup>. En el caso concreto de nuestro Departamento de Salud el avance de esta variante ha sido aún más extraordinario. En el periodo 2000-2006 fue el cuarto serotipo más identificado, representando un 1,73% del total, y en 2016 y 2017 ya era el más prevalente suponiendo, respectivamente, el 62,6% y el 66,6% de todas las cepas de salmonela aisladas.

Desde un punto de vista epidemiológico *S.* 1,4,[5],12:i:- está fuertemente asociada a la cadena alimentaria de producción porcina, mientras que la distribución de las fuentes de *S.* Typhimurium es más heterogénea a pesar de que su reservorio principal es también el cerdo. España es uno de los países con mayor número de explotaciones porcinas y tiene una gran tradición de elaborar productos de charcutería a base de carne de cerdo que se consumen cocinados, crudos o curados. *S.* 1,4,[5],12:i:- parece poseer alguna ventaja competitiva in vivo en este animal con respecto a *S.* Typhimurium y, al menos en nuestra región, podría haberse convertido en su serotipo patógeno principal. La ingesta de productos porcinos no cocinados contaminados con esta variante podría causar infecciones esporádicas sintomáticas e incluso brotes. Conocer los serotipos circulantes de *Salmonella* spp es un paso previo clave para poder controlar las infecciones que causa, pero se trata de un proceso

lento y laborioso, y debe realizarse en Centros de Referencia especializados donde se garantice su ejecución adecuada. Así que encontrar una alternativa válida y al alcance de los laboratorios clínicos sería muy útil. El Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón realiza el serotipado de todas las salmonelas que aísla por aglutinación sobre portaobjeto según el esquema de Kauffmann-White-Le Minor<sup>6</sup> consiguiendo identificar los serotipos Typhimurium, Enteritidis, Typhi, Hadar y Virchow. El resto de las cepas se caracterizan sólo a nivel de serogrupo B, C y D, o como *Salmonella* spp. Todos los aislamientos se remiten posteriormente al Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda (Centro Nacional de Referencia), así que disponemos de la serotipificación completa de todas nuestras cepas.

La espectrometría de masas MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) ha revolucionado el campo de la identificación de microorganismos a partir de cultivos en los laboratorios de Microbiología. Esta técnica se basa en el análisis proteico y ha superado a los métodos fenotípicos clásicos tanto en fiabilidad como en disminución del tiempo en que se obtiene la identificación. Además, tiene otras posibles aplicaciones entre las que se encuentra el tipado de bacterias. Ya se ha intentado diferenciar distintos serotipos de *Salmonella* spp empleando MALDI-TOF, pero de momento no han podido estandarizarse protocolos sencillos que puedan reproducirse de rutina y que puedan reemplazar al método convencional.

En el trabajo que se expone a continuación se examina la frecuencia de los serotipos de *Salmonella* spp identificados en el Departamento de Salud de Castellón durante el periodo de estudio y su sensibilidad a los antimicrobianos más utilizados para su tratamiento. En los casos de gastroenteritis causadas por S. 1,4,[5],12:i:- no asociados a brotes se estima si el riesgo de sufrir una infección esporádica por este serotipo aumenta con el consumo de determinados productos porcinos, para así poder proponer medidas de prevención adecuadas de la misma forma que ya están establecidas para los huevos y sus derivados. Además, se utilizan las cepas de *Salmonella* spp aisladas en nuestro laboratorio para explorar las aplicaciones del VITEK®MS

(BioMérieux) (espectrometría de masas MALDI-TOF) con el objetivo de diferenciar los serotipos de *Salmonella* spp más prevalentes en nuestro medio.

# 1.- GÉNERO *SALMONELLA*

## 1.1.- Características generales

El género *Salmonella* pertenece a la Clase  $\gamma$ -Proteobacteria, Orden Enterobacteriales, Familia Enterobacteriaceae, Tribu Salmonelleae<sup>7</sup> y actualmente se clasifica en dos especies: *Salmonella enterica*, con seis subespecies, y *Salmonella bongori*. Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y colonizan el tracto gastrointestinal de numerosas especies de animales, tanto mamíferos como aves, reptiles, anfibios, peces y crustáceos<sup>8,9</sup>. Su importancia como patógenos reside en que pueden causar una amplia variedad de enfermedades, principalmente infecciones entéricas, en un extenso rango de hospedadores<sup>10,11</sup>.

Los microorganismos que forman parte del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos de 0,2-1,5×2-5µm, anaerobios facultativos, no formadores de esporas y móviles (excepto *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Gallinarum y *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Pullorum). Son capaces de fermentar la glucosa con producción de gas (a excepción de *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Typhi), pero no la lactosa ni la sacarosa, reducen los nitratos a nitritos, descarboxilan lisina y ornitina, no degradan la urea y producen ácido sulfhídrico, pero no indol. Los miembros de este género tienen la capacidad de metabolizar nutrientes por la vía respiratoria y fermentativa<sup>12</sup>.

La temperatura óptima de crecimiento de *Salmonella* spp es de 37°C con un rango de 2 a 54°C, y puede vivir en un pH de 3,8 a 9,5 aunque el ideal va de 6,5 a 7,5<sup>13</sup>.

Estas bacterias se caracterizan por presentar antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H) y, en ocasiones, un antígeno capsular de virulencia (Vi). Su combinación permite agruparlas en serotipos. Curiosamente, aunque hay más de 2600, sólo unos pocos causan la mayoría de las enfermedades humanas y animales<sup>14</sup>.

## 1.2.- Taxonomía y Nomenclatura

### 1.2.1.-Taxonomía

En 1885 Theobald Smith y Daniel Elmer Salmon aislaron y describieron por primera vez la bacteria *Salmonella* a partir de muestras intestinales recogidas de cerdos enfermos. Pensando que habían conseguido identificar el agente causal de la peste porcina clásica lo llamaron *Bacillus choleraesuis*<sup>15,16</sup>. Fue Smith quien identificó este microorganismo, pero el mérito del descubrimiento se atribuyó a Salmon, que era su jefe. Por ello, en honor a este último, el bacteriólogo Joseph Léon Marcel Lignières cambió el nombre de *Bacillus choleraesuis* por *Salmonella choleraesuis* en 1900 introduciendo así el término *Salmonella* para denominar a este nuevo género bacteriano<sup>17</sup>.

Clasificar taxonómicamente este grupo de bacterias ha resultado un proceso largo y complejo, repleto de polémicas y de opiniones encontradas entre la comunidad científica. En la clasificación actual en el género *Salmonella* sólo se incluyen dos especies: *Salmonella enterica* (que a su vez se divide en seis subespecies) y *Salmonella bongori*. Sin embargo, no hace demasiado tiempo, las subespecies se consideraban subgéneros y los serotipos recibían tratamiento de especie<sup>18</sup>, lo que todavía hoy conduce a errores a la hora de utilizar correctamente su nomenclatura científica.

El estudio de Crosa et al<sup>19</sup> en 1973 supuso un antes y un después en el desarrollo de la taxonomía de *Salmonella*. Este demostró mediante técnicas genéticas de hibridación que todas las especies de *Salmonella* conocidas hasta ese momento (*Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* con sus serotipos) y *Arizona* (un género aparte) estaban estrechamente relacionadas y que podían considerarse como una sola especie.

Le Minor et al propusieron en 1981 que *Salmonella choleraesuis* quedara como única especie del género, y que ésta se dividiera en siete subespecies basándose en similitudes genéticas y en diferencias bioquímicas<sup>20</sup>.

Cinco años más tarde, en el XIV Congreso Internacional de Microbiología, el Subcomité de *Enterobacteriaceae* del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática recomendó utilizar *enterica* en lugar de *choleraesuis* para nombrar a la especie tipo de *Salmonella*. El término *enterica* no se había utilizado con anterioridad para designar a ningún serotipo y, por tanto, era a su entender menos susceptible de generar confusiones<sup>21</sup>.

La propuesta anterior fue presentada formalmente por Le Minor y Popoff a la Comisión Judicial del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática: *S. enterica* como especie tipo dividida en siete subespecies (I, II, IIIa, IIIb, IV, V y VI)<sup>22</sup>. Poco tiempo después la subespecie V (*Salmonella enterica* subsp *bongori*) fue elevada a la categoría de especie gracias a las diferencias genéticas encontradas entre ésta y el resto de subespecies<sup>23</sup>. La solicitud de Le Minor y Popoff fue rechazada, pero el esquema que planteaban sí que fue adoptado por numerosas organizaciones en diferentes países incluyendo la Sociedad Americana de Microbiología (ASM), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades (CDC)<sup>24</sup>. No fue hasta 2002 cuando la Comisión Judicial del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas resolvió aceptar oficialmente la clasificación que utilizamos hoy en día<sup>25</sup>.

### 1.2.2.- Nomenclatura

Si la clasificación basada en la filogenia ha generado numerosos trabajos a lo largo del tiempo, el sustentado en el análisis antigénico o serotipificación le ha añadido aún más complejidad. La caracterización de los antígenos O y los antígenos H de este grupo de bacterias se realiza de acuerdo con las convenciones del esquema de Kauffmann-White-Le Minor de cuyo mantenimiento se encarga el Centro de Referencia de *Salmonella* del Instituto Pasteur (colaborador de la OMS)<sup>18</sup>. Cada subespecie se designa con un número romano y un nombre, y engloba un número variable de serotipos (tabla 1) que esta institución se encarga de actualizar periódicamente.

**Tabla 1. Última actualización del número de serotipos por especie y subespecie del género *Salmonella***

<b>Especies y subespecies de <i>Salmonella</i></b>	<b>Número de serotipos</b>
<b><i>Salmonella enterica</i></b>	2557
<b><i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)</b>	1586
<b><i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)</b>	522
<b><i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)</b>	102
<b><i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)</b>	338
<b><i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)</b>	76
<b><i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)</b>	13
<b><i>Salmonella bongori</i></b>	22
<b>Total (género <i>Salmonella</i>)</b>	2659

Fuente: Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme

En la actualidad, la mayoría de los Centros de Referencia de *Salmonella* del mundo emplean el sistema de nomenclatura recomendado por la OMS cuyas principales directrices son las siguientes<sup>26-28</sup>:

I. El nombre completo de un serotipo de *Salmonella* spp se escribe en este orden:

- 1º. Género (en cursiva y con la primera letra mayúscula)
- 2º. Especie (en minúscula y en cursiva)
- 3º. Subespecie (en minúscula, en cursiva y precedida por “subsp”)
- 4º. Serotipo (nombre del serotipo en mayúscula, no cursiva, precedido por- “serotipo/serovar/ser”) o fórmula antigénica.

Por ejemplo: *Salmonella enterica* subsp *enterica* serotipo Enteritidis.

II. Fórmula antigénica:

antígenos O: antígeno Vi (cuando esté presente): antígenos H fase1:  
antígenos H fase 2

Por ejemplo, fórmula antigénica del serotipo Typhimurium: 1,4,[5],12:i:1,2

III. La primera vez que se menciona un serotipo en una publicación científica debe utilizarse el nombre completo. Las veces siguientes puede abreviarse con "*Salmonella*" o "S." seguido del nombre del serotipo.

IV. Cuando se trata de *S. enterica* subsp. *enterica* no es necesario indicar la subespecie.

V. Las palabras "serotipo" y "serovar" se utilizan indistintamente. La OMS/Instituto Pasteur usan "serovar", mientras que los CDC y la ASM utilizan "serotipo" aunque están adoptando el término "serovar" para que internacionalmente se emplee el mismo término.

### **1.3.- Cultivo, Identificación y Caracterización Bioquímica**

El diagnóstico etiológico de las infecciones causadas por *Salmonella* spp se realiza en el laboratorio de Microbiología, bien a partir de la siembra de muestras clínicas aislando la bacteria en cultivo o bien, de instauración más reciente, detectando su material genético mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La muestra de elección en el caso de las infecciones gastrointestinales son las heces del paciente, y su cultivo se denomina coprocultivo. En determinadas ocasiones y dependiendo de si se sospecha una bacteriemia/sepsis u otra infección extraintestinal es necesario recoger otros tipos de muestra como sangre, orina, material de abscesos, ...

La principal desventaja del cultivo es el tiempo de obtención de resultados. Tradicionalmente no se llegaba al diagnóstico definitivo hasta unas 72 horas tras la siembra, ya que una vez crecida la colonia sospechosa era necesario someterla a un algoritmo de pruebas bioquímicas para, primero, obtener un diagnóstico presuntivo y, posteriormente, una identificación definitiva que incluye la serotipificación. Con la instauración de los sistemas automatizados este tiempo se redujo a 48 horas y con el empleo de nuevas tecnologías como la espectrometría de masas la identificación de *Salmonella* a partir del cultivo es posible en 24 horas. Las técnicas de biología molecular realizadas sobre muestra directa hacen posible la detección de esta bacteria en unas pocas horas. La principal desventaja de la amplificación de los ácidos nucleicos,

además de su precio, es que no permite la realización del estudio de sensibilidad para el que se necesita disponer de la cepa.

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* producen sulfhídrico (SH<sub>2</sub>) y no fermentan la lactosa, propiedades bioquímicas que se han utilizado para desarrollar una gran variedad de medios diferenciales y selectivos sólidos para su cultivo, aislamiento e identificación presuntiva<sup>29</sup>. Estos medios son: el agar MacConkey y el agar eosina azul de metileno (EMB), de baja selectividad; el agar Salmonella Shigella (SS), el agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y el agar Hektoen (HE), de selectividad media; y el agar verde brillante (BG) y el agar sulfito-bismuto, más selectivos. El agar lisina hierro (LIA), el triple sugar iron (TSI) y el agar Kligler (KIA) se emplean para diferenciar *Salmonella* de otras enterobacterias<sup>30,31</sup>. También se utilizan medios líquidos de enriquecimiento selectivo donde se siembran las heces y que son de gran utilidad cuando la concentración de bacterias en las mismas es baja, como suele suceder en el caso de los portadores asintomáticos. El medio de este tipo que más se emplea es un caldo que contiene selenito de sodio para inhibir bacterias gram positivas y gram negativas distintas de *Salmonella*.

Así pues, generalmente, para conseguir aislar *Salmonella* en cultivo se emplea una combinación de un medio de baja selectividad y otro de selectividad más elevada. Una de las combinaciones más empleadas en los Servicios de Microbiología es la utilización de agar MacConkey y SS (figura 1), además de caldo selenito.

**Figura 1. Colonias de *Salmonella* spp en agar MacConkey y SS**



El agar MacConkey es un medio sólido en placa para el cultivo de bacterias gram negativas aerobias. Contiene sales biliares y cristal violeta para inhibir el crecimiento de microorganismos gram positivos, y lactosa para diferenciar bacterias fermentadoras de este azúcar de las que no lo son. La fermentación produce ácido y, gracias a la presencia del indicador de pH rojo neutro, da lugar a colonias de color rosa a rojo que pueden presentarse rodeadas de un halo turbio causado por la precipitación de las sales biliares si la acidificación del medio es muy intensa. Las bacterias no fermentadoras de lactosa como *Salmonella* dan lugar a colonias incoloras.

El agar SS es otro medio sólido en placa para el aislamiento de enteropatógenos, especialmente de *Salmonella*. Inhibe el crecimiento de otros microorganismos por la presencia de verde brillante, citratos y una mayor concentración de sales biliares que el agar MacConkey. También diferencia bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, y contiene tiosulfato y sales de hierro que evidencian la formación de SH<sub>2</sub> al dar lugar a un precipitado de sulfuro de hierro de color negro. Así las colonias de *Salmonella* en este medio son redondas, incoloras y con el centro negro.

Los dos medios se incuban en aerobiosis a 37°C. Las placas deben examinarse a las 18-24 horas y el caldo de enriquecimiento se resiembró tras este tiempo de incubación en agar SS que permanece en estufa otras 18-24 horas. Clásicamente, las colonias sospechosas de *Salmonella* se someten a un cribado con la prueba de la ureasa y la siembra de la colonia sospechosa en medios de cultivo para diferenciación de enterobacterias como el TSI y el LIA<sup>32</sup>.

El TSI es un medio en tubo donde el agar se ha solidificado a 45° (en pico de flauta). Contiene glucosa, lactosa, sacarosa, rojo fenol y sulfato ferroso. Como las bacterias del género *Salmonella* fermentan la glucosa, tanto el agar del fondo del tubo como el del pico de flauta se acidifican y viran de rojo a amarillo; pero como no fermentan la lactosa, el pico de flauta vuelve a ser rojo tras 18-24 horas de incubación. La producción de SH<sub>2</sub> se manifiesta por ennegrecimiento del medio acidificado.

El agar LIA se utiliza para poner de manifiesto la descarboxilación/desaminación de la lisina y la producción de SH<sub>2</sub>. Incluye glucosa, lisina, citrato de hierro y amonio, y púrpura de bromocresol como indicador de pH. *Salmonella* fermenta la glucosa, lo que produce la acidificación del medio, pero al descarboxilar la lisina éste se vuelve a alcalinizar virando a violeta. La formación de SH<sub>2</sub> provoca el ennegrecimiento del medio.

Las pruebas bioquímicas<sup>18,33</sup> que se utilizan para la identificación de especie y/o subespecie de la bacteria (tabla 2) pueden realizarse manualmente o, más frecuentemente, utilizando sistemas de identificación automatizados, y se completan con la serotipificación.

**Tabla 2. Características bioquímicas diferenciales de las especies y subespecies de *Salmonella***

Especies	<i>S. enterica</i>					<i>S. bongori</i>	
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinasa	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Crecimiento en presencia de cianuro	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamilttransferasa	+*	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidasa	d	d	-	+	-	d	-
Mucato	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lisada por fago O1	+	+	-	+	-	+	d
Hábitat	Animales de sangre caliente			Animales de sangre fría y medio ambiente			

(\*) = Typhimurium d, Dublin -; + = ≥90 % reacciones positivas ; - = ≥90 % reacciones negativas

d = los diferentes serotipos tienen distintas reacciones

Fuente: Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th ed. Paris: Pasteur Institute, 2007

La introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF ha supuesto el inicio de una nueva era en el campo de la Microbiología Clínica ya que permite identificar en pocos minutos colonias bacterianas aisladas en medios de cultivo sólidos con un nivel de confianza comparable al de las técnicas de biología molecular. De esta manera, se puede llegar al diagnóstico de una salmonelosis en el mismo momento en que se observan las colonias sospechosas, en lugar de las 48-72 horas que requiere la identificación clásica.

## **1.4.- Serotipificación y otras formas de tipado**

### **1.4.1.-Serotipificación**

La serotipificación es un método fenotípico de tipado que se usa para diferenciar aislamientos de *Salmonella* más allá del nivel de subespecie<sup>27</sup>. Está basado en la gran variabilidad de los antígenos O, los antígenos H y el antígeno capsular Vi y consiste en su caracterización, generalmente, por aglutinación en portaobjetos<sup>34</sup>.

Los antígenos O determinan el serogrupo y los antígenos H acaban de definir el serotipo al que pertenece una cepa de *Salmonella*<sup>35</sup>. El antígeno Vi es un polisacárido capsular que se encuentra sólo en *S. Typhi*, *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Paratyphi C y *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Dublin<sup>13</sup>.

El antígeno O es un polisacárido termoestable presente en la superficie del lipopolisacárido de la membrana externa de la bacteria. Cada antígeno está formado habitualmente por 6 unidades de azúcar. Las diferencias entre los antígenos O tienen su origen en la naturaleza, orden y unión de los distintos azúcares que los componen<sup>27</sup>. Se clasifican en dos tipos: mayores y menores. Los antígenos mayores son los que están presentes en todas las bacterias de un mismo serogrupo por lo que lo caracterizan. Los antígenos O menores no son específicos, pueden detectarse en miembros de distintos serogrupos. Su identificación se realiza en dos pasos: primero, la cepa de *Salmonella* se enfrenta a antisueros polivalentes para agruparla de forma preliminar y después se utilizan antisueros monovalentes específicos. Esto mismo se aplica también para los antígenos flagelares<sup>36</sup>.

La mayoría de las cepas de *Salmonella* son móviles gracias a flagelos peritricos. El antígeno H es la porción filamentosa de estos flagelos y está compuesto por subunidades de proteínas llamadas "flagelina" que también poseen una región variable<sup>36</sup>. Los antígenos flagelares pueden estar codificados por dos genes diferentes en el cromosoma bacteriano: *fliC* y *fljB*. Su expresión alternativa se regula a través de un mecanismo conocido como "variación de fase". Esta característica es única entre las enterobacterias. La mayoría de los serotipos son bifásicos ya que pueden expresar ambos genes (fase 1 y fase 2)<sup>37</sup>. Sin embargo, hay serotipos que son monofásicos bien de forma intrínseca, como *S. Typhi* o *S. Enteritidis*, o bien porque han perdido la capacidad de manifestar uno de los dos tipos de flagelina<sup>34</sup>. Como una célula bacteriana no puede expresar las dos fases al mismo tiempo, para poder identificar los serotipos bifásicos se realiza una técnica denominada "Método de Inversión de Fase". Este consiste en inmovilizar la fase ya expresada para permitir la expresión de la otra, y se basa en que los anticuerpos tienen la capacidad de paralizar a los antígenos H homólogos. Para llevarlo a cabo se siembra la cepa de *Salmonella* a estudio en un agar semisólido de movilidad (Sven Gard) al que se ha adicionado previamente el antisuero contra el antígeno H ya expresado. Las células bacterianas que posean flagelos de esta especificidad serán inmovilizadas y sólo podrán crecer cerca del punto de inoculación y las que tengan los flagelos de la otra fase se movilizarán a través del medio de cultivo y aglutinarán con los antisueros de ésta<sup>27,38</sup>.

La gran diversidad antigénica de las bacterias del género *Salmonella* da lugar a un considerable número de combinaciones distintas y, por tanto, de serotipos. En la última actualización del esquema de Kauffmann-White-Le Minor el número serotipos alcanza la cifra de 2659<sup>33</sup>. Para nombrar adecuadamente los nuevos que van apareciendo se siguen las normas de este esquema, algunas de las cuales han sufrido cambios a lo largo del tiempo<sup>18,26,27,28</sup>:

I. Actualmente los serotipos reciben nombre únicamente en función del lugar donde se aíslan originariamente, pero con anterioridad también se elegían haciendo referencia a la enfermedad que causaban y/o al animal del que se habían obtenido por primera vez. Los de la subespecie *enterica* se mencionan

por su nombre (siempre que la cepa exprese todos los antígenos que caracterizan dicho serotipo), el resto de las subespecies y *S. bongori* se designan mediante su fórmula antigénica. Como excepción, los miembros de las subespecies II, IV, VI y *S. bongori* mantienen sus nombres si estos fueron asignados antes de 1966.

II. Para denominar a los antígenos O se utilizaban las letras del abecedario, pero cuando ya se habían empleado todas se siguió con números (del 51 al 67). Con el fin de unificar criterios, ahora se usan números para todos los antígenos somáticos y las letras se mantienen provisionalmente entre paréntesis y sólo de forma opcional. Algunos antígenos O están presentes de forma variable. Para señalar dicha variabilidad se emplean distintos símbolos en la fórmula antigénica; por ejemplo, si el antígeno está codificado por un bacteriófago se subraya, y si puede estar presente o ausente sin relación con un fago se coloca entre corchetes. Las variantes rugosas son las que no poseen antígenos somáticos, en la fórmula antigénica en el lugar de estos se escribe "rugosa". Las variantes mucoides expresan una cápsula que impide la detección inmunológica de los antígenos O, en la fórmula antigénica se escribe "mucoide" en su lugar.

III. Los antígenos H de fase 1 se designan con letras minúsculas que van de la a a la z. Para los de fase 2 se utiliza a menudo la letra z con subíndices. Cuando falta una de las dos fases (variantes monofásicas), o las dos (variantes inmóviles) se señala con un signo "menos" en el lugar de la/s fase/s ausente/s. Los antígenos H también pueden presentarse y expresarse de forma variable al igual que los antígenos O.

Serotipar completamente una cepa de *Salmonella* de forma apropiada requiere mucho tiempo. Es un proceso laborioso que normalmente realizan Centros de Referencia especializados que cuentan con experiencia y personal entrenado para garantizar su ejecución adecuada. Se han diseñado métodos moleculares para simplificar este procedimiento, y también para confirmar que una cepa es realmente monofásica y que no se haya categorizado como tal debido a un fallo en la identificación fenotípica del cambio de fase. Se trata de ensayos

basados en tecnología multiplex que detectan regiones variables internas de los genes que codifican los antígenos flagelares de primera y segunda fase, y somáticos (*fliC*, *fljB* y *wzx*, respectivamente), de los serogrupos/serotipos más comúnmente aislados<sup>39-42</sup>. A pesar de que son métodos sensibles, rápidos, específicos y reproducibles no han conseguido sustituir, de momento, al procedimiento clásico ya que no están al alcance de todos los laboratorios por falta de la tecnología necesaria, de personal suficientemente formado, de tiempo para poder realizarlas, o de todas estas circunstancias a la vez.

La serotipificación molecular también puede realizarse de forma muy precisa mediante secuenciación del genoma completo y análisis bioinformático posterior de las secuencias que codifican para los distintos tipos de antígenos O y H. Aunque varios estudios han demostrado su gran capacidad discriminativa, también es difícil que se generalice su uso por las mismas razones que pueden aplicarse a todas las técnicas de biología molecular que no están automatizadas<sup>43-47</sup>.

#### 1.4.2.- Otras formas de tipado

Tradicionalmente, la serotipificación se ha considerado el método de tipado de elección para la vigilancia epidemiológica y la investigación de brotes de salmonelosis<sup>48,49</sup>. Sin embargo, en no pocas ocasiones, se requieren estrategias complementarias más sensibles para averiguar si determinadas cepas de *Salmonella* del mismo serotipo están o no relacionadas<sup>48</sup>. Estos métodos pueden dividirse en fenotípicos y moleculares. En el primer grupo se encuentra la fagotipificación<sup>50</sup> y los patrones de resistencia a los antimicrobianos<sup>51,52</sup>; y en el segundo el ribotipado<sup>52</sup>, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)<sup>53,54</sup>, el tipado por secuenciación de múltiples locus (MLST)<sup>55</sup> y el análisis de polimorfismos en las secuencias repetidas en tándem (MLVA)<sup>56</sup>.

##### Métodos fenotípicos

La fagotipificación es la técnica utilizada clásicamente para subdividir las cepas de los serotipos más frecuentes de *Salmonella* spp. Consiste en infectar

las bacterias con un juego de bacteriófagos y obtener así un patrón de lisis que se denomina fagotipo<sup>57</sup>. Se han empleado esquemas de fagotipificación reconocidos internacionalmente para los serotipos Enteritidis<sup>58</sup>, Typhimurium<sup>59</sup>, Hadar<sup>60</sup>, Virchow<sup>61</sup> y Typhi<sup>62</sup>, pero no son suficientemente discriminativos para estudios epidemiológicos de cepas cuando se encuentran combinaciones de serotipo/fagotipo muy frecuentes<sup>63</sup>.

Con los antibiotipos sucede algo similar: aunque es fácil disponer de ellos porque se realizan de rutina en los laboratorios clínicos, sólo resultan de utilidad para diferenciar cepas cuando éstas presentan algún patrón de resistencia característico. E incluso en este caso, es posible que empleando métodos de tipificación molecular los aislamientos resulten diferentes.

### Métodos moleculares

El ribotipado se basa en la digestión del ácido ribonucleico (ARN) ribosómico con una enzima de restricción, de manera que se generan un número variable de fragmentos de diferente tamaño que se separan posteriormente en geles de agarosa. Los perfiles obtenidos (ribotipos o ribogrupos) se diferencian por el número y la localización de estos genes. Algunos de los polimorfismos permiten discriminar a nivel infra específico por lo que puede ser útil para el subtipado de *Salmonella*<sup>64</sup>.

El PFGE consiste en la digestión del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico purificado mediante la endonucleasa de restricción de baja frecuencia de corte *XbaI*. Los fragmentos de ADN se separan en un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico pulsado, posteriormente se visualizan mediante tinción de bromuro de etidio y los patrones de restricción obtenidos se analizan utilizando programas informáticos creados para tal uso<sup>65</sup>. Si determinadas cepas presentan patrones PFGE indistinguibles pueden considerarse epidemiológicamente vinculadas con un elevado grado de confianza<sup>66</sup>. Esta técnica es la más utilizada para la tipificación molecular de *Salmonella* en los laboratorios de referencia de los países de la Unión Europea<sup>53</sup>.

La técnica MLST se fundamenta en la secuenciación parcial de 6 o 7 genes muy conservados por estar sujetos a escasa presión selectiva. Aunque los resultados obtenidos (secuencias tipo) son objetivables y se pueden intercambiar entre laboratorios, posee un poder discriminativo bajo por lo que no se suele utilizar para el estudio de brotes<sup>64</sup>.

De empleo más reciente es el MLVA, otra herramienta importante para la vigilancia epidemiológica de *Salmonella* que se fundamenta en la amplificación de regiones específicas del genoma que se repiten en tándem de forma variable. Tiene igual o mayor capacidad de discriminar entre cepas que el PFGE y los datos obtenidos son comparables entre laboratorios, además es una técnica más barata y rápida que las anteriores<sup>56,67</sup>.

## **1.5.- Epidemiología**

### **1.5.1.- Panorama general**

Como ya se ha expuesto, *Salmonella* spp es un patógeno zoonótico de distribución mundial que causa infecciones de origen principalmente alimentario que tienen una incidencia mayor en los lactantes y los niños pequeños<sup>63</sup>. El riesgo de aparición de complicaciones, y por lo tanto de hospitalizaciones, es mayor en pacientes con edades extremas de la vida<sup>68</sup>. Desde el punto de vista epidemiológico, las gastroenteritis por *Salmonella* spp se presentan generalmente como casos esporádicos, aunque también pueden ocurrir en forma de brotes de mayor o menor entidad<sup>69,70</sup>.

Gracias a la información proporcionada por los Sistemas de Vigilancia Epidemiológica sabemos que la incidencia de las infecciones causadas por los diferentes serotipos varía mucho de un país a otro y que, además, ésta se modifica con el tiempo<sup>71</sup>. Las diferencias entre regiones están influenciadas tanto por la cultura y las prácticas de producción de alimentos, como por la ubicación geográfica y el nivel de desarrollo económico<sup>72</sup>. Por otro lado, lo habitual es que unos pocos serotipos sean los responsables de la mayoría de los casos que se notifican. Así pues, los que más frecuentemente se han

asociado con enfermedades en humanos en los países europeos y en Estados Unidos son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*<sup>32</sup>.

Hasta el año 2005 *Salmonella enterica* era la primera causa de infección transmitida por alimentos en la Unión Europea<sup>73</sup>. Sin embargo, a raíz de la implantación de medidas de control para reducir la prevalencia de esta bacteria en la cadena productiva de gallinas ponedoras, los casos de salmonelosis en humanos disminuyeron prácticamente un 50% entre el año 2004 y 2009, pasando a ser el segundo agente zoonótico en frecuencia después de *Campylobacter* spp<sup>74,75</sup>. En los últimos años (2015-2019) esta tendencia a la reducción de casos de salmonelosis en humanos se ha frenado, por lo que la incidencia se ha mantenido en niveles estables<sup>1</sup>. En cuanto a Estados Unidos, *Salmonella* spp también es la segunda causa de infección alimentaria, mientras que la primera son los norovirus<sup>76</sup>.

A pesar de los esfuerzos invertidos en los programas de control, la carga de las infecciones por *Salmonella* spp en términos tanto de morbi-mortalidad como económicos sigue manteniéndose muy elevada. Los CDC norteamericanos estiman que, por cada caso de salmonelosis diagnosticado y declarado a las autoridades sanitarias, hay 38 que se quedan sin diagnosticar<sup>77</sup>. Por ello se considera que en los Estados Unidos se producen 1,2 millones de infecciones al año, más de 23.000 hospitalizaciones y unas 450 muertes<sup>78</sup>. Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el coste global de la salmonelosis humana para los países de la Unión Europea podría ser de hasta 3 mil millones de euros<sup>2</sup>. A pesar de que no se dispone de datos fiables acerca de la incidencia de la infección en algunos países en desarrollo, se estima que a nivel mundial el número de casos anuales de gastroenteritis por salmonela no tifoidea es de unos 94 millones y el número de muertes asciende a 155.000, siendo los continentes más afectados África y Asia sudoriental<sup>79</sup>. La gastroenteritis causada por *Salmonella enterica* no tifoidea es la primera causa de muerte por enfermedad diarreica transmitida por alimentos<sup>80</sup>.

### 1.5.2.- Especificidad de hospedador

La mayoría (99%) de los serotipos causantes de infecciones en el ser humano y otros animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *S. enterica* subsp *enterica*. Las otras cinco subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* se aíslan raramente en humanos y se encuentran principalmente en animales de sangre fría y en el medio ambiente<sup>81</sup>. Todas las especies animales son susceptibles a más de un serotipo, pero cada uno de éstos provocará manifestaciones clínicas de distinta gravedad según el hospedador al que infecte<sup>82,83</sup>.

Desde el punto de vista epidemiológico los serotipos de *Salmonella* se pueden clasificar en tres grupos dependiendo del grado de especificidad que presenten por el hospedador<sup>84</sup>:

I. Los que tienen un amplio espectro de hospedadores, como Typhimurium o Enteritidis, que pueden infectar tanto al hombre como a otras muchas especies animales. Este grupo es el que tiene mayor importancia epidemiológica ya que engloba a la mayoría de los serotipos responsables de las gastroenteritis agudas.

II. Los restringidos a los seres humanos: *S. Typhi* y *S. Paratyphi*. Generalmente sólo infectan y causan fiebre entérica en el hombre transmitiéndose de persona a persona de forma directa o indirecta.

III. Los serotipos altamente adaptados a hospedadores animales como, por ejemplo, *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Abortusovis, que provoca infecciones con manifestaciones clínicas en las ovejas; *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Abortusequi, en los caballos; y *S. Gallinarum*, en las aves de corral. Si estos serotipos con preferencia por determinadas especies animales infectan a los humanos pueden causar desde síntomas muy leves, como *S. Abortusovis* y *S. Gallinarum*, hasta enfermedades sistémicas graves, como es el caso de *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Choleraesuis con el cerdo como hospedador primario o *S. Dublin* que está muy adaptada al ganado vacuno.

Esta especificidad de huésped “serotipo-dependiente” está subordinada a la capacidad que un serotipo concreto tiene para adaptarse al entorno de un

animal determinado y de convertirlo así en su hospedador natural<sup>82</sup>. El proceso de adaptación de los serotipos de *Salmonella* spp a sus hospedadores comprende distintos mecanismos que les permiten sobrevivir en el interior de estos y desarrollar su patogenicidad. El primer paso necesario es conseguir evadir su sistema inmunológico<sup>82</sup> lo que, dependiendo del tipo de *Salmonella*, puede suceder de forma muy restringida a determinadas especies animales. Por ejemplo, *S. Typhi*, *S. Gallinarum* y *S. Abortusovis*, muestran un alto tropismo por los órganos linfáticos de humanos, aves y ovejas, respectivamente<sup>85</sup>. La adquisición de elementos genéticos móviles como plásmidos con genes de virulencia e islas de patogenicidad, y también la pérdida de genes y las mutaciones puntuales son eventos que favorecen esta adaptación<sup>86</sup>. Así, bajo la presión selectiva que sufre una cepa dentro de un hospedador determinado pueden desarrollarse variantes con distinto grado de patogenicidad y que, por tanto, difieran en su capacidad de causar enfermedad<sup>87</sup>. Lo cierto es que para que un serotipo llegue a ser patógeno para un rango particular de especies hospedadoras es necesario que se produzca la combinación de varios factores<sup>82</sup>, y que los mecanismos que posibilitan que un serotipo sea virulento para una especie podrían hacer que el mismo serotipo sea menos o incluso avirulento para otro hospedador<sup>88</sup>.

### 1.5.3.- Reservorio y modo de transmisión

El reservorio más común de *Salmonella* spp no tifoidea es el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de animales salvajes y domésticos en los que el estado de portador crónico es habitual, como, por ejemplo, aves de corral y silvestres, ganado porcino y bovino, roedores, reptiles, perros, gatos y otros mamíferos<sup>89-91</sup>. Los humanos portadores asintomáticos también pueden actuar como reservorio, aunque sólo de forma puntual.

La transmisión tiene lugar cuando estos microorganismos se introducen en áreas de preparación de alimentos y, posteriormente, proliferan en los mismos gracias a temperaturas de almacenamiento o cocción inadecuadas y/o a contaminación cruzada<sup>92</sup>. Así pues, *Salmonella enterica* es un patógeno zoonótico que en los países desarrollados infecta a los humanos

principalmente a través del consumo de alimentos de origen animal contaminados: huevos, carne y derivados que se consuman crudos o poco cocinados, y leche y productos lácteos que no cumplan los requisitos higiénico-sanitarios para su comercialización<sup>93,94</sup>. Se estima que el 95% de las infecciones se deben a la ingesta de este tipo de alimentos<sup>95</sup>. Junto con la carne de pollo y los huevos, los productos derivados del cerdo son una de las fuentes más comunes de salmonelosis no tifoidea en humanos a nivel mundial<sup>94</sup>, mientras que la carne de ternera es una fuente mucho menos frecuente, aunque descrita en los últimos años como origen de algunos brotes importantes tanto en Estados Unidos como en Europa<sup>96-98</sup>.

Recientemente se ha sugerido que los siguientes mecanismos podrían tener más peso en la transmisión de *Salmonella* spp del que se pensaba en un principio: beber agua contaminada o ingerirla de forma accidental en baños recreativos, consumir frutas y hortalizas crudas contaminadas, consumir alimentos manipulados inadecuadamente por un portador crónico de *Salmonella*, el contacto directo o indirecto con animales colonizados y la transmisión directa de persona a persona<sup>99</sup>.

#### 1.5.4.- Dosis infecciosa

A partir de estudios clínicos en voluntarios sanos se estimó la dosis infecciosa de *Salmonella* spp no tifoidea en humanos adultos en  $\geq 10^6$ - $10^8$  células<sup>100</sup>. Sin embargo, la validez de este umbral ha sido puesta en entredicho al encontrar concentraciones más bajas de la bacteria, incluso inferiores a  $10^3$  microorganismos, en las fuentes causantes de algunos brotes de salmonelosis<sup>100</sup>. Parece que *Salmonella* spp podría estar presente en niveles tan bajos como  $10^1$ - $10^2$  células y aun así ser capaz de causar infecciones sintomáticas. Esto sucede, por ejemplo, en individuos con ciertas enfermedades subyacentes y en niños pequeños, o también si el alimento contaminado es muy rico en grasas<sup>83,101</sup>.

Las recomendaciones para evitar que la bacteria presente en un alimento pueda multiplicarse y alcanzar así una dosis infectante incluyen: cocinar los de origen animal (carnes y huevos) a temperaturas que permitan que se alcancen

al menos 65°C en el centro de los mismos<sup>102</sup>, y refrigerar rápidamente a menos de 5°C tanto alimentos crudos como cocinados<sup>103</sup>.

Aunque las salmonelas no crecen bien a temperaturas bajas<sup>104</sup>, no siempre mueren por congelación<sup>105</sup>. También sobreviven en alimentos ácidos ( $\text{pH} \leq 4.6$ ) y resisten la deshidratación<sup>106</sup>.

### 1.5.5.- Vigilancia y Control

Aunque la mortalidad causada por salmonelosis se produce mayoritariamente en los países en desarrollo<sup>107</sup>, la carga económica generada tanto por los costes directos (atención médica y veterinaria, pérdidas en el sector ganadero y en la producción de alimentos) como por los indirectos (disminución de productividad) tiene una gran relevancia a nivel mundial y se estima en varios miles de millones de dólares anuales<sup>108,109</sup>.

La magnitud de estos datos justifica la obligatoriedad de la vigilancia epidemiológica y la instauración de programas de control de estas infecciones. Afortunadamente en los últimos años ha aumentado la inversión económica en este tipo de programas, pero son los países ricos los que cuentan con los mejores sistemas de notificación y control, mientras que la vigilancia en las regiones del mundo con mayor incidencia sigue siendo deficitaria<sup>110</sup>. Las actuaciones para controlar la salmonelosis sólo resultarán verdaderamente eficaces si se realizan con una perspectiva global<sup>111</sup>.

La disminución significativa de las infecciones entéricas causadas por *Salmonella* spp supone un gran desafío debido entre otros factores a su capacidad de resistir en el medio ambiente, su amplia distribución, la gran variedad de animales que pueden actuar como reservorio, la posibilidad de multirresistencia a los antibióticos y su adaptabilidad a distintos entornos<sup>112</sup>.

La salmonelosis representa, en definitiva, un importante problema de salud pública. En España está incluida dentro de las Enfermedades de Declaración Obligatoria cuyo control realiza la Red Nacional de Vigilancia de la Salud Pública (RENAVE) y se declara de forma numérica semanal con envío de los datos epidemiológicos básicos agrupados en periodos de cuatro semanas<sup>113</sup>.

Además, el laboratorio nacional de referencia de *Salmonella* y *Shigella* realiza el serotipado completo de todas las cepas que reciben procedentes de los laboratorios de microbiología de distintos hospitales de nuestro país. Los resultados se publican anualmente en el informe de resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmisibles (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo). El conocimiento de los distintos serotipos que circulan en una región proporciona información muy valiosa para el control de las toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella* spp<sup>114</sup> ya que estos varían mucho en su virulencia, reservorios naturales y fuentes de transmisión a los humanos<sup>115,116</sup>.

Por último, en el “Protocolo de vigilancia de Salmonelosis (*Salmonella* spp. distinta de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*)” del Instituto de Salud Carlos III<sup>117</sup> se detallan los objetivos de esta vigilancia y las medidas que Salud Pública emplea para el control de la enfermedad en España. Los objetivos comprenden el conocimiento y la descripción del patrón de presentación de salmonelosis en la población, la detección precoz de los casos para controlar la difusión de la enfermedad, y establecer medidas de prevención y evitar brotes. Las medidas profilácticas abarcan todas las etapas del suministro de alimentos, desde la producción hasta la distribución y el consumo. Entre las medidas más importantes se detalla la importancia de la temperatura de cocción de los alimentos, cómo almacenarlos y conservarlos tanto si están crudos como cocinados, la educación de los manipuladores de alimentos, el establecimiento de programas de control de *Salmonella* en la cadena alimentaria y la educación de la población con respecto a la preparación y consumo de huevos. También es muy importante el aislamiento entérico de los pacientes, el estudio de sus contactos y la investigación de las fuentes.

## **1.6.- Patogenia y Factores de Virulencia**

*Salmonella* spp se comporta como un patógeno intracelular facultativo. Cuando estas bacterias llegan al intestino delgado tras pasar la barrera gástrica, para que sean capaces de causar infección, primero han de poder unirse y después colonizar las células epiteliales columnares intestinales del íleon y las células M

de las placas de Peyer<sup>118</sup> que, debido a la ausencia de borde de cepillo, así como de glicocálix, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias<sup>119</sup>. Posteriormente deben sobrevivir en su interior y eludir los mecanismos de defensa del hospedador<sup>120</sup>.

Los sistemas bacterianos de adhesión más comunes son las fimbrias que también participan en la invasión celular y están implicadas en la interacción con los macrófagos y en la formación de biopelículas<sup>121</sup>. *Salmonella* expresa una amplia variedad de fimbrias con diferente especificidad de unión<sup>122</sup>, algunas son comunes a todas las salmonelas y otras son serotipo específicas<sup>123</sup>.

La endocitosis depende de la llegada directa de proteínas de las bacterias al citoplasma de las células gracias a sistemas de secreción bacteriana de tipo III (SST3) que permiten que las proteínas que vayan a ser liberadas al medio externo puedan pasar a través de la membrana interna, el espacio periplásmico y finalmente la membrana externa del bacilo<sup>124</sup>.

En el caso de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, una vez cruzada la capa epitelial del intestino delgado, los macrófagos las fagocitan y se diseminan así a través del sistema linfático colonizando los tejidos del sistema reticuloendotelial. La supervivencia y multiplicación en el interior de los macrófagos también está mediada por un SST3<sup>125</sup>.

Las infecciones causadas por *Salmonella* spp no tifoidea normalmente son autolimitadas y no van más allá de la lámina propia, pero algunos tipos han desarrollado una serie de genes de virulencia que les permiten invadir la mucosa intestinal y proliferar en los fagocitos<sup>126</sup>.

Otros factores de virulencia con participación en la patogénesis de estas infecciones son los flagelos, los genes de virulencia que se encuentran en islas de patogenicidad (SPIs) o en plásmidos<sup>127</sup>, los polisacáridos capsulares<sup>37</sup> y la producción de endotoxinas y exotoxinas<sup>128</sup>.

Los flagelos, además de conferir motilidad, ayudan a la bacteria a eludir la respuesta inmune del hospedador. La mayoría de los serotipos de *Salmonella*

spp son capaces de variar la fase de la flagelina, mecanismo que provoca la heterogeneidad de los antígenos flagelares<sup>129</sup>. De manera que, si las cepas causantes de una infección son capaces de cambiar de fase en el curso de ésta, podrán sobrevivir a la respuesta inmune mediada por anticuerpos del hospedador<sup>39</sup>.

La expresión de determinados genes situados en plásmidos de virulencia facilita su multiplicación dentro del sistema reticuloendotelial, incluidas las células hepáticas y las del bazo<sup>130</sup>. Al igual que sucede con las fimbrias, existen plásmidos que pueden encontrarse en cualquier ejemplar de *Salmonella* y otros que son específicos de serotipo<sup>131</sup>.

En cuanto a las SPIs, las que se encuentran más frecuentemente en estas bacterias son la SPI-1,-2,-3,-4 y -5 siendo SP-1 y SP-2 las de mayor importancia<sup>132</sup>. La SPI-1 es necesaria para el proceso de infección intestinal ya que es la que codifica el SST3 (SPI-1 SST3) que, como se ha comentado anteriormente, se encarga de introducir las proteínas efectoras de la bacteria en las células del hospedador<sup>133</sup>. Estas proteínas modifican el citoesqueleto de actina mediando así la entrada de la bacteria<sup>134</sup>. La SPI-2 codifica un segundo SST3 (SPI-2 SST3) cuyas proteínas efectoras se relacionan con la supervivencia o multiplicación en enterocitos y macrófagos<sup>133</sup>. La SPI-3 también es necesaria para la supervivencia intracelular en macrófagos, la SPI-4 parece que codifica un sistema de secreción de tipo I (SSTI), y la SPI-5 codifica proteínas efectoras involucradas en la secreción de fluidos y la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal<sup>133</sup>.

Por último, los polisacáridos superficiales permiten la persistencia de las bacterias en el tracto intestinal de los hospedadores<sup>37</sup>.

## **1.7.- Manifestaciones Clínicas**

En los seres humanos, la infección por *Salmonella* spp puede causar diferentes síndromes dependiendo fundamentalmente del serotipo productor de la misma y del estado inmunológico del paciente. Los distintos cuadros clínicos se

dividen en las denominadas salmonelosis no tifoideas, que pueden ser o no invasivas, y en la fiebre tifoidea y paratifoidea<sup>135</sup>.

### 1.7.1.- Salmonelosis no tifoidea

La salmonelosis no tifoidea humana comprende desde formas leves de gastroenteritis hasta cuadros graves con manifestaciones sistémicas incluyendo la sepsis<sup>136</sup>, y la causan serotipos distintos de Typhi y Paratyphi.

El cuadro clínico más común es la gastroenteritis aguda. Tras la ingesta del microorganismo, el periodo de incubación oscila normalmente entre 4 y 72 horas. El síntoma más frecuente es la diarrea (con o sin productos patológicos), pero también pueden aparecer fiebre, escalofríos, náuseas, vómitos, dolor abdominal, cefalea, mialgias y otros síntomas sistémicos<sup>83</sup>. La enfermedad suele ser autolimitada, la fiebre desaparece tras unas 72 horas y la duración de la diarrea acostumbra a ser de entre 3 y 7 días<sup>137</sup>, aunque puede ser tan profusa que provoque una deshidratación grave que requiera ingreso hospitalario. Una vez resueltos los síntomas, la bacteria puede excretarse en heces durante algún tiempo. Este estado de "portador temporal" no suele persistir más de ocho semanas, sin embargo, en los lactantes puede prolongarse hasta varios meses. Se considera que un paciente es portador crónico de salmonela cuando la bacteria se sigue aislando en sus heces doce meses después de resuelta la gastroenteritis. Esto ocurre sólo aproximadamente en el 0,15% de los adultos sanos y el 3,9% de los niños que se infectan, pero tiene importancia epidemiológica en cuanto que pueden ser transmisores de la enfermedad<sup>138</sup>.

La bacteriemia está presente entre el 5-10% de las infecciones<sup>139</sup> y puede complicarse si se produce la siembra del microorganismo en algún tejido. De esta manera puede causar abscesos, artritis séptica, colecistitis, meningitis, pericarditis, neumonía, pielonefritis, endocarditis, osteomielitis y otras infecciones locales<sup>140</sup>. Determinados grupos de riesgo son más susceptibles de padecer infecciones invasivas o graves, como los neonatos, los ancianos, los pacientes con alteraciones de la inmunidad celular, con hemoglobinopatías o

disrupciones de la mucosa intestinal (enfermedad inflamatoria intestinal o neoplasias)<sup>83,137</sup>.

Después de padecer una salmonelosis pueden desarrollarse complicaciones post-infecciosas como la artritis reactiva, el síndrome de Reiter y la espondilitis anquilosante. En estudios realizados siguiendo a pacientes de brotes epidémicos la incidencia de artritis reactiva por *Salmonella* spp oscila entre un 5 y un 30%<sup>141,142</sup>.

La tasa de mortalidad de salmonelosis no tifoidea generalmente es muy baja, menor del 1%, pero puede superar el 10% en pacientes de riesgo con infecciones invasivas<sup>137,143</sup>.

### 1.7.2.- Fiebre tifoidea y paratifoidea

La fiebre tifoidea y paratifoidea son enfermedades sistémicas que están causadas por los serotipos Typhi y Paratyphi A, B y C, respectivamente<sup>144</sup>. Aunque estas enfermedades tienen una distribución mundial, su incidencia es mayor en países en vías de desarrollo cuya población tiene dificultad para acceder a agua potable y no disfruta de condiciones sanitarias adecuadas<sup>144</sup>.

Excepto Paratyphi B, que también puede encontrarse en animales, el resto de los serotipos mencionados son patógenos exclusivos del ser humano<sup>145</sup>. Estos microorganismos colonizan el intestino delgado, invaden la mucosa gastrointestinal y después pasan al torrente sanguíneo diseminándose al hígado, bazo y médula ósea<sup>146</sup>.

El período de incubación normalmente es de 8 a 14 días en la fiebre tifoidea y de 1 a 10 días en la paratifoidea. Las manifestaciones clínicas de inicio son inespecíficas e incluyen fiebre, malestar general, cansancio, anorexia y cefalea. Alrededor del 30% de los pacientes presenta un exantema maculopapular de color salmón en el tronco (manchas rosadas), un 50% hepatoesplenomegalia, un 20-40% dolor abdominal, un 5-10% manifestaciones neuropsiquiátricas, y puede aparecer tanto diarrea como estreñimiento, además de bradicardia relativa y tos seca<sup>147</sup>. Durante la 3ª o 4ª semana de la infección, si ésta no ha sido tratada, pueden aparecer complicaciones hemorrágicas, perforación

intestinal, infecciones focales, encefalopatía y shock<sup>148</sup>. El cuadro clínico de la fiebre paratifoidea es parecido al de la tifoidea, aunque suele ser más leve<sup>148</sup>.

En cuanto al tiempo durante el que los pacientes se comportan como portadores, parece que alrededor del 10% de los enfermos no tratados excretarán bacilos durante tres meses después del inicio de los síntomas y el 2-5% se convertirán en portadores crónicos<sup>149</sup>.

La tasa de mortalidad de la fiebre tifoidea sin tratamiento es de un 10-15%, y se reduce hasta un 1-2% si se instaura antibioterapia de forma precoz y adecuada<sup>150</sup>.

## **1.8.-Tratamiento Antibiótico**

Las salmonelosis no tifoideas se comportan habitualmente como procesos autolimitados que no requieren más tratamiento que el aporte oral de líquidos y electrolitos. No está demostrado que la administración de antimicrobianos mejore el curso de la infección<sup>151</sup> y se ha visto que puede aumentar la duración del estado de portador<sup>138</sup>.

Debido al riesgo de infecciones invasivas potencialmente mortales la antibioterapia debería considerarse en pacientes vulnerables como niños menores de 2 años, pacientes de edad avanzada, inmunodeprimidos, infectados por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), enfermos con drepanocitosis o con anomalías de válvulas cardíacas o endovasculares<sup>152</sup>, y también cuando aparezcan fiebre alta o continua, y/o manifestaciones extraintestinales<sup>153</sup>.

Así, cuando esté indicado, el tratamiento empírico de la enteritis se realizará con una quinolona oral 3-7 días o con azitromicina en dosis única. En caso de bacteriemia o infección localizada extraintestinal se puede emplear una cefalosporina de tercera generación, aztreonam o ciprofloxacino hasta 4 semanas (6 en la endocarditis)<sup>154</sup>. El tratamiento de las infecciones graves debe ajustarse en base a los resultados de las pruebas de sensibilidad ya que

la aparición de cepas con resistencia a varios antimicrobianos es frecuente en *Salmonella* spp.

En general, el uso de antibióticos conlleva la aparición y diseminación de bacterias resistentes. La mala utilización de los antimicrobianos en los animales de granja ha propiciado el surgimiento de bacterias comensales resistentes que pueden contaminar los productos de consumo y llegar así al tracto intestinal de los seres humanos<sup>155</sup>.

Cuando una bacteria resistente a múltiples antimicrobianos produce una infección es mucho más probable que se produzcan fallos del tratamiento, lo que se traduce en un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Un ejemplo de ello es *S. Typhimurium* multirresistente, que se ha asociado con un alto riesgo de infección invasiva, hospitalización prolongada y mayor riesgo de muerte<sup>156</sup>.

En la década de 1960 se notificó la primera resistencia a un antibiótico (cloranfenicol) en una cepa de *Salmonella*<sup>157</sup>. A partir de entonces, el aumento global de resistencias en esta bacteria ha sido llamativo. A principios de 1990 los aislamientos con resistencia a más de un antibiótico representaban un 20-30% del total mientras que a comienzos del siglo XXI eran un 40% en Europa y hasta un 70% en algunos países de otros continentes<sup>112,158</sup>. Esta creciente disminución de la sensibilidad a los antibióticos clásicamente considerados de primera línea para el tratamiento de las infecciones por *Salmonella* spp (aminopenicilinas, cotrimoxazol y cloranfenicol), ha intensificado el uso empírico de fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación<sup>159</sup> tanto en humanos como en el ámbito veterinario<sup>160</sup>.

Los CDC consideran que la multirresistencia en salmonela no tifoidea constituye una grave amenaza para la salud pública<sup>161</sup>. Y, en particular, la OMS estima que es especialmente preocupante la aparición de resistencia a los "antimicrobianos de importancia crítica de la más alta prioridad", como las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de espectro extendido, que podría comprometer el tratamiento efectivo de las infecciones graves<sup>162</sup> y que se ha convertido en un problema emergente en muchas regiones del mundo<sup>163-165</sup>. Los antibióticos carbapenémicos podrían ser la única opción de tratamiento en

pacientes con infecciones invasivas originadas por cepas resistentes tanto a quinolonas como a cefalosporinas de 3ª generación. Por desgracia, ya se ha comunicado en la literatura una cepa de *S. Typhimurium* aislada en un paciente con infección del tracto urinario que se volvió resistente a ertapenem durante el tratamiento con este antibiótico<sup>166</sup>.

Los genes que determinan la resistencia en *Salmonella* spp pueden estar codificados en SPIs o en plásmidos conjugativos<sup>167</sup> y su presencia varía dependiendo del serotipo<sup>162,168</sup>. *S. Enteritidis* es relativamente más susceptible a los agentes antimicrobianos que otros serotipos mientras que *S. Typhimurium* presenta tasas de resistencia mucho más altas<sup>113</sup>. La multirresistencia en *Typhimurium* se encuentra asociada a determinados fagotipos, uno de ellos es el DT104 que puede ser resistente simultáneamente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclinas<sup>169</sup>.

A diferencia de las infecciones por salmonela no tifoidea, la fiebre tifoidea debe tratarse siempre con antibióticos. De forma empírica con ceftriaxona intravenosa 10-14 días o con azitromicina oral 5-7 días. En caso de que la cepa sea sensible a quinolonas, puede emplearse ciprofloxacino oral o intravenoso 7 días o cotrimoxazol oral o intravenoso 14 días. El estado de portador crónico también requiere tratamiento y puede emplearse ciprofloxacino 4 semanas o, como alternativas, amoxicilina o cotrimoxazol 3 meses<sup>154</sup>. El problema de las resistencias también afecta a los serotipos tifoideos, en Pakistán una cepa de *S. Typhi* resistente a cloranfenicol, ampicilina, cotrimoxazol, quinolonas y cefalosporinas de 3ª generación (extremadamente resistente o XDR) causó un brote de fiebre tifoidea que se desarrolló entre 2016 y 2017 cuyas únicas alternativas de tratamiento fueron azitromicina y carbapenémicos<sup>170</sup>.

## **1.9.- Medidas Preventivas**

Cómo ya se ha comentado, la prevención de la salmonelosis humana es compleja y comprende actuaciones a muchos niveles: en la etapa de producción primaria en la granja, en el matadero y en la manipulación, procesamiento, distribución y consumo<sup>171</sup>.

Las primeras medidas preventivas han de ir dirigidas a evitar que los animales se infecten en la granja, para lo cual es imprescindible mejorar las condiciones de bioseguridad. Esto comprende, entre otras acciones, suministrar alimentos no contaminados a los animales, lograr un nivel de higiene elevado, desratizar las granjas, aislar a los animales recién adquiridos del resto, realizar controles veterinarios frecuentes y la vacunación, al menos frente a los serotipos más frecuentes<sup>172</sup>.

Con el objetivo de disminuir la prevalencia de *Salmonella* spp en animales de consumo y sus productos, el Reglamento Europeo Nº 2160/2003 establece la obligatoriedad de adoptar medidas apropiadas y eficaces para detectar y controlar la presencia de esta bacteria en todas las etapas de producción, pero sobre todo a nivel de la producción primaria<sup>173</sup>. Los Estados Miembro ha instaurado Programas Nacionales de Control, adaptados a las circunstancias propias de cada uno, cuyo cumplimiento es imperativo en la cadena de producción avícola. En estos programas se han establecido objetivos para la reducción de serotipos específicos seleccionados por su relevancia para la Salud Pública en la población de las siguientes aves: gallinas reproductoras y ponedoras de la especie *Gallus gallus*, pollos de engorde y pavos<sup>174</sup>.

En España, los objetivos que se pretende alcanzar son los siguientes<sup>175</sup>:

I. Controlar la presencia de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, incluyendo las cepas monofásicas con fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:- en gallinas ponedoras adultas cuyos huevos se destinan a comercialización para consumo humano, en pollos de engorde, y en pavos de engorde y de reproducción adultos.

II. Controlar, además de los serotipos anteriores, *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Infantis, *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Virchow y *Salmonella enterica* subsp *enterica* ser Hadar en manadas de aves reproductoras.

III. Reducir el porcentaje máximo de manadas de gallinas ponedoras, pollos de engorde, pavos y gallinas reproductoras infectadas con los serotipos anteriores al 2%, 1%, 1% y 1%, respectivamente.

Ninguno de estos objetivos incluye la reducción del porcentaje de cerdos infectados por salmonela. A pesar del problema que representa la salmonelosis para las granjas porcinas y la amenaza que supone para las personas que después consumen sus productos, en nuestro país todavía no se ha implementado ningún Programa Nacional de Control de *Salmonella* spp en el ganado porcino en contraste con otros países europeos, como Noruega, Finlandia, Suecia y Dinamarca, donde sí hay programas<sup>92,172,232</sup>.

Entre las medidas que se podrían llevar a cabo para controlar las infecciones por esta bacteria en los cerdos, la vacunación se considera muy útil en la etapa de producción en la granja<sup>176</sup>. Se usa principalmente para reducir la presión de la infección, ya que minimiza la diseminación de este microorganismo en las piaras<sup>177</sup>. Recientemente, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) ha aprobado el uso de una vacuna denominada Salmoporc (Ceva Santé Animale, Libourne, France), cuyo principio activo es *S. Typhimurium* cepa 421/125, (mutante auxotrófico con marcador doble histidina-adenina). Es la única autorizada en España para la inmunización activa de cerdas y lechones a partir de los 3 días de edad. Según su ficha técnica reduce la colonización, la invasión de ganglios linfáticos mesentéricos y la excreción de cepas de *S. Typhimurium* de tipo salvaje en lechones y, también, en las cerdas durante la lactancia.

Siguiendo la cadena alimentaria llegamos a las intervenciones que pueden llevarse a cabo a nivel de la línea de sacrificio como la descontaminación de las canales con agua caliente, la pasteurización al vapor, los lavados con ácido orgánico, el enfriamiento rápido de las canales, la evisceración y la capacitación y concienciación del personal que trabaja en los mataderos<sup>178</sup>. Se ha demostrado que estas medidas causan una reducción mayor de las infecciones en humanos que las que pueden implementarse en las granjas<sup>179</sup>.

Cuando fallan todas las intervenciones anteriores y los productos de origen animal de venta al público para consumo están contaminados con *Salmonella*, sólo queda la prevención a nivel de la manipulación y conservación adecuada de estos alimentos antes de su ingesta. En el Protocolo de Vigilancia de

Salmonelosis (*Salmonella* spp distinta de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*) del Instituto de Salud Carlos III se detallan las siguientes medidas<sup>117</sup>:

I. Cocinar a temperaturas que permitan alcanzar 65°C en el centro del producto o alimento de origen animal.

II. Refrigerar las comidas preparadas rápidamente a una temperatura inferior a 5°C y en pequeños recipientes separados y protegidos para evitar contaminación cruzada.

III. Mantener las instalaciones y los utensilios de cocina limpios y proteger la comida preparada contra la contaminación por insectos y roedores.

IV. Educar a todos los manipuladores de alimentos en la importancia del lavado adecuado de manos antes y después de la preparación de comida, entre la manipulación de un alimento y otro, y después de defecar, especialmente si han padecido algún proceso diarreico o si son portadores conocidos de *Salmonella*.

V. Evitar el consumo de huevos crudos o cocinados de forma incompleta, de huevos sucios o rotos, y no lavarlos.

VI. Considerar el riesgo de salmonelosis debido a mascotas. Seguir ciertas normas de higiene como el lavado de manos después de tocar estos animales.

## **2.- TYPHIMURIUM MONOFÁSICA**

### **2.1.- Introducción**

Las bacterias patógenas que empiezan a provocar infecciones con una frecuencia mayor de la esperada suponen una amenaza para la Salud Pública, en especial si son portadoras de factores de virulencia capaces de favorecer la invasión celular y la evasión de los mecanismos de defensa del hospedador, o de genes que provoquen resistencia a los antibióticos de uso habitual para su tratamiento.

Dentro del género *Salmonella* un ejemplo de serotipo emergente que reúne todas las condiciones necesarias para ocasionar importantes problemas sanitarios es el 1,4,[5],12:i:- ([5] indica posibilidad de presencia o ausencia del antígeno O:5). Se trata de una salmonela que es incapaz de expresar la fase 2 del antígeno H, condición que, de entrada, no debería otorgarle ventajas adaptativas. Los flagelos participan en la motilidad bacteriana y pueden actuar como adhesinas, por tanto, podría inferirse que la falta de una fase flagelar supondría un menoscabo en su capacidad para adherirse e invadir las células epiteliales intestinales de los hospedadores, sin embargo, se ha comprobado que ésta permanece intacta<sup>180</sup>. Por otro lado, aunque se presume que el mecanismo de variación de fase ayuda a la bacteria a eludir la respuesta inmunitaria en el curso de una infección, también sería plausible que dejar de expresar unos antígenos que el sistema inmunológico reconocería y frente a los cuales produciría anticuerpos podría representar una ventaja selectiva en lugar de un inconveniente<sup>34</sup>.

*Salmonella enterica subsp enterica* ser 1,4,[5],12:i:- se detectaba con muy poca frecuencia antes de la década de 1990 mientras que actualmente es uno de los serotipos más habituales, hecho que sugiere que su expansión ha sido reciente y que, además, ha ocurrido de forma rápida. No obstante, no puede descartarse que, en el pasado, las cepas de 1,4,[5],12:i:- se clasificaran erróneamente como *S. Typhimurium* o como *Salmonella* serogrupo B, lo que habría conducido a su subregistro<sup>34</sup>. Para catalogar adecuadamente los aislamientos de *S.1,4,[5],12:i:-* el proceso de serotipificación es crucial, e incluso debe completarse con métodos moleculares que permitan comprobar que genotípicamente no tienen capacidad de expresar la fase que le falta<sup>181</sup>.

En Europa, la primera cepa de esta variante monofásica comunicada en la literatura se aisló en 1986 en Portugal a partir de muestras recogidas de una canal de ave de corral<sup>182</sup>. El hecho de que en España en el periodo de 1993 a 1996 sólo se registraran 10 cepas de este serotipo evidencia lo anecdótico que era identificarlo como causante de gastroenteritis hace menos de tres décadas<sup>183</sup>. A partir de agosto de 1997 se produjo un aumento progresivo de la

frecuencia de su aislamiento en nuestro país, de manera que en el año 2000 ya representaba el 3,5% de las cepas de *Salmonella* registradas en el Centro Nacional de Microbiología<sup>57</sup>.

Desde entonces, la incidencia de salmonelosis causada por esta variante ha crecido rápidamente y no sólo dentro de nuestras fronteras, en la actualidad es uno de los serotipos más frecuentemente aislados en multitud de países de todo el mundo como Italia, Suiza, Eslovaquia o Japón<sup>184-187</sup>.

En el continente europeo es el tercer serotipo más aislado en humanos, por detrás de Enteritidis y Typhimurium, suponiendo un 8,2% de los casos<sup>1</sup>. En Estados Unidos es el quinto serotipo más prevalente con un 4,7%<sup>188</sup> de los aislamientos, en China está incluido en el grupo de los cuatro serotipos más frecuentes<sup>189</sup>, en Canadá y Brasil se encuentra entre los cinco primeros<sup>190,191</sup> y en Colombia ocupa el cuarto lugar<sup>192</sup>, por poner algunos ejemplos.

Además, S. 1,4,[5],12:i:- también ha sido responsable de un número creciente de brotes en humanos en distintas naciones como Luxemburgo<sup>193</sup>, Alemania<sup>194</sup>, Francia<sup>195</sup> y España<sup>196,197</sup>. Muchos de estos brotes se han relacionado con el consumo de carne de cerdo contaminada, pero otros se han asociado con otras fuentes, como carne de vacuno, aves de corral y animales de compañía<sup>4,198-200</sup>.

## **2.2.- Mecanismo de Variación de Fase. Base Genética del Fenotipo Monofásico**

### **2.2.1.- Mecanismo de Variación de Fase**

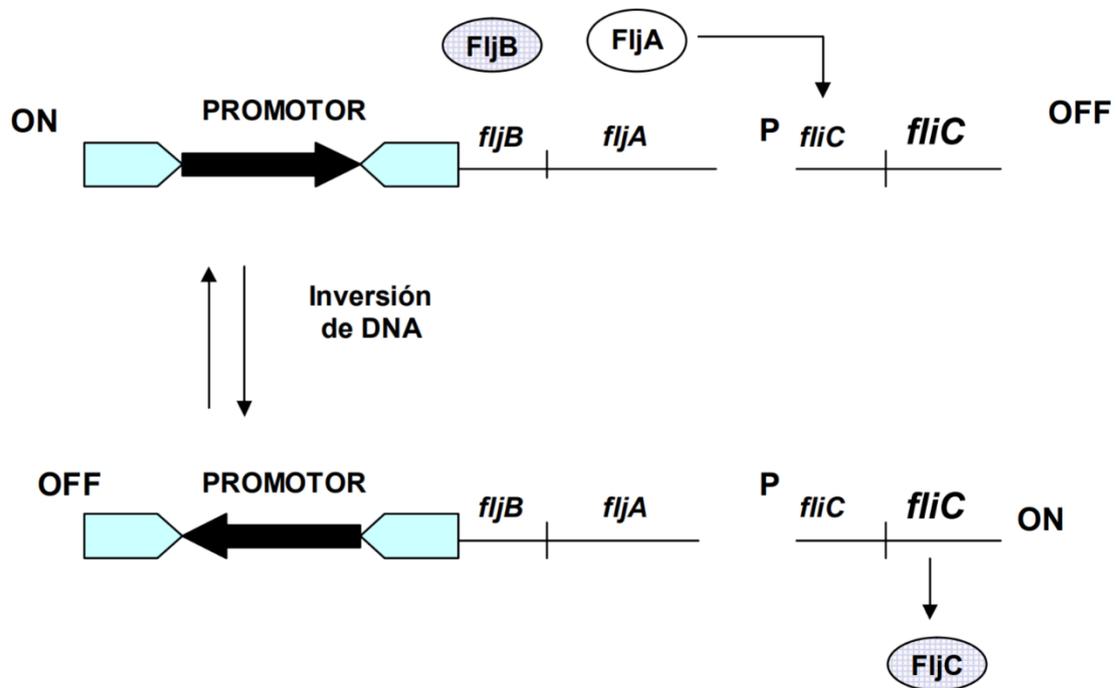
Ya se ha comentado que la mayoría de los serotipos de *Salmonella enterica* poseen dos proteínas de flagelina diferentes denominadas de fase 1 y de fase 2 que están codificadas por los genes *fliC* y *fljB*, respectivamente. La célula expresa alternativamente estas dos proteínas mediante el mecanismo de "Variación de Fase".

La variación de la fase flagelar se produce debido a la inversión reversible de una región de ADN conocida como segmento H, que contiene tanto al promotor para el gen *fljB* como al gen *hin* que codifica una ADN invertasa que actúa

como interruptor molecular catalizando el proceso<sup>201,202</sup>. El gen *fljB* constituye un operón con el gen *fljA*, que codifica un regulador negativo de la expresión de *fliC* (FljA).

Así pues, en un sentido, el promotor activa la transcripción de los genes *fljB* y *fljA* lo que resulta en la síntesis de flagelina de fase 2 e inhibición de flagelina de fase 1. Cuando el fragmento se invierte, ni *fljB* ni *fljA* se transcriben por lo que se expresa el gen *fliC* y se sintetiza flagelina de fase 1<sup>186</sup> (figura 2). Este cambio de fase ocurre a una tasa de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  por generación celular<sup>201</sup>.

**Figura 2. Esquema explicativo del mecanismo de Variación de Fase**



Fuente: III Curso Avanzado WHO Global Foodborne Infections Network (WHO-GFN). Diagnóstico de *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp por PCR. Inversión de fase en *Salmonella* spp. Servicio Enterobacterias Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Anlis "Carlos G. Malbran"<sup>38</sup>

### 2.2.2.- Base Genética del Fenotipo Monofásico

Todavía se desconocen con exactitud los eventos que han propiciado la aparición y posterior emergencia de *S.* 1,4,[5],12:i:-. Puede que la falta de expresión de la fase 2 del antígeno flagelar se deba a mutaciones, deleciones o

inserciones en el gen *fljB*, junto con alguna alteración en el mecanismo regulador de la variación de fase<sup>203-205</sup>.

La caracterización de aislamientos de *S. 1,4,[5],12:i:-* procedentes de animales de granja (pollos y cerdos) ha permitido la identificación de deleciones en los genes *fljA*, *fljB* y *hin*<sup>203,206</sup>. En otros estudios se han encontrado reordenamientos del ADN en la región del promotor<sup>207</sup> y deleciones en el operón *fljAB* y los genes flanqueantes<sup>208</sup>. Además se han detectado cepas de *S. 1,4,[5],12:i:-* con mutaciones puntuales en *fljA*, *fljB* y *hin*<sup>209</sup> y elementos de inserción IS26 que interrumpen diferentes regiones intergénicas<sup>207</sup>.

Las deleciones y los reordenamientos parecen generar un genotipo/fenotipo estable, pero tanto las mutaciones puntuales como los IS26 pueden ser reversibles y dar lugar a un fenotipo intermitente o inconsistente que resulta difícil de identificar mediante métodos genotípicos como las sondas de ADN<sup>203</sup>.

Numerosos estudios han intentado responder a la disyuntiva de si *S. 1,4,[5],12:i:-* habría aparecido como una mutante de otro serotipo bifásico ya existente que hubiera perdido los genes o la capacidad de expresar los antígenos H de fase 2, o, por el contrario, se trataría de un nuevo serotipo que no contaría con estos genes o con la capacidad de variar de fase<sup>35,210</sup>.

Teniendo en cuenta que los factores somáticos 1, 5 y 27 a veces pueden no expresarse en una cepa determinada, son siete los serotipos de *S. enterica* subsp *enterica* que podrían ser ancestros de *S. 1,4,[5],12:i:-* por poseer los mismos antígenos O y H de fase 1. Estos son: Typhimurium (1,4,[5],12:i:1,2), Lagos (1,4,[5],12:i:1,5), Agama (4,12:i:1,6), Farsta (4,12:i:e,n,x), Tsevie (1,4,12:i:e,n,z<sub>15</sub>), Gloucester (1,4,12,27:i:l,w) y Tumodi (1,4,12:i:z<sub>6</sub>); y un serotipo de la subespecie II sin nombre (4,12,27:i:z<sub>35</sub>)<sup>18</sup>. De todos ellos, Typhimurium es el que más se identifica en seres humanos y animales, los demás sólo se aíslan raramente. Los estudios genéticos que han comparado *1,4,[5],12:i:-* con otros serotipos se han realizado incluyendo solamente a Typhimurium y a Lagos, así que no es posible excluir por completo al resto de serotipos nombrados como posibles ancestros<sup>203,208,211</sup>.

Estos trabajos de subtipificación molecular y los análisis filogenéticos no han encontrado similitudes entre *S.* 1,4,[5],12:i- y *S.* Lagos, pero sí muchas semejanzas entre *S.* 1,4,[5],12:i- y *S.* Typhimurium lo que ha llevado a pensar que la hipótesis más plausible es que el serotipo 1,4,[5],12:i- sea una variante monofásica de *S.* Typhimurium<sup>211,212</sup>.

La relación genética entre *S.* 1,4,[5],12:i- y *S.* Typhimurium ha sido determinada en base a que ambas comparten patrones lisogénicos y de PFGE idénticos o, como poco, similares<sup>211</sup>, a que en estudios que emplean tecnología MLST se obtienen las mismas secuencias tipo<sup>200,203,204,213</sup> y a que cuando se utilizan microarrays de ADN el serotipo monofásico muestra un repertorio genético muy similar al de Typhimurium<sup>208,214</sup>. Además se han detectado secuencias específicas de *S.* Typhimurium, como por ejemplo la de la región intergénica *fljA-fljB*, en aislamientos de *S.* 1,4,[5],12:i-<sup>215,216</sup>.

### **2.3.- Clones**

Se han identificado varios clones distintos del serotipo 1,4,[5],12:i- en diferentes países y en distintos momentos a lo largo del tiempo<sup>4,186,204</sup>. Acerca de su origen se barajan dos hipótesis, la primera sugiere que *S.* 1,4,[5],12:i- surgió a raíz de un evento único y posteriormente se diversificó en varios linajes, y la segunda que fueron múltiples eventos de delecciones independientes los responsables de su emergencia.

Estos clones se diferencian en cuanto a mecanismos de resistencia, perfiles de PFGE, secuencias tipo/patrones de MLVA y delecciones<sup>217-219</sup>. Por su importancia, destacan tres<sup>204</sup>: el clon español, el clon europeo y el clon estadounidense.

#### Clon Español

Inicialmente el primer clon de *S.* 1,4,[5],12:i- fue identificado a partir de aislados de muestras pertenecientes a cerdos en España en 1997<sup>211</sup>. Estas cepas se caracterizan por un patrón de multiresistencia ACSuGSTSxT (resistencia a ampicilina, A, cloranfenicol, C, sulfonamidas, Su, gentamicina, G,

estreptomicina, S, tetraciclina, T, y trimetoprima sulfametoxazol, SxT) cuyos genes responsables, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *cmlA1*, *aadA2*, *aac(3)-IV*, *sul1*, *tet(A)* y *dfrA12*, se localizan en plásmidos de gran tamaño (110 a 220 Kb) no autotransferibles<sup>220</sup>.

El fagotipo y la secuencia tipo predominantes son U302 y ST19, respectivamente<sup>4,208,213,221</sup>. Si se comparan con *S. Typhimurium* LT2, estos aislamientos presentan cinco deleciones (regiones I a V) y una inserción (región VI). La deleción de la región V incluye al operón *fljAB* y afecta a 16 genes completos, entre ellos *hin*; además, los genes flanqueantes STM2757 y STM2773 (*iroB*) aparecen truncados y en su lugar se ha insertado una secuencia IS26<sup>208</sup>.

Al estudiar mediante PFGE una selección de cepas de *S. 1,4,[5],12:i:-* fagotipo U302 aisladas en España entre 1997 y 2007 se comprobó que los patrones de bandas encontrados tenían un elevado índice de similitud que sugería clonalidad entre ellas<sup>65,210,222</sup> y ponía de manifiesto la circulación de este clon en nuestro país al menos durante esa década.

### Clon Europeo

El segundo clon surgió hacia 2005 en varios países europeos<sup>59</sup> y fue identificado gracias a que se estudiaron cepas de *S. 1,4,[5],12:i:-* que se estaban aislando en Italia con una frecuencia mayor de la habitual, junto con otras de Dinamarca y Reino Unido. Todas las cepas compartían el mismo patrón de restricción de PFGE-XbaI o, como mínimo, patrones muy similares<sup>210</sup>.

Este clon se caracteriza por el perfil de resistencia ASSuT, con o sin resistencias adicionales, pero siempre con sensibilidad a cloranfenicol<sup>223</sup>. Los genes responsables de esta multiresistencia, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *strAB*, *sul2* y *tet(B)*, se localizan cromosómicamente organizándose en dos regiones (RR1 y RR2) flanqueadas por copias de la secuencia de inserción IS26<sup>224</sup>. El clon europeo se ha asociado comúnmente con los fagotipos DT193 y DT120<sup>225</sup>.

Actualmente es el clon predominante y se ha extendido a Alemania, Suiza y Reino Unido, entre otros países<sup>226</sup>. Su perfil de resistencia tipo es el que se

encuentra más frecuentemente en la Unión Europea en aislamientos de humanos y de cerdos de engorde<sup>227</sup>.

#### Clon Americano (estadounidense)

El hecho de que S. 1,4,[5],12:i- fuera el sexto serotipo en frecuencia entre las cepas de origen humano en Estados Unidos en 2007<sup>228</sup>, sumado a que también originó grandes brotes en el país<sup>35</sup>, motivó la realización de un estudio comparativo entre estas cepas y otras pertenecientes al clon español<sup>204</sup>. Se comprobó así que los aislados americanos diferían de los españoles en los patrones de restricción PFGE-XbaI, en las regiones genéticas delecionadas y en que eran predominantemente pansensibles a los antimicrobianos, siendo la multirresistencia muy poco habitual. El estudio agrupó las cepas de los Estados Unidos y España en dos clones distintos y sugirió que sus ancestros eran cepas de S. Typhimurium distintas<sup>204,227</sup>. El clon estadounidense se caracteriza por una gran deleción en el locus *fljB*<sup>229</sup> y por conservar los genes *hin* e *iroB*<sup>203</sup>. La deleción es mayor que la de las cepas del clon español: comprende 77 genes desde STM2692 a STM2772, y en lugar de la región intermedia entre los segmentos IV y V se encuentra un fragmento de inserción de unas 7 kb compuesto por los genes STM2704, STM2706 y otros tres homólogos a STM1054, STM1053 y STM1997 que codifican dos genes de profagos Gifsy-2 y un componente de la ADN polimerasa V<sup>204</sup>.

#### Otros clones

El llamado clon Sud-europeo se caracteriza por deleciones en la región *fljAB* distintas de las que aparecen en los otros clones, aunque es similar al americano por lo que parece estar relacionado con éste. Los aislamientos agrupados en el clon Sud-europeo se diferencian de las cepas americanas por la presencia de los genes *cmlA1*, *aadA1/aadA2*, *sul3* y *dfrA12* en integrones dentro de plásmidos IncR que confieren resistencia a cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas y trimetoprima, respectivamente<sup>230</sup>.

Además de estos clones de distribución mundial, se han descrito otros endémicos en países como Bélgica, Japón, China y Estados Unidos, que se diferencian por las deleciones encontradas en la región *fljAB*<sup>204</sup>.

Muy recientemente se ha comprobado que las cepas de *S. 1,4,[5],12:i:-* que hoy en día circulan en España no son clonales y que muy probablemente han surgido de múltiples eventos genéticos que han sucedido independientemente y que podrían haber tenido lugar en cerdos<sup>231</sup>.

En resumen, todos los datos de los que disponemos parecen apuntar a que las distintas variantes del serotipo *1,4,[5],12:i:-* han aparecido por todo el mundo a partir de múltiples reordenamientos no relacionados de secuencias de DNA de distintas cepas de *S. Typhimurium*, y que algunos de ellos han tenido lugar recientemente<sup>200,218</sup>.

## **2.4.- Éxito Ecológico**

El sorprendente éxito evolutivo de *S. 1,4,[5],12:i:-* ha permitido su rápida expansión y, como ya se ha indicado, la ha convertido en uno de los serotipos de mayor importancia a nivel mundial en cuanto a frecuencia de aislamiento en humanos<sup>232</sup>. Algunas de las características específicas que se han combinado en este serotipo para contribuir a su emergencia podrían ser: la resistencia a los antibióticos, la resistencia a los metales pesados, la capacidad de formar biofilms y la presencia de genes de virulencia.

Muchas de las cepas de *S. 1,4,[5],12:i:-* presentan resistencia a múltiples antimicrobianos y se ha postulado que esta característica constituye uno de los factores determinantes de su propagación. La hipótesis es que los antibióticos utilizados por la industria cárnica en los animales ejercerían una presión selectiva sobre las bacterias, sobrevivirían las resistentes, como nuestra variante monofásica, y desaparecerían las cepas sensibles. En contra de esta teoría está el hecho de que también es común encontrar aislados de *S. 1,4,[5],12:i:-* con fenotipos más sensibles, así que la contribución de la resistencia a su eficaz ecología parece ser sólo parcial<sup>206, 226,233,234</sup>.

El cobre y el zinc se han empleado como suplementos alimenticios para favorecer el crecimiento de los animales de granja y, también, como alternativa a los antibióticos, ya que los macrófagos son capaces de eliminar bacterias intracelulares dentro de fagosomas en presencia de grandes cantidades de estos metales pesados<sup>235</sup>. Numerosos estudios acreditan la presencia de genes responsables de resistencia a estos metales (cobre, plata, zinc y mercurio) en un elevado porcentaje de aislamientos del serotipo 1,4,[5],12:i:-<sup>229</sup>. La existencia de estos genes puede evitar los efectos tóxicos que los metales pesados tienen sobre estas bacterias y, por tanto, contribuir a su supervivencia en los entornos de cría de animales para consumo<sup>236</sup>.

Se ha constatado que los aislamientos de esta variante monofásica son capaces de formar biofilms<sup>237</sup> y que poseen múltiples genes de virulencia como *sipC* que está implicado en la adhesión e invasión celular, *sopB* que promueve mecanismos implicados en la diarrea y *hilA* que activa el proceso de invasión celular<sup>238</sup>, circunstancias que también proporcionan una ventaja competitiva a este serotipo.

## **2.5.- Reservorio Principal: el Cerdo**

En los países industrializados el reservorio principal de *Salmonella* spp no tifoidea es el tracto gastrointestinal de los animales criados para el consumo humano, lo que puede traducirse al final de la cadena en alimentos contaminados<sup>137</sup> cuya ingesta es la causa más frecuente de salmonelosis<sup>239</sup>. Además de las aves de corral (gallinas ponedoras y pavos), una de las especies animales con un papel más relevante en la transmisión de *Salmonella* es el cerdo, y su función como fuente de infección parece ser especialmente importante en los países del Sur de Europa, entre los que se encuentra España<sup>240-241</sup>.

En Europa la carne de cerdo cruda o poco cocinada y sus productos son la segunda fuente más frecuente de casos de salmonelosis humana por detrás de los huevos y sus derivados<sup>232</sup> y en Estados Unidos también ocupa el segundo

lugar como causante de brotes asociados con un elevado número de casos, hospitalizaciones y defunciones<sup>242</sup>.

Aunque en los cerdos las infecciones por salmonela pueden ocasionar fiebre, diarrea, postración y muerte, lo más habitual es que los animales infectados se comporten como portadores asintomáticos de la bacteria que se queda colonizando amígdalas, intestino y tejido linfoide asociado. Este estado de portador sano parece ser el principal factor de riesgo para su propagación y transmisión desde la cadena de producción porcina al plato<sup>243</sup>.

La colonización de los cerdos puede ocurrir en todas las etapas de la producción cárnica. La transmisión puede suceder por contacto con agentes externos como roedores, aves, mascotas y trabajadores de granja, de forma vertical, o de animal infectado a animal sano. También existe una “transmisión circular” que consiste en un ciclo de contaminación permanente de la granja: los cerdos infectados contaminan el ambiente y, a su vez, los sanos adquieren la bacteria por su interacción con éste<sup>172</sup>.

En los animales infectados, al final del periodo de engorde puede producirse un incremento de la excreción de la bacteria provocado por el estrés que sufren a causa del hacinamiento, transporte y tiempo que pasan en la zona de espera de los mataderos. Estos factores también pueden aumentar la susceptibilidad de los no portadores a infectarse<sup>244</sup>. Por otro lado, la contaminación de las canales de cerdo puede ocurrir en la línea de sacrificio, y está relacionada con la contaminación cruzada con otras canales y la presencia de la bacteria en el medio ambiente<sup>172</sup>.

Nuestro país tiene uno de los niveles más altos de infección por *Salmonella* spp en cerdos de la Unión Europea<sup>245</sup>. En un estudio se aisló este microorganismo en el 31% de los cerdos muestreados, siendo la variante monofásica 1,4,[5],12:i:- la más prevalente<sup>246</sup>. Además, la proporción de muestras de carcasas de cerdos positivas para *Salmonella* spp en España ha ido en aumento con los años. En 2010 era el 7%, en 2017 el 11,72% y en 2019 el 17,57% siendo el país europeo con el porcentaje más alto seguido de lejos por Malta con un 8,33%<sup>1</sup>.

Los serotipos que se detectan más frecuentemente en los cerdos de los países de la Unión Europea son Typhimurium, Derby y 1,4,[5],12:i:-; y los más prevalentes en humanos Enteritidis, Typhimurium y 1,4,[5],12:i:-<sup>1</sup>. Typhimurium se asocia con cerdos de engorde y su carne (42%), pollos de engorde (34,8%) y gallinas ponedoras (13,5%); y la variante monofásica principalmente con cerdos (72,1%) y pollos de engorde (17,1%)<sup>1</sup>.

En las últimas décadas se ha producido un cambio en la tendencia de los serotipos que se asocian con toxiinfecciones alimentarias en humanos. La expansión de *S. 1,4,[5],12:i:-* a nivel mundial se ha relacionado con la intensificación de la cadena de producción porcina y el aumento del comercio internacional de cerdos y sus productos. La demanda global de carne de este animal ha ido en aumento con los años y en la actualidad es una de las que más se consume<sup>172</sup>.

La mayor proporción de cerdos infectados por el serotipo monofásico se ha acompañado de una disminución de la cantidad de estos animales con infección por el serotipo Typhimurium<sup>247</sup>. La evidencia de que *S. 1,4,[5],12:i:-* presenta una ventaja competitiva in vivo con respecto a *S. Typhimurium* se consiguió inoculando simultáneamente ambos serotipos en cerdos sanos y detectando posteriormente un mayor porcentaje de muestras de heces con la variante monofásica que, además, se detectaba con concentraciones más elevadas que Typhimurium<sup>248</sup>. Parece que *S. 1,4,[5],12:i:-* tiene un tropismo elevado por el cerdo lo que la convierte en un eficiente patógeno para éste que, a su vez, actúa como reservorio fundamental de este serotipo<sup>213</sup> para las infecciones en humanos.

El aumento del porcentaje de cerdos infectados por la variante monofásica se ha seguido del incremento de casos de salmonelosis humana por este serotipo<sup>249</sup>. No es de extrañar que también se hayan comunicado brotes ligados al consumo de productos cárnicos porcinos en distintos países como Luxemburgo<sup>193</sup>, Alemania<sup>250</sup>, Italia<sup>56</sup> y España<sup>197,251</sup>. En los brotes españoles las fuentes asociadas fueron la longaniza seca, producto de charcutería tradicional de nuestro país, y también carne de cerdo poco cocinada.

Para verificar que la carne de este animal constituye una fuente de infección de la variante monofásica, se han llevado a cabo estudios fenotípicos (serotipado y estudio de sensibilidad) y genotípicos (PFGE) que han demostrado que las cepas de 1,4,[5],12:i:- encontradas en cerdos y en su carne, y las aisladas en humanos infectados están estrechamente relacionadas<sup>200,252</sup>. Pese a ello, este serotipo parece no estar caracterizado por un solo reservorio ya que también se recupera de otras fuentes, como el ganado bovino, pollos, pavos, aves silvestres y tortugas, lo que demuestra que es una variante con un amplio rango de hospedadores<sup>220,227,253,254</sup>. De hecho, se han producido brotes ligados al consumo de pastel de pollo congelado en Estados Unidos<sup>255</sup> y a la ingesta de hamburguesas de ternera contaminadas en Francia<sup>98,256</sup>.

### **3.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS. MALDI TOF**

#### **3.1.- Introducción**

La espectrometría de masas permite estudiar la distribución de las moléculas de una sustancia<sup>257</sup>. Mediante un instrumento denominado espectrómetro se consigue obtener, a partir de moléculas orgánicas, iones en fase gaseosa que posteriormente se separan y detectan en función de su masa/carga ( $m/z$ )<sup>258</sup>. El desarrollo de una variante de esta técnica, conocida como “ionización suave”, que permite analizar moléculas de mayor tamaño al utilizar un láser como fuente de ionización y una matriz orgánica, posibilitó su aplicación en la identificación de microorganismos<sup>257</sup>. Se emplea un espectrómetro de masas denominado MALDI-TOF que tiene la peculiaridad de que su láser consigue una menor fragmentación iónica de la muestra por lo que los resultados que se obtienen son más sencillos de interpretar. Consta de tres componentes que se mantienen en una atmósfera de vacío: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector<sup>258,259</sup>.

### Fuente de ionización

Se aplica sobre una macromolécula generando iones por exceso o pérdida de electrones, así que las moléculas se cargarán eléctricamente<sup>260</sup>. En el caso del MALDI-TOF, para conseguir la ionización, primero se deposita la muestra en una tarjeta de material conductor que después es embebida en una matriz orgánica que cristaliza en contacto con el aire. Las matrices que se utilizan son compuestos que contienen en su estructura un anillo bencénico conjugado, y su función es producir iones intactos en fase gaseosa a partir de biomoléculas de gran tamaño como son las proteínas. La tarjeta con la muestra y la matriz se introduce en una cámara de alto vacío y a continuación es irradiada por un láser de nitrógeno con una longitud de onda de 337 nm. La energía del láser causa la desestructuración de la matriz cristalizada que arrastra a la muestra. La mayor parte de la energía es absorbida por la matriz y la muestra se ioniza sufriendo muy poca fragmentación<sup>257,259</sup>.

### Analizador de masas

Se trata de una zona donde se establece un potente campo magnético que dirige los iones hacia el detector. La energía que proporciona el láser es constante y las partículas adquieren una elevada cinética separándose según su ratio masa/carga ( $m/z$ ). Las partículas más ligeras vuelan más rápido y llegan antes al detector y las más pesadas tardan más en llegar. El periodo de tiempo que le cuesta llegar hasta el detector a cada ion se denomina tiempo de vuelo<sup>259</sup>.

### Detector

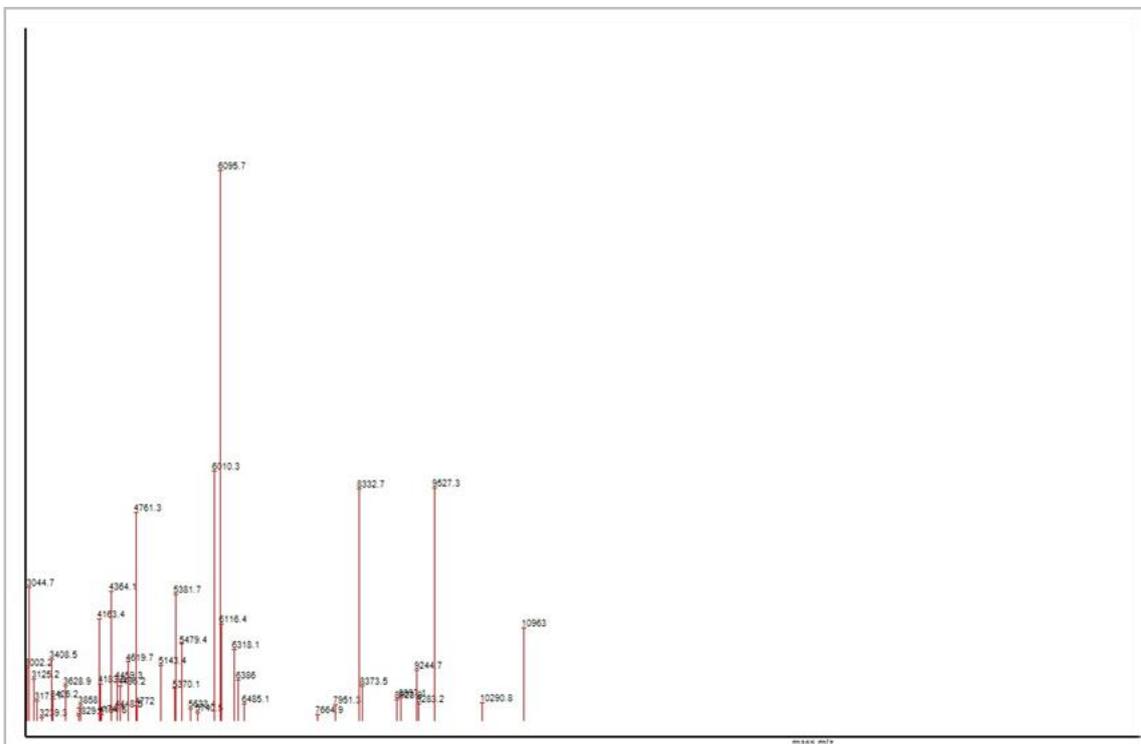
Al final de la zona de vuelo los iones impactan en él. Registra el tiempo que tarda un grupo de iones en atravesar el campo magnético generando así el llamado "espectro de masas". Éste consiste en una relación de masas (eje de las ordenadas) cuya intensidad será la abundancia relativa, es decir, el número de iones de una determinada masa que impacta contra el detector (eje de las abscisas)<sup>257,259</sup>.

## 3.2.-Aplicaciones de la Espectrometría de Masas MALDI-TOF

### 3.2.1.- Identificación de microorganismos

La espectrometría de masas MALDI-TOF es la tecnología cuya aplicación ha resultado más revolucionaria para la Microbiología Clínica en las últimas décadas en cuanto a la identificación de microorganismos. Contar en un Servicio de Microbiología con un espectrómetro de masas de este tipo supone un antes y un después en el desarrollo de la rutina diaria por la mejora que implica con respecto a las técnicas fenotípicas tradicionales, tanto en disminución de tiempo de diagnóstico como en fiabilidad de este<sup>261</sup>. El rango de masas de interés se encuentra entre los 2.000 Da y los 20.000 Da, donde están incluidas, principalmente, las proteínas ribosómicas<sup>257</sup>. De cada género/especie microbiana se genera un espectro (figura 3) que se va a considerar como su huella peptídica, en cuanto que lo diferencia e identifica por su singularidad y reproducibilidad<sup>262,263</sup>.

**Figura 3. Ejemplo de espectro obtenido a partir de una cepa bacteriana**



Para conseguir la identificación, el instrumento compara el espectro obtenido de una muestra problema con los que posee almacenados en su base de datos. Entre las ventajas de la espectrometría de masas MALDI-TOF se encuentran su rapidez en la emisión de resultados (unos minutos), su facilidad de realización, el bajo coste en reactivos, que permite el análisis simultáneo de un elevado número de cepas, que sólo requiere una porción minúscula de colonia y que es capaz de identificar microorganismos difíciles de reconocer por métodos fenotípicos convencionales. Las principales desventajas son el alto coste del equipo y que es imposible identificar espectros que no contenga la base de datos<sup>257</sup>. Además, la fiabilidad con la que MALDI-TOF identifica no es igual para todos los tipos de bacterias.

### 3.2.2.- Estudios de tipificación

La tipificación bacteriana consiste en relacionar aislamientos de una misma especie que estén vinculados epidemiológicamente. Las técnicas que se utilizan han de tener un alto poder de discriminación, ser estables a lo largo del tiempo y ser reproducibles; además, idealmente, deberían resultar rápidas y baratas. Los métodos de tipificación molecular cumplen con muchas de estas características, pero, por otro lado, requieren personal especializado, son laboriosos, muchas veces caros y con tiempos de realización largos<sup>264</sup>. Se tenían muchas esperanzas puestas en que la espectrometría de masas MALDI-TOF podría suponer una alternativa a las técnicas moleculares dada su rapidez y facilidad de uso. Sin embargo, esta aplicación todavía está en desarrollo y faltan protocolos estandarizados y guías que ayuden a la interpretación de los resultados obtenidos<sup>265</sup>.

El análisis epidemiológico mediante espectrometría de masas se puede llevar a cabo de dos maneras distintas: usando librerías espectrales y/o por aproximaciones informáticas. Empleando librerías se comparan los espectros generados a partir de las muestras analizadas con espectros de referencia contruidos en base a aislamientos cuya identidad está bien caracterizada por métodos fenotípicos y/o genotípicos. Las aproximaciones bioinformáticas se fundamentan en la identificación de picos de proteínas característicos

(biomarcadores) dentro de un espectro y la valoración tanto de su presencia/ausencia como de la deriva que pueden sufrir como resultado de mutaciones o modificaciones postraduccionales<sup>264</sup>.

La falta de reproducibilidad es el mayor factor limitante que adolece el uso de MALDI-TOF para el tipado. Por ello es fundamental que se mantengan siempre las mismas condiciones de trabajo: medios de cultivo, tiempo de incubación, preparación de la muestra, ...<sup>257, 265</sup>.

Los espectros que se generan deben procesarse y analizarse mediante programas informáticos normalmente instalados de forma asociada a los espectrómetros de masas. Para comparar distintas cepas se pueden utilizar varios métodos, pero el más sencillo es el cálculo del índice de determinación entre los espectros adquiridos (un coeficiente >0,9 indicaría una fuerte correlación). También se pueden construir dendogramas que muestren la relación entre los aislamientos mediante niveles de distancia arbitraria<sup>264,266</sup>.

Aplicando la espectrometría de masas MALDI-TOF para la tipificación bacteriana se ha podido, por ejemplo, identificar clones de alto riesgo de *Pseudomonas aeruginosa*, como los secuenciotipos ST111, ST235, ST253, ST395 y ST175<sup>267,268</sup>, asociar aislados de *Clostridioides difficile* con su correspondiente ribotipo<sup>264</sup>, realizar el tipado de *Listeria spp*<sup>269</sup> y hacer estudio de brotes<sup>270</sup>.

A pesar de que la información que se obtiene con MALDI-TOF no es comparable, al menos de momento, con la que proporcionan las técnicas moleculares, la espectrometría de masas se vislumbra como una herramienta epidemiológica con un gran potencial que puede seguir desarrollándose y estandarizándose con el fin de llegar a utilizarla de rutina en el tipado de microorganismos.

### 3.2.3.- Otras aplicaciones

Además de su probada utilidad para la identificación de microorganismos y su empleo como método alternativo de tipado bacteriano, la espectrometría de masas MALDI-TOF tiene otras aplicaciones entre las que cabe destacar: la

detección de mecanismos de resistencia a los antibióticos, fundamentalmente la detección de betalactamasas (tanto de espectro extendido como carbapenemasas), la detección de marcadores de virulencia y la identificación de microorganismos a partir de muestra directa<sup>271</sup>.

### **3.3.- Plataformas Comerciales**

Los dos espectrómetros de masas MALDI-TOF más empleados en los laboratorios de Microbiología Clínica son el VITEK®MS (bioMérieux, Francia) y el MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Alemania). La FDA (Food and Drug Administration) aprobó ambas plataformas en 2013<sup>272</sup>. Cada compañía construye, valida y se encarga del mantenimiento de las bases de datos de microorganismos con las que cuenta cada equipo. Adicionalmente, los usuarios también pueden registrar y guardar espectros, así que tienen la capacidad de ampliar sus bases de datos de forma personalizada. Los porcentajes de identificación que consiguen ambas plataformas son muy similares y superiores al 85%<sup>257</sup>; aunque parece que VITEK®MS logra la identificación de un porcentaje mayor de microorganismos a nivel de especie que MALDI Biotyper<sup>273,274</sup> debido principalmente a su mejor caracterización de los cocos gram positivos y las levaduras<sup>275</sup>. En la actualidad, el sistema VITEK®MS tiene dos configuraciones: la CE-IVD (Conformité Européenne-In Vitro Diagnostic) para la identificación de rutina y la RUO (Research Use Only) para investigación. El software compara los espectros obtenidos a partir de las cepas aisladas de las muestras clínicas con los que contiene la base de datos de cada microorganismo o grupo de microorganismos, y asigna un nivel de confianza a cada coincidencia. La probabilidad (0-100%) con la que una identificación es correcta se calcula en cuánto el espectro generado se asemeja al espectro típico de cada organismo. Un porcentaje de 99,9% indica una única posibilidad de identificación; entre 60% y 99,9% un menor poder de discriminación y que hay más de una posible identificación significativa. Por debajo de 60% se considera como no identificado<sup>272</sup>. La configuración RUO posee una base de datos abierta de espectros de referencia y "Super Espectros", estos últimos son conglomerados de espectros de al menos 15

aislamientos que se han obtenido bajo diferentes condiciones y medios de crecimiento, y se han identificado previamente por métodos fenotípicos o genotípicos aceptados. Este módulo permite además determinar la relación de los diferentes aislamientos y llevar a cabo una agrupación jerárquica de los mismos, representando los resultados en dendrogramas<sup>276,277</sup>.

### **3.4.- MALDI-TOF y *Salmonella* spp**

El láser de los espectrómetros de masas desintegra fácilmente la pared de los bacilos gram negativos, de esta manera sus proteínas quedan liberadas permitiendo que sean identificadas de una forma fiable. *Salmonella* spp pertenece a este grupo de microorganismos, así que cuando se analiza una colonia pura se llega sin problemas a la identificación de *Salmonella enterica* spp *enterica*. Como ya se ha explicado anteriormente, la caracterización clásica de esta bacteria requiere de su cultivo en diferentes medios selectivos y diferenciales, pruebas bioquímicas y test serológicos para determinar el serotipo, lo que conlleva un retraso diagnóstico de 2 a 3 días<sup>278</sup>. La introducción de la tecnología MALDI-TOF en los laboratorios de Microbiología ha hecho posible confirmar la identificación el mismo día en el que se observan las colonias sospechosas. De momento no disponemos de protocolos estandarizados y sencillos que permitan a los laboratorios de Microbiología utilizar la espectrometría de masas de forma rutinaria para realizar el tipado de *Salmonella*. Puede que una de las dificultades más importantes con la que nos encontramos es que, al parecer, la detección de combinaciones de proteínas no ribosómicas específicas de serotipo mediante MALDI-TOF MS pasa por ampliar el rango de masas detectables de 20.000 hasta 40.000 Daltons, y actualmente las plataformas comerciales no permiten esta opción<sup>279</sup>. Aunque se ha intentado encontrar picos consenso en los espectros obtenidos que permitan diferenciar entre distintos serotipos no se ha logrado obtener un procedimiento que sea sencillo y reproducible<sup>278,280</sup>. Quienes más se aproximaron a este objetivo fueron Dickmann y Malorny<sup>281</sup> que basándose en una combinación de picos de proteínas consiguieron diseñar un algoritmo para la identificación rápida de cinco de los serotipos de *Salmonella enterica* subsp *enterica* más

frecuentemente aislados: Enteritidis, Typhimurium/1,4,[5],12:i:-, Virchow, Infantis y Hadar. Por otro lado, parece que *Salmonella* Typhi sí que presenta un espectro específico que permite diferenciarlo de otros serotipos<sup>282</sup>, pero aún así, se ha de seguir confirmando mediante técnicas convencionales.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

# 1.- HIPÓTESIS

1.-Los pacientes con gastroenteritis causada por *Salmonella* 1,4,[5],12:i:-, variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium, consumen productos porcinos en los 15 días previos al inicio de los síntomas en una proporción mayor que los pacientes con gastroenteritis causada por otros serotipos de *Salmonella enterica*.

2.-El espectrómetro de masas MALDI-TOF VITEK®MS (bioMérieux) puede utilizarse para diferenciar los serotipos de *Salmonella enterica* subsp *enterica* más frecuentemente aislados en nuestro medio utilizando el algoritmo diseñado por Dieckmann y Malorny<sup>281</sup>.

# 2.- OBJETIVOS

1. Conocer la frecuencia y evolución de los distintos serotipos de *Salmonella* spp encontrados en el Departamento de Salud Castellón y su susceptibilidad a los antimicrobianos. Determinar si existe relación entre las variables sociodemográficas, clínicas y microbiológicas de los casos y realizar una comparación de estas variables entre dos periodos, el de antes y el de después del inicio del confinamiento decretado a causa de la pandemia por SARS-CoV-2.

2. A partir de casos esporádicos de gastroenteritis diagnosticados en el Departamento de Salud Castellón, verificar si el riesgo de sufrir infección por la variante monofásica S. 1,4,[5],12:i:- aumenta con el consumo de productos porcinos, y si existen otros factores de riesgo asociados con estas infecciones.

3. Diferenciar los serotipos de *Salmonella enterica* más prevalentes en nuestro medio mediante el espectrómetro de masas VITEK®MS (bioMérieux) utilizando el método diseñado por Dieckmann y Malorny<sup>281</sup>.

# **METODOLOGÍA**

# 1.- DISEÑO

1.- Estudio observacional descriptivo prospectivo de todos los casos con aislamiento de *Salmonella* spp en coprocultivos realizados en el laboratorio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón durante el periodo de estudio (16 de septiembre de 2018 a 15 de marzo de 2021).

2.- Estudio prospectivo caso-caso comparando la exposición a productos porcinos y otros supuestos factores de riesgo en dos grupos: se consideran como casos 1 los pacientes en los que se haya aislado la variante monofásica S. 1,4,[5],12:i:-, y como casos 2 los pacientes con cultivo positivo a cualquiera de los restantes serotipos de *Salmonella* spp.

3.- Estudio experimental para comprobar si el empleo de la configuración RUO de VITEK®MS permite utilizar la combinación de picos de proteínas diseñada por Dieckmann y Malorny<sup>281</sup> para diferenciar los serotipos Enteritidis, Typhimurium/1,4,[5],12:i:-, Virchow, Infantis y Hadar. Se emplearán las cepas de la bacteria que se aislen en el periodo de estudio que se conservarán congeladas a -80°C. Se comprobará si se obtienen los biomarcadores que permiten identificar el serotipo.

# 2.-ÁMBITO DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón (Castellón de la Plana). Este Hospital presta atención a los ciudadanos del Departamento de Salud Castellón de la Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública, y es el hospital de referencia de los departamentos de Vinaroz y La Plana. Proporciona una atención sanitaria universal, integral y personalizada en régimen comunitario, de urgencia, ambulatorio, hospitalario y domiciliario. Además, como Hospital Universitario, está comprometido con la docencia, formación e investigación.

Todas sus actividades se orientan a satisfacer las necesidades y expectativas de la población, cumpliendo la misión de atender a pacientes y familiares

respetando la confidencialidad y su autonomía, y con criterios de equidad, máxima eficiencia y dispensando un trato profesional y humanizado.

El Servicio de Microbiología realiza el diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas tanto comunitarias como nosocomiales, ya sean sistémicas u órgano-específicas, de los pacientes del Departamento de Salud Castellón. También participa en la elaboración de la Política de Antibióticos del Hospital y del Departamento y en la realización de Programas de Vigilancia y Prevención de las Infecciones Nosocomiales; lleva a cabo la docencia postgraduada en Microbiología de los M.I.R y F.I.R adscritos al Hospital para su formación; y promueve el desarrollo de líneas de investigación en Microbiología Clínica en relación con aquellas enfermedades infecciosas más prevalentes en nuestro Departamento de Salud.

Su equipo profesional está compuesto por facultativos especialistas en Microbiología y Parasitología, facultativos residentes y técnicos especialistas de laboratorio. Los valores que guían a los miembros que componen este Servicio están orientados hacia:

- La excelencia en la asistencia sanitaria.
- La consideración del ciudadano como centro del sistema.
- La continuidad asistencial como dimensión esencial de la calidad.
- La innovación.
- La cooperación entre los niveles asistenciales y el trabajo en equipo.
- La orientación hacia la mejora continua de la calidad.
- La defensa del Sistema Sanitario Público.

En el caso concreto de las infecciones gastrointestinales destaca la larga tradición de colaboración entre los microbiólogos del Servicio y los médicos de Salud Pública, fruto de la cual se lleva a cabo un adecuado control de las toxiinfecciones alimentarias en nuestro Departamento y, además, se han realizado varios estudios que se han plasmado en diversas publicaciones científicas<sup>3,63,69,142,197</sup>.

## 3.- POBLACIÓN Y TAMAÑO MUESTRAL

### 3.1.-Estudio caso-caso

La población la constituyeron los pacientes a los que se les detectó *Salmonella* spp en un cultivo de sus heces en el Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón.

#### Criterios de exclusión:

- Pacientes con cultivos positivos para *Salmonella* spp asociados a brotes epidémicos.
- Pacientes con aislamiento de *Salmonella* spp en muestras distintas de heces.
- Aislamientos de *Salmonella* spp en coprocultivos solicitados para seguimiento de pacientes ya diagnosticados sin cambio en el resultado.

#### Cálculo del tamaño muestral:

Teniendo en cuenta el objetivo de comprobar si el riesgo de sufrir infección por la variante monofásica S. 1,4,[5],12:i:- aumenta con el consumo de productos porcinos y para poder detectar diferencias significativas según la exposición a dichos productos (ingesta al menos una vez por semana), a partir del estudio caso-caso realizado por Arnedo et al<sup>3</sup> se estimó el siguiente tamaño de la muestra en función de la potencia y error alpha (nivel de significación). Se utilizó el programa Stata® versión 14 para el cálculo de las estimaciones (Stata Corporation. Stata Reference Manual. Release 14. College Station, StataCorp 2015).

En unas circunstancias similares, un tamaño que comprendiera 153 casos de la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:- y 61 casos de otros serotipos de *Salmonella*, tendría una potencia estadística del 80% con un nivel de significación del 5% para detectar diferencias significativas (tabla 3).

**Tabla 3. Tamaño muestral para exposiciones a productos porcinos 41% y 62% (diferencia 21%) con error Alpha 5% y diferentes potencias**

Potencia	Error alpha	% Exposición <i>Salmonella</i> otros serotipos	% Exposición variante monofásica	Tamaño (N1) <i>Salmonella</i> otros serotipos	Tamaño (N2) variante monofásica	N Total (N1+N2)
<b>75%</b>	5%	41%	62%	54	135	189
<b>80%</b>	5%	41%	62%	61	153	214
<b>85%</b>	5%	41%	62%	70	175	245
<b>90%</b>	5%	41%	62%	82	205	207
<b>95%</b>	5%	41%	62%	101	253	354

### 3.2.-Estudio experimental

Una vez conocida la prevalencia de cada serotipo en la muestra del estudio, con el programa de cálculo online <https://wnarifin.github.io/ssc/sssns.html>, se estimó con una precisión del 10% que para una sensibilidad esperada del 95% y una especificidad del 90% eran necesarias 61 cepas de *S. Typhimurium*/*S. 1,4,[5],12:i:-* y 61 cepas de otros serotipos distintos; y 63 cepas de *S. Enteritidis* y 63 cepas de otros serotipos diferentes de este.

**Tabla 4. Tamaño muestral para Typhimurium/1,4,[5],12:i:-**

	Serotipificación		Totales
	Typhimurium/1,4,[5],12:i:-	Otros serotipos	
<b>Espectrometría de masas</b>			
Typhimurium/1,4,[5],12:i:- +	58	6	64
Typhimurium/1,4,[5],12:i:- -	3	55	58
<b>Totales</b>	61	61	122

**Tabla 5. Tamaño muestral para Enteritidis**

	Serotipificación		Totales
	Enteritidis	Otros serotipos	
<b>Espectrometría de masas</b>			
Enteritidis+	60	6	66
Enteritidis-	3	57	60
<b>Totales</b>	63	63	126

## 4.- VARIABLES ESTUDIO DESCRIPTIVO y ESTUDIO CASO-CASO

### 4.1.- Variables Primarias

#### Variables epidemiológicas:

•Consumo de productos porcinos en los 15 días previos (el periodo de incubación de S. 1,4,[5],12:i:- puede ser de dos semanas o más<sup>197</sup>) al inicio de síntomas/diagnóstico: sí/no y cuántos días/semana

#### -Curados-consumo crudo:

- Jamón Serrano
- Panceta-Bacon-Tocino
- Longaniza seca o de Pascua
- Fuet
- Salchichón-Salami-Chorizo
- Lomo embuchado-Morcón
- Sobrasada

#### -Cocidos-consumo sin cocinar:

- Jamón de York
- Mortadela
- Salchichas Frankfurt
- Paté de cerdo

#### -Fritos-cocinados:

- Longaniza
- Morcilla

-Butifarra

-Costilla

-Lomo

•Consumo de huevos de gallina y sus productos los 15 días previos al inicio de síntomas/diagnóstico: sí/no y cuántos días/semana

-Mayonesa

-Tortilla

-Huevo crudo

-Huevo frito

#### Variables microbiológicas:

•Mes y año de obtención de la cepa

•Serotipo de la cepa

•Resultado del estudio de sensibilidad

•Picos de proteínas de cada cepa generados con el espectrómetro de masas VITEK-MS.

## **4.2.- Variables Secundarias**

#### Variables sociodemográficas:

•Edad.

•Sexo.

•Procedencia: acceso a la atención sanitaria.

•Nacionalidad.

#### Variables clínicas:

•Manifestaciones clínicas causadas por la salmonelosis.

•Hospitalización: sí/no.

- Antecedentes patológicos.
- Antecedentes de tratamiento antimicrobiano en los 15 días previos al inicio de síntomas/diagnóstico: sí/no.

Variables epidemiológicas (otros factores de riesgo):

Antecedentes en los 15 días previos al inicio de síntomas/diagnóstico de:

- Contacto con pacientes con diarrea: sí/no.
- Contacto con animales domésticos: sí/no, detallar.
- Viajes: sí/no, destino.
- Jugar con la tierra/realizar trabajos de jardinería: sí/no.

## **5.- OBTENCIÓN Y RECOGIDA DE DATOS**

### **5.1. Estudio observacional descriptivo y estudio caso-caso**

Del Sistema Informático del Laboratorio (GestLab) se recogieron datos sociodemográficos (edad, sexo, procedencia ambulatoria u hospitalaria) y microbiológicos (serotipo de *Salmonella*; mes y año de obtención de la cepa; resultado del estudio de sensibilidad frente ampicilina, amoxicilina-clavulánico, ciprofloxacino, ceftriaxona y cotrimoxazol) de todos los casos con aislamiento de *Salmonella* spp en heces, incluyendo sólo la primera cepa de cada episodio.

Los medios de cultivo empleados para el aislamiento de *Salmonella* fueron: agar MacConkey (MCK Agar, bioMérieux), agar SS (bioMérieux) y caldo selenito (Selenite F, BD BBL™) como enriquecimiento. Los medios se incubaron en estufa a 37°C en aerobiosis durante 18-24 horas. Pasado este tiempo, el caldo selenito se resembró en agar SS, que a su vez se incubó a 37°C en aerobiosis 24 horas. Las colonias sospechosas aisladas fueron identificadas mediante espectrometría de masas MALDITOF (VITEK®MS, bioMérieux). El estudio de sensibilidad de las cepas de *Salmonella* se realizó mediante el sistema automatizado VITEK-2 (bioMérieux).

El reclutamiento de los pacientes para el estudio caso-caso se realizó a partir del momento del aislamiento de las salmonelas en los coprocultivos. Se contactó con ellos vía telefónica tras conseguir su número consultando el Sistema de Información Poblacional (SIP) de la Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. Cuando el paciente era menor de edad se entrevistó a uno de sus padres. Los participantes contestaron a un cuestionario (anexo I) en el que se preguntaba acerca de las variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas. Todas las entrevistas fueron realizadas por la misma persona (la autora de la investigación) sin conocer el serotipo de *Salmonella* spp aislado. El cuestionario se utilizó como cuaderno de recogida de datos. Se anonimizó a los pacientes asignando un número a cada uno utilizando una hoja de Excel (anexo II). Con estos números se rellenaron los cuadernos de recogida de datos y otra hoja de Excel para el análisis posterior de los mismos (anexo I y III), preservando en todo momento la confidencialidad de los pacientes. Los casos se dividieron en dos grupos: caso 1, pacientes con aislamiento de *S.* 1,4,[5],12:i:, y caso 2, pacientes con aislamiento de cualquiera de los restantes serotipos de *Salmonella* spp. El estudio iba a tener una duración desde el 15 de septiembre de 2018 hasta la fecha en la que se hubiera alcanzado el tamaño muestral calculado, pero la pandemia por el virus SARS-CoV-2 provocó que se modificara la planificación. El 14 de marzo de 2020 se declaró en España el estado de alarma con lo que la atención médica (incluida la microbiológica) quedó relegada a la COVID-19 y a las enfermedades graves urgentes. El número de casos de salmonelosis diagnosticados cayó drásticamente y se decidió prolongar el estudio hasta el 14 de marzo de 2021.

## **5.2.-Estudio experimental**

Todas las salmonelas identificadas en nuestro laboratorio son remitidas al laboratorio de referencia de *Salmonella* del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III para su serotipificación completa de acuerdo con el esquema de White-Kauffmann-Le Minor (gold standard), por lo que se dispuso del serotipo de todos los aislamientos.

Las cepas (la primera aislada de cada caso durante el periodo de estudio) se conservaron congeladas a -80°C en viales criogénicos de polipropileno con crioperlas tratadas con preservantes (BIOFIL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se identificaron con el número de la muestra de la que provenían.

Los datos de los picos de los perfiles proteómicos fueron obtenidos usando VITEK® MS versión RUO y para su análisis se empleó RUO SARAMIS®. Una vez finalizado el periodo de recogida y conservación de las cepas, con la ayuda de un asa, se extrajo una crioperla de cada vial, y se depositó en una placa de medio sólido SS que se incubó a 37°C durante 18-24 horas. Pasado este tiempo, si crecía un cultivo puro de colonias con las características morfológicas propias de *Salmonella*, ésta se sembraba en otra placa de medio sólido de Muller-Hinton sin sangre (Muller-Hinton II Agar, BD BBL™) que se incubaba en estufa a 37°C otras 18-24 horas. Posteriormente, mediante el sistema VITEK® PICKME™, se tomó de las placas la cantidad de colonia adecuada para depositarla correctamente en el pocillo correspondiente de la placa metálica del sistema VITEK® MS, inmediatamente después se añadió 1 µl de la matriz de ácido α-ciano-4-hidroxi-cinámico (bioMérieux) a cada pocillo y se dejaron secar a temperatura ambiente. La espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro VITEK® MS. El sistema de detección se configuró en un rango de masas de 2.000-20.000 Daltons, con una frecuencia de 100 disparos por muestra. Los espectros generados se importaron a la base de datos para su estudio sólo si por lo menos una de las dos muestras tenía una puntuación >95% para *Salmonella enterica* spp *enterica*. Para comprobar si el algoritmo de identificación basado en biomarcadores específicos de Dieckmann y Malorny<sup>282</sup> de los serotipos Enteritidis, Typhimurium/variante monofásica, Virchow, Hadar e Infantis podría reproducirse en nuestro entorno, se compararon la presencia/ausencia de los picos biomarcadores discriminatorios (tabla 6) en los espectros obtenidos de nuestras cepas de *Salmonella* con los resultados de la serotipificación tradicional.

**Tabla 6. Biomarcadores propuestos por Dieckmann y Malorny<sup>281</sup>**

Serotipos	Biomarcadores		
	presencia		ausencia
	principal	complementarios	
Enteritidis	6.036	-	6.009
Typhimurium/monofásica	7.097	8.686,10.067, 22.949	7.111
Infantis	18.635	6.512, 8.699, 9.374	18.644, 18.655
Hadar	10.927	8.418, 8.699, 9.404	10.957
Virchow	7.097	8.699, 10.048. 22.979	7.111

## 6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se realizó un análisis general descriptivo de todos los casos de gastroenteritis debidos a *Salmonella* spp diagnosticados durante el periodo de estudio, y otro de todos los pacientes que se incluyeron en el estudio caso-caso.

La comparación entre los casos de *Salmonella* spp ocurridos antes y después del inicio del confinamiento decretado a causa de la pandemia por SARS-CoV-2 se llevó a cabo mediante las pruebas estadísticas Chi-cuadrado y exacta de Fisher para las variables cualitativas, y la prueba de Kruskal-Wallis para las variables cuantitativas

La tendencia estacional de las infecciones y su significación se estudiaron mediante la prueba de tendencia Z, el coeficiente de correlación de Spearman y la regresión lineal multivariante para ajustar por edad y sexo.

Para realizar el análisis estadístico del estudio caso-caso se compararon los pacientes caso 1 y los caso 2, utilizando también las pruebas estadísticas Chi-cuadrado y exacta de Fisher para las variables cualitativas, y la prueba de Kruskal-Wallis para las variables cuantitativas. Se empleó regresión logística para estimar odds ratios (OR) como medida de asociación entre potenciales factores de riesgo y las infecciones por *Salmonella* spp con un 95% de intervalo de confianza (IC). Se realizaron modelos de regresión logística multivariante

para analizar las asociaciones con potenciales factores de riesgo y se utilizó la metodología Direct Acyclic Graphics (programa: DAGitty version 3.0 Johannes Textor, Nijmegen, The Netherlands).

Se determinó la sensibilidad y especificidad del método de identificación de serotipos basado en la obtención de biomarcadores específicos mediante espectrometría de masas, con respecto a la serotipificación clásica (gold-standard), y se empleó la prueba estadística exacta de Fisher para comparar los resultados.

Se consideró como nivel de significación  $p=0.05$  (significativo  $p<0.05$ ; no significativo  $p>0.05$ ). Todos los cálculos se llevaron a cabo con el programa Stata ® versión 14.

## **7.- CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital General Universitario de Castellón y la autorización de la responsable del Servicio de Microbiología del Hospital (anexo IV y V).

Se solicitó permiso a todos los pacientes adultos o a la madre/padre de los pacientes menores de edad para llevar a cabo la entrevista telefónica. Se les explicó el propósito del estudio y el motivo de ser elegidos para formar parte de este, que su participación era voluntaria y que tenían la opción de abandonarlo en el momento que quisieran. Se les pidió autorización para consultar su historia clínica en caso de ser necesario. Si el paciente daba su consentimiento oral (anexo VI) y accedía a realizar la encuesta telefónica, posteriormente recibía la Hoja de Información al Paciente (anexo VII) vía correo electrónico y daba su consentimiento por escrito respondiendo a un formulario de Google Drive creado para tal fin cuyo acceso (<https://drive.google.com/open?id=1bEcNqiOs2DYY-syPIhn4VHBHYzYS1jOfleiK3vtAH3w>) se remitía en el mismo correo. También se disponía de un modelo de consentimiento por escrito (anexo VIII) en caso de requerirlo.

El acceso a la información personal de los pacientes queda restringido a la investigadora, autoridades sanitarias (AEMPS, inspectora de Buenas Prácticas Clínicas) y al Comité de la Ética de la Investigación, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

La investigadora se compromete al cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal y al Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007).

# **RESULTADOS**

# 1.- ESTUDIO OBSERVACIONAL DESCRIPTIVO PROSPECTIVO

## 1.1.-Estudio general descriptivo

Durante el periodo de estudio, se aislaron un total 313 cepas de *Salmonella* spp. Tras descartar las que provenían de muestras distintas de heces (10) y las de los pacientes con aislamientos repetidos derivados de cultivos realizados de control tras una salmonelosis (41), quedaron 272 cepas correspondientes a otros tantos pacientes.

Del total, el 53,7% fueron hombres y el 46,3% mujeres. La edad media fue de 21,8 años con un rango entre 0 y 95 años; y por sexos, la de los hombres fue 19,6 y la de las mujeres 24,4 años. Los grupos de edad en los que se acumularon más casos fueron: el de los menores de 5 años (32%), el de 5 a 9 años (20,2%) y el de  $\geq 65$  años (10,7%) (tabla 7). El 50% de los pacientes tenía menos de 10 años.

**Tabla 7. Distribución de los pacientes por grupos de edad (n/%)**

Grupos edad	n	%
0-4	87	32
5-9	55	20,2
10-14	20	7,4
15-19	18	6,6
20-24	8	2,9
25-29	4	1,5
30-34	9	3,3
35-39	7	2,6
40-44	7	2,6
45-49	8	2,9
50-54	6	2,2
55-59	8	2,9
60-64	6	2,2
$\geq 65$	29	10,7
<b>Total</b>	<b>272</b>	<b>100,00</b>

En cuanto al acceso a la atención sanitaria, en el 51,1% de los casos se hizo vía ambulatoria y en el 48,9% a través del servicio de urgencias del hospital, aunque sólo el 14,3% del total (39/272) precisó ingreso hospitalario.

De los enfermos no hospitalizados, el 51,1% (119/233) fueron hombres y el 48,9% (114/233) mujeres, mientras que en los ingresados estos porcentajes representaron el 69,2% (27/39) y el 30,8% (12/39), respectivamente. La edad media de los pacientes atendidos ambulatoriamente fue de 18,1 años y la de los que necesitaron hospitalización de 43,8 años. El grupo de edad con mayor número de ingresos fue el de 55-59 años con un 62,5%, seguido del de  $\geq 65$  años con un 48,3% (tabla 8).

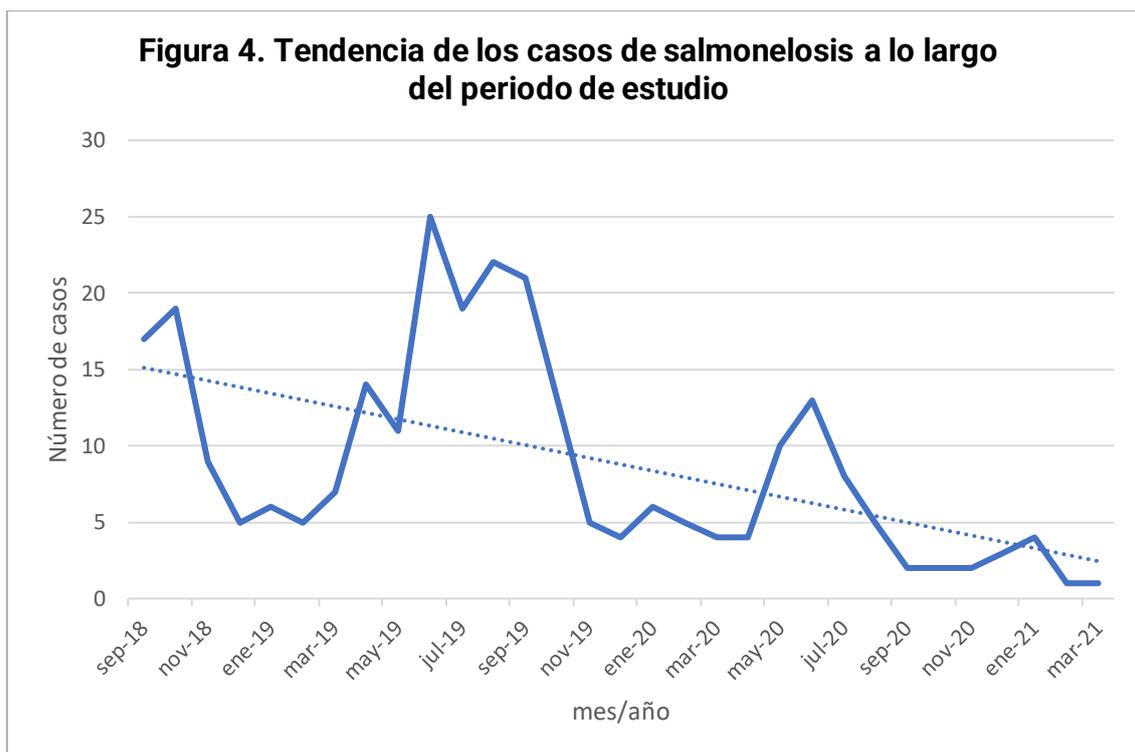
**Tabla 8. Distribución de los pacientes hospitalizados por grupos de edad (n/%)**

Grupos edad	n ingresados	n total	%
0-4	5	87	5,7
5-9	4	55	7,3
10-14	2	20	10
15-19	2	18	11,1
20-24	0	8	0
25-29	2	4	50
30-34	3	9	33,3
35-39	0	7	0
40-44	1	7	14,3
45-49	1	8	12,5
50-54	0	6	0
55-59	5	8	62,5
60-64	0	6	0
$\geq 65$	14	29	48,3
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>272</b>	<b>14,3</b>

El análisis estadístico mostró que los hombres (OR=3,14 95% IC 1,39-7,10),  $p=0,006$ , y los pacientes de mayor edad (OR=1,039 95% IC 1,02-1,05),  $p=0,000$ , presentaron más riesgo de ser hospitalizados.

Los meses con mayor número de aislamientos de *Salmonella* spp se correspondieron con los más calurosos del año: junio (14%), julio (9,9%), agosto (9,9%), septiembre (14,7%) y octubre (12,5%). Como se aprecia en la figura 4, en

el año 2019 hubo un pico de casos en abril, y en el año 2020 sólo hubo un pequeño aumento de casos entre mayo y junio, periodo en el que se aislaron el 43,4% de las cepas de todo el año. Comparando el total de casos por meses, en el periodo 2019-2020, los dos años completos del estudio, se observó que entre finales de primavera y principios de otoño había significativamente más casos que el resto del año (prueba de Chi-Cuadrado  $p=0,011$ ).



A lo largo del tiempo se apreció una tendencia hacia la disminución de episodios de salmonelosis, pero sin alcanzar significación (prueba de tendencia  $Z=-1,41$   $p=0,157$ ). En cambio, en la comparación de casos por año considerando sólo el periodo septiembre-diciembre, con el fin de poder comparar tres años (2018-2020), sí que se encontraron diferencias significativas (prueba de Fisher  $p=0,000$ ) de manera que los casos del año 2020 representaron sólo 8,8% del total de los que se incluyeron en la comparación (tabla 9). Así mismo, no hay diferencia significativa en la comparación de casos por año si estudiamos el periodo enero-marzo (2019-2021) ( $p=0,195$ ) (tabla 10).

**Tabla 9. Comparación de los casos de salmonelosis en el periodo de septiembre a diciembre (años 2018-2020)**

	Septiembre-Diciembre			
	2018 n (%)	2019 n (%)	2020 n (%)	Totales n (%)
Casos observados	50 (49)	43 (42,2)	9 (8,8)	102 (100)
Casos esperados	34 (33,3)	34 (33,3)	34 (33,3)	102 (100)

**Tabla 10. Comparación de los casos de salmonelosis en el periodo de enero-a marzo (años 2019-2021)**

	Enero-Marzo			
	2019 n (%)	2020 n (%)	2021 n (%)	Totales n (%)
Casos observados	18 (46,2)	15 (38,5)	6 (15,4)	39 (100)
Casos esperados	13 (33,3)	13 (33,3)	13 (33,3)	39 (100)

Con respecto a los serotipos, se identificaron 33 diferentes, siendo los más frecuentes: 1,4,[5],12:i:- (43%), Enteritidis (29%), Montevideo (7,4%) y Typhimurium (3,7%). El 59,8% de las cepas del serotipo 1,4,(5),12:i:- presentaron la fórmula antigénica 4,5,12:i:- y el 40,2% 4,12:i:-. Aunque el serotipo predominante y el más frecuente tanto en 2018 como en 2019 fue el monofásico, en el año 2020 fue reemplazado por Enteritidis. La proporción de S. Enteritidis fue en aumento del primer al último año de estudio, sin embargo la del serotipo 1,4,[5],12:i:- se mantuvo al mismo nivel en 2018-2019 pero disminuyó prácticamente a la mitad en 2020 (tabla 11). Tanto en 2018 como en 2020 los tres serotipos más prevalentes fueron Enteritidis, serotipo 1,4,[5],12:i:- y Typhimurium, aunque en diferente orden de frecuencia cada año; en 2019 Montevideo ocupó el tercer lugar en frecuencia en lugar de Typhimurium. Mediante la prueba de correlación de Spearman se comprobó que la tendencia con los años al incremento de casos de Enteritidis y el descenso de casos de 1,4,[5],12:i:- fue significativa (tabla 12); sin embargo, Montevideo y Typhimurium no presentaron tendencias significativas. Tras el ajuste por edad y sexo mediante regresión lineal multivariante se mantuvo la significación del

aumento del serotipo Enteritidis, pero no el descenso del 1,4,[5],12:i-; Montevideo y Typhimurium no experimentaron cambios.

**Tabla 11. Distribución de todos los serotipos por año de estudio**

Tipo	2018 n (%)	2019 n (%)	2020 n (%)	2021 n (%)	Total n (%)
Agbeni		1 (0,7)			1 (0,4)
Albany	1 (2)				1 (0,4)
Ank	1 (2)				1 (0,4)
Blukwa		1 (0,7)			1 (0,4)
Bovismorbificans			3 (4,8)		3 (1,1)
Braenderup		1 (0,7)			1 (0,4)
Brandenburg	2 (4)	1 (0,7)			3 (1,1)
Bredeneý			1 (1,6)		1 (0,4)
Chester	2 (4)	1 (0,7)			3 (1,1)
Coeln		1 (0,7)			1 (0,4)
Cotham		1 (0,7)			1 (0,4)
Derby		1 (0,7)			1 (0,4)
Diarizonae		1 (0,7)	1 (1,6)		2 (0,7)
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>salamae</i> II	1 (2)				1 (0,4)
Enteritidis	9 (18)	39 (25,5)	28 (44,4)	3 (50)	79 (29)
Goldcoast		1 (0,7)	1 (1,6)		2 (0,7)
Hadar	1 (2)				1 (0,4)
Houston			1 (1,6)		1 (0,4)
Infantis		3 (2)			3 (1,1)
Kapemba			1 (1,6)		1 (0,4)
Mikawasima		3 (2)	1 (1,6)		4 (1,5)
Montevideo	4 (8)	14 (9,2)	2 (3,2)		20 (7,4)
Muenchen		1 (0,7)			1 (0,4)
Napoli	1 (2)				1 (0,4)
Newport			1 (1,6)		1 (0,4)
Poona		2 (1,3)			2 (0,7)
Rissen	1 (2)	1 (0,7)	1 (1,6)		3 (1,1)
Saintpaul		2 (1,3)			2 (0,7)
Salamae			1 (1,6)		1 (0,4)
Spartel		1 (0,7)			1 (0,4)
Stanley			1 (1,6)		1 (0,4)
Typhimurium	5 (10)	1 (0,7)	4 (6,4)		10 (3,7)
1,4,[5],12:i-	22 (44)	76 (49,7)	16 (25,4)	3 (50)	117 (43)
<b>Total</b>	<b>50 (100)</b>	<b>153 (100)</b>	<b>63 (100)</b>	<b>6 (100)</b>	<b>272 (100)</b>

**Tabla 12. Tendencia de los serotipos durante los años 2018-2021**

Serotipos	Coefficiente Spearman	p valor	Coefficiente Regresión	Intervalo Confianza 95%	p valor
1,4,[5],12:i-	-0,130	0,032	-0,07	-0,15 -0,01	0,091
Enteritidis	0,202	0,001	0,13	0,05 -0,21	0,001
Montevideo	-0,078	0,203	-0,03	-0,07 -0,01	0,188
Typhimurium	-0.050	0,431	-0,02	-0,05 -0,02	0,338

La comparación de la distribución de los cuatro serotipos más frecuentes por edad y sexo mediante la prueba de Kruskal-Wallis (tablas 13 y 14) fue estadísticamente significativa sólo para 1,4,[5],12:i:- y la edad ( $p=0,0001$ ), es decir, la menor edad se asoció significativamente con padecer una salmonelosis causada por este serotipo.

**Tabla 13. Comparación de los serotipos más frecuentes por edad (n=272)**

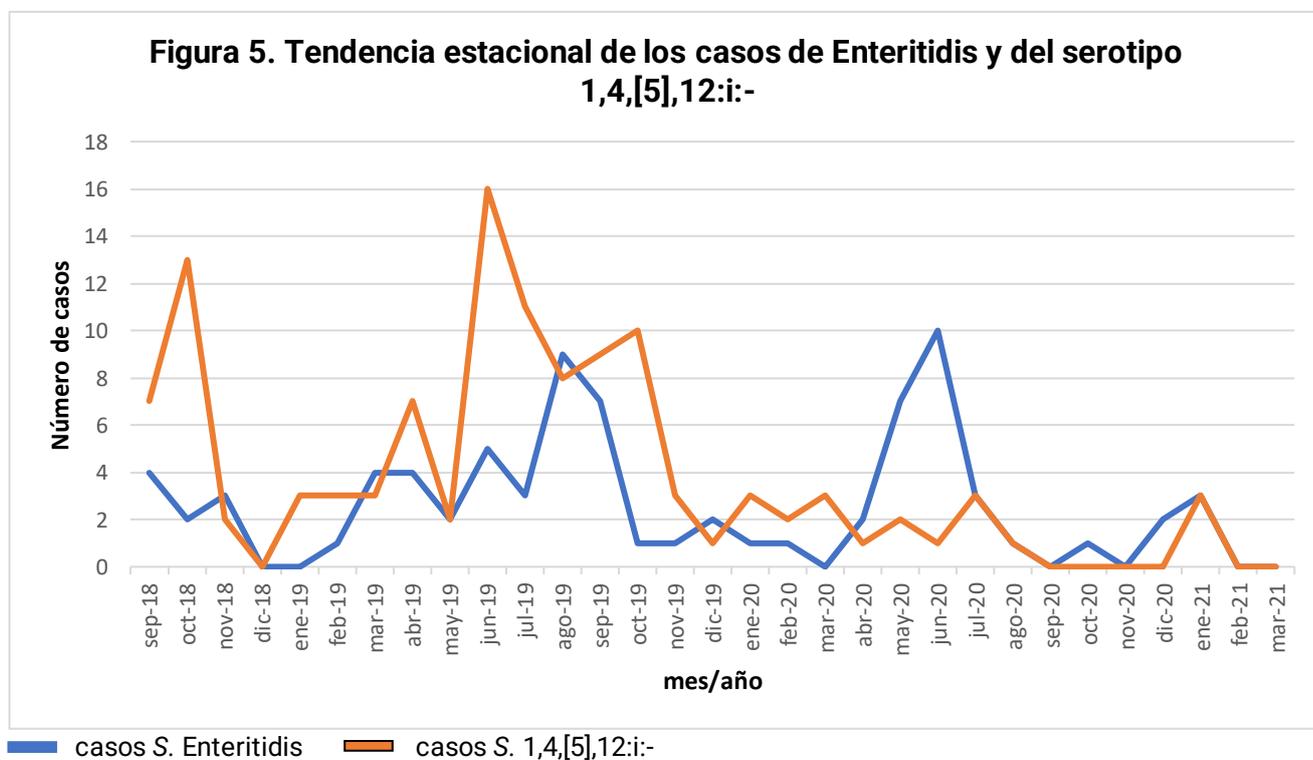
Serotipo	Media edad (años)	Mediana edad (años)	Kruskal-Wallis p
<b>1,4,[5],12:i:- (n=117)</b>	16,32 ± 22,86	6 (rango 0,5-95)	$X^2=14,62$ $p=0,0001$
<b>Resto serotipos (n=155)</b>	25,93 ± 25,96		
<b>Enteritidis (n=79)</b>	19,82 ± 22,31	10 (rango 0,17-88)	$X^2=0,157$ $p=0,692$
<b>Resto serotipos (n=193)</b>	22,61 ± 26,15		
<b>Montevideo (n=20)</b>	19,16 ± 13,34	17 (rango 0,33-50)	$X^2=1,178$ $p=0,277$
<b>Resto serotipos (n=252)</b>	22,01 ± 25,80		
<b>Typhimurium (n=10)</b>	27,88 ± 29,84	17,6 (rango 0,75-73)	$X^2=0,055$ $p=0,814$
<b>Resto serotipos (n=262)</b>	21,56 ± 24,92		

**Tabla 14. Comparación de los serotipos más frecuentes por sexo (n=272)**

Serotipo	Hombres	Mujeres	Prueba de Fisher p
<b>1,4,[5],12:i:- (n=117)</b>	65	52	$p=0,624$
<b>Resto serotipos (n=155)</b>	81	74	
<b>Total</b>	146	126	
<b>Enteritidis (n=79)</b>	41	38	$p=0,789$
<b>Resto serotipos (n=193)</b>	105	88	
<b>Total</b>	146	126	
<b>Montevideo (n=20)</b>	13	7	$p=0,355$
<b>Resto serotipos (n=252)</b>	133	119	
<b>Total</b>	146	126	
<b>Typhimurium (n=10)</b>	5	5	$p=1,000$
<b>Resto serotipos (n=262)</b>	141	121	
<b>Total</b>	146	126	

Tanto en los pacientes ambulatorios como en los hospitalizados los tres serotipos más frecuentemente aislados fueron el 1,4,[5],12:i:-, Enteritidis y Montevideo. No se apreciaron asociaciones estadísticas entre los distintos serotipos y los ingresos hospitalarios.

La tendencia de los casos de salmonelosis causados por S. 1,4,[5],12:i:- y S. Enteritidis por separado se observa en la figura 5. Para comprobar si hubo tendencia estacional significativa en la aparición de infecciones debidas a estos dos serotipos se estudiaron los dos años completos incluidos en el estudio (2019 y 2020) distribuyendo los casos en periodos trimestrales (tabla 15). Así, los trimestres abril-junio y julio-septiembre aglutinaron el 69,4% de los aislamientos, frente al 17,6% en enero-marzo y 13,06% en octubre-diciembre ( $p=0,000$ ). Por separado, para 1,4,[5],12:i:- no se apreciaron variaciones significativas que, por el contrario, sí se observaron para Enteritidis ( $p=0,014$ ), con más casos en primavera y verano.



**Tabla 15. Distribución de los casos de 1,4,[5],12:i- y Enteritidis por trimestres (2019-2020)**

Casos	Enero-Marzo	Abril-Junio	Julio-Septiembre	Octubre-Diciembre	P valor
<b>Totales</b>	39	77	77	29	0,000
<b>1,4,[5],12:i-</b>	20	29	32	14	0,207
<b>Enteritidis</b>	10	30	23	7	0,014

Con respecto al estudio de sensibilidad de las cepas, los porcentajes de susceptibilidad global encontrados frente a cada antimicrobiano fueron: ampicilina (AMP), 52,2%; amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), 65,1%; ciprofloxacino (CIP) 97,4%; cotrimoxazol (SXT), 91,2%; cefotaxima (CTX), 99,3%; e imipenem (IPM) 100% (tabla 16).

**Tabla 16. Porcentajes de susceptibilidad por antimicrobiano/año y global (n/%)**

Antibiótico	2018 n (%)	2019 n (%)	2020 n (%)	2021 n (%)	Global n (%)
<b>Ampicilina</b>	20 (40)	76 (50)	43 (67,2)	3 (50)	142 (52,2)
<b>Amoxicilina-clavulánico</b>	46 (92)	84 (55,3)	44 (68,8)	3 (50)	177 (65,1)
<b>Ciprofloxacino</b>	50 (50)	149 (98)	60 (93,8)	6 (100)	265 (97,4)
<b>Cotrimoxazol</b>	43 (86)	138 (90,8)	61 (95,3)	6 (100)	248 (91,2)
<b>Cefotaxima</b>	50 (100)	151 (99,3)	63 (98,4)	6 (100)	270 (99,3)
<b>Imipenem</b>	50 (100)	152 (100)	64 (100)	6 (100)	272 (100)
<b>Total cepas</b>	50	152	64	6	272

Los porcentajes de resistencia fueron respectivamente: AMP, 47,8%; AMC, 34,9%; CIP 2,6%; SXT, 8,8%; CTX, 0,7%; e IPM 0%.

Presentaron resistencia a uno o más de los antimicrobianos estudiados el 89,7% de las cepas de S. 1,4,[5],12:i-, el 7,6% de S. Enteritidis, el 10% de S. Montevideo y 70% de S. Typhimurium. El perfil más frecuente de las cepas del serotipo 1,4,[5],12:i- fue ser resistente a AMP y AMC y sensible a CIP, SXT, CTX e IPM (tabla 17). Los aislamientos de S. Enteritidis y S. Montevideo fueron mayoritariamente sensibles a todos los antimicrobianos (tablas 18 y 19). Y en cuanto a S. Typhimurium, el 30% de las cepas presentaron el perfil predominante en la variante monofásica. (Tabla 20).

**Tabla 17. Perfiles de Resistencia de las cepas del serotipo 1,4,[5],12:i:-**

AMP	AMC	CIP	SXT	CTX	IPM	Total n (%)
S	S	S	S	S	S	12 (10,3)
R	S	S	S	S	S	19 (8,8)
R	R	S	S	S	S	66 (56,4)
R	S	S	R	S	S	7 (6)
R	R	S	R	S	S	11 (9,4)
R	R	S	R	R	S	1 (0,9)
R	R	R	R	R	S	1 (0,9)

**Tabla 18. Perfiles de Resistencia de las cepas del serotipo Enteritidis**

AMP	AMC	CIP	SXT	CTX	IPM	Total n (%)
S	S	S	S	S	S	73 (92,4)
R	S	S	S	S	S	2 (2,5)
R	R	S	S	S	S	3 (3,8)
S	S	R	S	S	S	1 (1,3)

**Tabla 19. Perfiles de Resistencia de las cepas del serotipo Montevideo**

AMP	AMC	CIP	SXT	CTX	IPM	Total n (%)
S	S	S	S	S	S	18 (90)
R	R	S	S	S	S	1 (5)
S	R	S	S	S	S	1 (5)

**Tabla 20. Perfiles de Resistencia de las cepas del serotipo Typhimurium**

AMP	AMC	CIP	SXT	CTX	IPM	Total n (%)
S	S	S	S	S	S	3 (30)
R	S	S	S	S	S	3 (30)
R	R	S	S	S	S	3 (30)
R	R	R	S	S	S	1 (10)

De todas las cepas de *Salmonella* spp aisladas sólo hubo dos con resistencia a cefotaxima, ambas del serotipo 1,4,[5],12:i:-; y siete cepas con resistencia a ciprofloxacino: dos Infantis, una 1,4,[5],12:i:-, una Goldcoast, una Kapemba, una Enteritidis y una Typhimurium. No se estudió el mecanismo subyacente.

## 1.2.- Comparación de los periodos pre y post pandemia

Se realizó una comparación de las variables edad, sexo y hospitalización de los pacientes, serotipos y sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas entre el periodo comprendido desde el 16 de septiembre de 2018 hasta el 13 de marzo

de 2020 (pre-confinamiento) con el abarcado entre el 14 de marzo de 2020 (fecha del inicio del confinamiento decretado a causa de la pandemia de COVID-19) y el 14 de marzo de 2021 (periodo post-confinamiento).

De los 272 casos totales, 215 tuvieron lugar en la primera etapa, 0,42 casos por día (215/514 días), y 57 en la segunda, 0,16 casos por día (57/365 días).

La edad media de los pacientes diagnosticados antes del inicio del confinamiento fue de 19,9 años, y después de 29 años. En cuanto al sexo, en el primer periodo el 51,6% de los enfermos fueron hombres y el 48,4% mujeres; mientras que en el segundo estos porcentajes representaron el 61,4% y el 38,6% respectivamente. Tanto mediante análisis univariante como multivariante de regresión logística se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas etapas para la variable edad, pero no para el sexo. La mayor edad se asoció significativamente con el periodo post-confinamiento ( $p=0,011$ ), por cada año más de vida de los enfermos había un 1,4% más de probabilidad de que el caso ocurriera en este segundo periodo del estudio.

Previo al inicio del confinamiento la proporción de enfermos que necesitaron ingreso hospitalario fue del 12,1% (26/215), con una edad media de 37,9 años; en cambio en la etapa a partir del 14 de marzo de 2020 los hospitalizados representaron el 22,8% (13/57), con una edad media de 56,1 años. El porcentaje de hombres y mujeres hospitalizados en ambos periodos fue exactamente el mismo: 69,2% y 30,8% respectivamente. El aumento de la proporción de hospitalizaciones y la mayor edad de estos pacientes en el segundo periodo fueron significativos ( $p=0,04$  y  $p=0,001$ , respectivamente).

Antes del 14 de marzo de 2020 se aislaron 26 serotipos de *Salmonella* spp distintos, siendo los más frecuentes 1,4,[5],12:i:- (48,8%), Enteritidis (23,3%), Montevideo (8,8%) y Typhimurium (3,3%). En la etapa a partir de esa fecha sólo se detectaron 15 serotipos distintos y los más prevalentes fueron Enteritidis (50,9%), 1,4,(5),12:i:- (21,1%), Typhimurium (5,3%) y Bovismorbificans (3,5%) (tabla 21). La proporción de casos debidos al serotipo 1,4,[5],12:i:- disminuyó más de la mitad en la segunda parte del estudio, por el contrario la proporción

de aislamientos de Enteritidis aumentó a más del doble. Se comprobó que la disminución de casos debidos al 1,4,[5],12:i:- y el aumento de los ocasionados por el serotipo Enteritidis entre los dos periodos fue estadísticamente significativa mediante la prueba exacta de Fisher ( $p=0,000$  para ambos), esta significación se mantuvo tras ajustar por edad y sexo mediante regresión logística ( $p=0,001$  para el serotipo 1,4,[5],12:i:- y  $p=0,000$  para Enteritidis).

**Tabla 21. Distribución de todos los serotipos en dos etapas: pre y post inicio del confinamiento**

Tipo	Pre-confinamiento n (%)	Post-confinamiento n (%)	Total n (%)
Agbeni	1 (0,5)		1 (0,4)
Albany	1 (0,5)		1 (0,4)
Ank	1 (0,5)		1 (0,4)
Blukwa		1 (1,8)	
Bovismorbificans	1 (0,5)	2 (3,5)	3 (1,1)
Braenderup	1 (0,5)		1 (0,4)
Brandenburg	3 (1,4)		3 (1,1)
Bredenev		1 (1,8)	1 (0,4)
Chester	3 (1,4)		3 (1,1)
Coeln	1 (0,5)		1 (0,4)
Cotham	1 (0,5)		1 (0,4)
Derby	1 (0,5)		1 (0,4)
Diarizonae	1 (0,5)	1 (1,8)	2 (0,4)
<i>Salmonella enterica</i> subsp <i>salamae</i> II	1 (0,5)		1 (0,4)
Enteritidis	50 (23,3)	29 (50,9)	79 (29)
Goldcoast	1 (0,5)	1 (1,8)	2 (0,7)
Hadar	1 (0,5)		1 (0,4)
Houston		1 (1,8)	1 (0,4)
Infantis	3 (1,4)		3 (1,1)
Kapemba		1 (1,8)	1 (0,4)
Mikawasima	3 (1,4)	1 (1,8)	1 (0,4)
Montevideo	19 (8,8)	1 (1,8)	20 (7,4)
Muenchen	1 (0,5)		1 (0,4)
Napoli	1 (0,5)		1 (0,4)
Newport		1 (1,8)	1 (0,4)
Poona	2 (0,9)		2 (0,7)
Rissen	3 (1,4)		3 (1,1)
Saintpaul	2 (0,9)		2 (0,7)
Salamae		1 (1,8)	1 (0,4)
Spartel	1 (0,5)		1 (0,4)
Stanley		1 (1,8)	1 (0,4)
Typhimurium	7 (3,3)	3 (5,3)	10 (3,7)
1,4,(5),12:i:-	105 (48,8%)	12 (21,1)	117 (43)
<b>Total</b>	<b>215</b>	<b>57</b>	<b>272 (100)</b>

Por último, se comparó la sensibilidad frente a los antibióticos estudiados de las cepas de *Salmonella* spp, encontrándose un aumento de la sensibilidad a AMP y una disminución de la sensibilidad a CIP entre ambos que fueron estadísticamente significativos ( $p=0,000$  y  $p=0,037$ , respectivamente) (tabla 22). No se encontraron diferencias significativas para el resto de los antibióticos.

**Tabla 22. Comparación de los porcentajes de sensibilidad a los antimicrobianos estudiados en dos etapas: pre y post inicio del confinamiento**

Antimicrobianos	Pre-confinamiento	Post- confinamiento	Prueba exacta de Fisher
	n (%)	n (%)	p
<b>Ampicilina</b>	100 (46,5)	42 (73,7)	0,000
<b>Amoxicilina-clavulánico</b>	134 (62,3)	43 (75,4)	0,159
<b>Ciprofloxacino</b>	212 (98,6)	53 (93)	0,037
<b>Cotrimoxazol</b>	193 (89,8)	55 (96,5)	0,185
<b>Cefotaxima</b>	214 (99,5)	56(98,2)	0,376
<b>Imipenem</b>	215 (100)	57 (100)	-
<b>Total cepas</b>	215	57	

## 2. ESTUDIO PROSPECTIVO CASO-CASO

De los 272 casos de salmonelosis que tuvieron lugar durante el periodo de estudio, se excluyeron 19 (7%) por estar relacionados con brotes alimentarios causados todos por el serotipo Enteritidis. De 253 casos esporádicos que quedaron, 143 (56,5%) fueron incluidos en el estudio caso-caso: 67 (46,9%) originados por el serotipo 1,4,[5],12:i:- (grupo caso 1) y 76 (53,1%) por serotipos distintos a este (grupo caso 2). Los motivos por los que no se realizó la entrevista telefónica al resto de pacientes (110) fueron los siguientes: 2 (1,8%) por defunción del paciente, 5 (4,5%) por no poder entablar conversación debido a la barrera idiomática, 9 (8,2%) declinaron participar, 11 (10%) no tenían registrado su número de teléfono en el SIP, en 14 (12,7%) el teléfono que constaba era erróneo, 22 (20%) no respondieron al teléfono tras cuatro llamadas realizadas en distintas franjas horarias, y 47 (42,7%) quedaron excluidos por pasar un lapso de tiempo demasiado largo desde el diagnóstico. Las pérdidas de participación no se encontraron asociadas con el serotipo de *Salmonella* spp, no participaron el 42,7% de pacientes con S. 1,4,[5],12:i:- y el 44,1% con otros serotipos siendo esta diferencia no significativa ( $p=0.899$ ).

El promedio de días desde la recepción de la muestra de heces en el Servicio de Microbiología hasta la realización de la entrevista fue de 122,9 con una mediana de 98 y un rango entre 6 y 393 días. En el periodo pre-confinamiento el promedio fue de 72,4 días (rango entre 6 y 164) y en el post-confinamiento de 284,8 (rango entre 121 y 393).

### 2.1.- Características generales de los pacientes incluidos en el estudio caso-caso

De los 143 pacientes un 57,3% fueron hombres y un 42,7% mujeres. La edad media del total fue de 19,3 años con una mediana de 7 y un rango entre 0 y 89 años; y por sexos, la de los hombres fue 17,4 y la de las mujeres 21,9 años. El grupo de edad que acumuló más casos fue el de 0-4 años con un 31,5%, seguido del de 5-9 con un 28% (tabla 23). No hubo diferencia significativa en la comparación por edades entre hombres y mujeres ( $p=0,180$ ).

El 90,2% de los enfermos tenían nacionalidad española, y el 9,8% eran extranjeros. El país de origen de estos últimos fue: Rumanía (11/14, 78,6%), Francia (1/14, 7,1%), Venezuela (1/14, 7,1%) y Pakistán (1/14, 7,1%).

La manifestación clínica más frecuente fue la diarrea sin productos patológicos, la presentaron el 79,7% de los pacientes; seguida de fiebre (56%), dolor abdominal (25,9%), vómitos (23,8%), diarrea con productos patológicos (13,3%) y malestar general (4,2%). Hubo un 4,2% de asintomáticos.

Necesitaron ingreso hospitalario el 18,2% de los pacientes. La edad media de estos fue de 38,9 años, mientras que la de los que fueron atendidos ambulatoriamente fue de 14,9 años. En la tabla 23 se muestra la distribución de los ingresados por grupos de edad, siendo el de pacientes de 65 años o más el de mayor número de hospitalizados. El análisis estadístico mostró que la hospitalización aumenta de forma significativa con la edad ( $p=0,000$ ), pero no se encontraron diferencias con el sexo de los pacientes ( $p=0,828$ ).

**Tabla 23. Distribución de los pacientes por grupos de edad y hospitalización.**

Grupos edad	n total	%	n ingresados	%
0-4	45	31,5	3	6,7
5-9	40	28	4	10
10-14	12	8,4	3	25
15-24	7	4,9	1	14,3
25-34	7	4,9	2	28,6
35-44	6	4,2	0	0
45-54	6	4,2	2	33,3
55-64	8	5,6	3	37,5
>=65	12	8,4	8	66,7
<b>Total</b>	<b>143</b>	<b>100</b>	<b>26</b>	<b>18,2</b>

El 28,7% de los pacientes encuestados refirió presentar alguna enfermedad de base. Las dos patologías más frecuentemente encontradas fueron la Diabetes mellitus (5/143, 3,5%) y la epilepsia (5/143, 3,5%), y, por grupos, las enfermedades del aparato digestivo (9/143, 6,3%) seguidas de las enfermedades endocrinas (7/143, 4,9%) y de las enfermedades del sistema nervioso (5/143, 3,5%) (tabla 24). La relación estadística entre sufrir una enfermedad crónica y tener más edad resultó significativa ( $p=0,000$ ) y se

mantuvo cuando se estudió diferenciando por sexos ( $p=0,000$  tanto en hombres como en mujeres).

En los 143 pacientes se identificaron un total de 25 serotipos distintos, en 67 (46,9%) de los mismos se aisló S. 1,4,[5],12:i:- (grupo caso 1) y en 76 (46,85%) otros serotipos de *Salmonella* spp distintos de la variante monofásica (grupo caso 2). La distribución de los 24 serotipos de este segundo grupo y el porcentaje que representa cada uno puede observarse en la tabla 25. Los tres más frecuentes fueron: Enteritidis (35 casos), Montevideo (8) y Typhimurium (5). El resto estuvieron representados con 1 o 2 casos.

**Tabla 24. Enfermedades crónicas de los pacientes del estudio caso-caso**

Enfermedad crónica		Pacientes n (%)
No		102 (71,3)
Sí		41 (28,7)
<b>Clasificación:</b>		
Enfermedades del oído	Hipoacusia severa bilateral	1 (0,7)
Enfermedades Endocrinas	Diabetes mellitus	5 (3,5)
	Hipotiroidismo	2 (1,4)
Enfermedades del Sistema Nervioso	Epilepsia	5 (3,5)
Enfermedades del Aparato Circulatorio	Infarto Agudo de Miocardio	2 (1,4)
	Hipertensión Arterial	3 (2,1)
	Arritmia	1 (0,7)
Enfermedades del Aparato Respiratorio	Alergia	2 (1,4)
	Asma	3 (2,1)
Enfermedades del Aparato Digestivo	By-pass gástrico	1 (0,7)
	Colitis Ulcerosa	1 (0,7)
	Colon irritable	1 (0,7)
	Dispepsia	3 (2,1)
	Hernia de hiato	3 (2,1)
	Pancreatitis crónica	1 (0,7)
Enfermedades de la piel	Vitíligo	1 (0,7)
Enfermedades del Aparato Genitourinario	Transplantado renal	1 (0,7)
	Monorreno	1 (0,7)
Afecciones del Periodo Perinatal	Gran Prematuro	2 (1,4)
Malformaciones congénitas y anomalías cromosómicas	Comunicación Intraventricular	1 (0,7)
	Fenilcetonuria	1 (0,7)

**Tabla 25. Serotipos distintos de 1,4,[5],12:i:- aislados en los pacientes del estudio caso-caso**

Otros serotipos	n (%)
Agbeni	1 (1,3)
Albany	1 (1,3)
Blukwa	1 (1,3)
Bovismorbificans	2 (2,6)
Braenderup	1 (1,3)
Bredeney	1 (1,3)
Chester	1 (1,3)
Derby	1 (1,3)
Diarizonae	2 (2,6)
Enteritidis	35 (46,1)
Goldcoast	2 (2,6)
Houston	1 (1,3)
Infantis	2 (2,6)
Mikawasima	2 (2,6)
Montevideo	8 (10,5)
Muenchen	1 (1,3)
Newport	1 (1,3)
Poona	2 (2,6)
Rissen	2 (2,6)
Saintpaul	2 (2,6)
Stanley	1 (1,3)
Typhimurium	5 (6,6)
<i>Salmonella enterica subsp salamae</i> II	1 (1,3)
<i>Total</i>	76 (100)

## **2.2.- Comparación de las variables estudiadas entre el grupo caso 1 (S. 1,4,[5],12:i:-) y el grupo caso 2 (resto de serotipos).**

La edad media de los pacientes con infección por el serotipo 1,4,[5],12:i:- fue de 10,6 años con un rango entre 0 y 69, mientras que la de los infectados por otros serotipos fue de 26,9 años con un rango entre 0 y 89; encontrándose diferencia significativa por edades entre ambos grupos ( $p=0,000$ ).

El rango más afectado en el grupo caso 1 fue el de 0-4 años (43,3%), seguido por el de 5-9 años (35,8%); sólo el 20,9% de los pacientes tenía 10 años o más. En el conjunto de infectados por otros serotipos, las franjas de edad con más casos fueron también la de 0-4 y la de 5-9, ambas con un 21,1%, pero más de la

mitad del total de pacientes (57,9%) contaban con 10 años o más (tabla 26). Las diferencias encontradas en la distribución por edad en ambos grupos fueron significativas ( $p=0,002$ ).

De los 82 hombres incluidos en el estudio, 47,6% tuvieron salmonelosis debida al serotipo 1,4,[5],12:i:- y 52,4% a otros serotipos distintos; y en las 61 mujeres estos porcentajes fueron 45,9% y 54,1%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas por sexo ( $p=0,866$ ).

En la tabla 26 se muestra la comparación de las variables edad, sexo y nacionalidad entre los pacientes de ambos grupos. El grupo caso 1 abarcó al 28,6% de los extranjeros (4/14), todos de nacionalidad rumana, y al 48,8% de los españoles (63/129). El 71,4% de los extranjeros (10/14) se incluyó en el grupo caso 2 y sus países de origen fueron Francia (1), Pakistán (1), Rumanía (7) y Venezuela (1). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre nativos y extranjeros ( $p=0,170$ ).

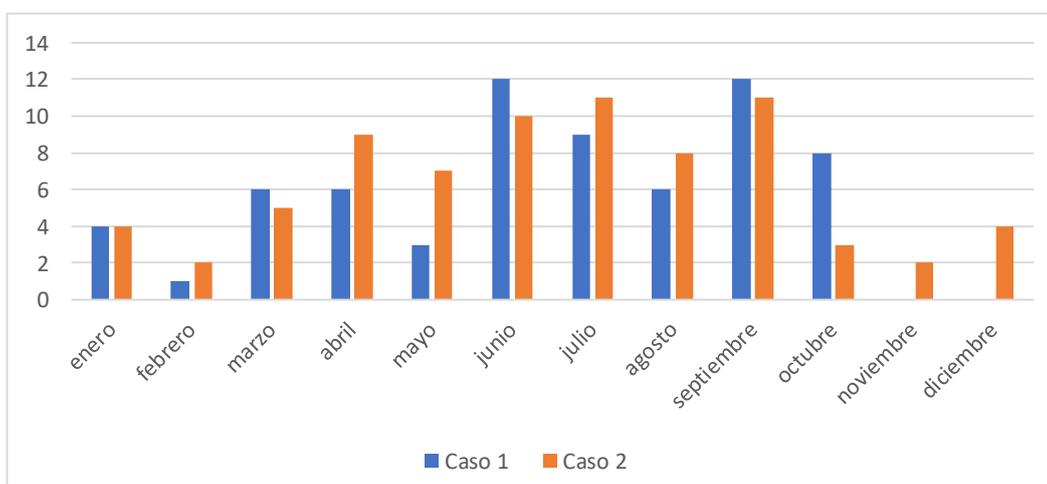
Los meses con más casos de salmonelosis por el serotipo monofásico fueron junio y septiembre con un 17,9% cada uno, mientras que en noviembre y diciembre no hubo ninguno. En cuanto a las infecciones por el resto de los serotipos los meses que acumularon más episodios fueron julio y septiembre con un 14,5% cada uno, y los que menos febrero y noviembre con un 2,6% cada uno (figura 6).

Las diferencias en la distribución por meses de los pacientes de ambos grupos no tuvieron significación estadística ( $p=0,488$ ). Sin embargo, al realizar la comparación de los casos de S.1,4,[5],12:i:- esperados en cada mes (5,6) con los realmente observados, se comprobó que en marzo (6), abril (6), junio (12), julio (9), agosto (6), septiembre (12) y octubre (8) hubo más casos de los supuestos, y que esta diferencia fue significativa para los meses de junio y septiembre (Chi cuadrado: 34,0 grados de libertad 11  $p=0,000$ ).

**Tabla 26. Características de los pacientes con infección esporádica por S. 1,4,[5],12:i:- y por otros serotipos**

Variables	S. 1,4,(5),12:i:- caso 1	Otros serotipos caso 2	p
	n=67	n=76	
	n (%)	n (%)	
<b>Media edad</b>	10,6	26,9	0,0001
<b>Mediana (rango)</b>	6 (0-69)	12,5 (0-89)	
<b>Sexo</b>			0,866
Hombre	39 (47,6)	43 (52,4)	
Mujer	28 (45,9)	33 (54,1)	
<b>Grupos de edad</b>			0,002
0-4	29 (43,3)	16 (21,1)	
5-9	24 (35,8)	16 (21,1)	
10-14	4 (6)	8 (10,5)	
15-24	1 (1,5)	6 (7,9)	
25-34	3 (4,5)	4 (5,3)	
35-44	1 (1,5)	5 (6,6)	
45-54	2 (3)	4 (5,3)	
55-64	1 (1,5)	7 (9,2)	
>=65	2 (3)	10 (13,2)	
<b>Nacionalidad</b>			0,170
Españoles	63 (48,8)	66 (51,2)	
Extranjeros	4 (28,6)	10 (71,4)	

**Figura 6. Distribución por meses de los grupos caso 1 y caso 2**



El 3% de los casos debidos al serotipo monofásico y el 5,3% de los causados por otros serotipos fueron asintomáticos ( $p=0,685$ ). Las manifestaciones clínicas de los pacientes de ambos grupos aparecen detalladas en la tabla 27, no se encontraron diferencias significativas. Todos los pacientes evolucionaron hacia la curación.

**Tabla 27. Comparación por grupos de las manifestaciones clínicas de los pacientes.**

Manifestaciones Clínicas	1,4,[5],12:i- n=65 n (%)	Otros serotipos n=72 n (%)	p	Total n=137 n (%)
Diarrea sin p.p.	52 (80)	62 (86,1)	0,339	114 (83,2)
Diarrea con p.p.	12 (18,5)	7 (9,7)	0,139	19 (13,9)
Dolor abdominal	19 (29,2)	18 (25)	0,578	37 (27)
Fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$	36 (55,4)	38 (52,8)	0,760	75 (54,7)
Malestar general	2 (3,1)	4 (5,6)	0,479	6 (4,4)
Vómitos	15 (23,1)	19 (26,4)	0,654	34 (24,8)

p.p.=productos patológicos

El 23,1% de los pacientes con salmonelosis por la variante monofásica presentaron diarrea sin productos patológicos como única manifestación clínica (tabla 28), mientras que lo más frecuente en el grupo caso 2 fue la combinación de diarrea sin productos patológicos y fiebre (22,2%). Todos los casos debidos a serotipos distintos del 1,4,[5],12:i- con productos patológicos en las heces se presentaron sin otros síntomas/signos acompañantes; en cambio, sólo un paciente del grupo caso 1 padeció esta manifestación clínica de forma aislada ( $p=0,041$ ). La combinación de diarrea con productos patológicos y fiebre estuvo significativamente asociada a los pacientes con la variante monofásica ( $p=0,010$ ). En el grupo caso 2 los serotipos de *Salmonella* spp que causaron diarrea con sangre, moco o pus fueron los siguientes: Enteritidis (3), Albany (1), Bovismorbificans (1), Montevideo (1) y Typhimurium (1).

Al estudiar ambos grupos de pacientes en cuanto a si precisaron hospitalización o no, se encontró que el 51,3% (60/117) de los casos que se manejaron ambulatoriamente y el 26,9% (7/26) de los enfermos hospitalizados estaban incluidos en el grupo del serotipo monofásico. Los ingresos

hospitalarios en estos pacientes (caso 1) fueron significativamente más bajos que en los enfermos con infección por otros serotipos de salmonela (caso 2) ( $p=0,030$ ). No se encontró diferencia de hospitalización por sexo y grupo ( $p=0,827$ ).

**Tabla 28. Distribución de los pacientes de los dos grupos según perfiles de manifestaciones clínicas**

Perfiles manifestaciones clínicas	1,4,[5],12:i:- n=65 n (%)	Otros n=72 n (%)	p
diarrea sin p.p.	15 (23,1)	11 (15,3)	0,245
diarrea con p.p.	1 (1,5)	7 (9,1)	<b>0,041</b>
diarrea sin p.p.+dolor abdominal	7 (10,8)	6 (8,3)	0,627
diarrea con p.p.+dolor abdominal	2 (3,1)	0	0,223
diarrea sin p.p.+dolor abdominal+fiebre	5 (7,7)	7 (9,7)	0,675
diarrea con p.p.+dolor abdominal+fiebre	1 (1,5)	0	0,474
diarrea+dolor abdominal+vómitos	0	1 (1,4)	1,000
diarrea sin p.p.+dolor abdominal+fiebre+vómitos	2 (3,1)	1 (1,4)	0,604
diarrea con p.p.+dolor abdominal+fiebre+vómitos	1 (1,5)	0	0,474
diarrea sin p.p.+fiebre	10 (15,4)	16 (22,2)	0,308
diarrea con p.p.+fiebre	6 (9,2)	0	<b>0,010</b>
Diarrea sin p.p.+fiebre+malestar general	1 (1,5)	1 (1,4)	1,000
diarrea sin p.p.+fiebre+vómitos	9 (13,9)	12 (16,7)	0,813
diarrea con p.p.+fiebre+vómitos	1 (1,5)	0	0,474
diarrea sin p.p. +fiebre+vómitos+malestar general	0	1 (1,4)	1,000
diarrea sin p.p.+malestar general	1 (1,5)	2 (2,8)	1,000
diarrea+vómitos	2 (3,1)	4 (5,6)	0,683
dolor abdominal	1 (1,5)	3 (4,2)	0,621

p.p.=productos patológicos

La tabla 29 muestra los pacientes con ingreso hospitalario de cada grupo por franjas de edad y el porcentaje que estos representan respecto al total de casos de cada franja. La hospitalización aumentó con la edad de forma significativa tanto en el grupo de infecciones por S. 1,4,[5],12:i:- ( $p=0,000$ ) como en las causadas por otros serotipos ( $p=0,015$ ). Por sexo, la media de edad de los hombres, tanto ambulatorios como hospitalizados, del grupo caso 1 fue mayor que la de las mujeres de este grupo (9 y 36,7 años frente a 7 y 26 años,

respectivamente). En los pacientes del grupo caso 2 pasó al contrario, la edad media de los hombres con/sin hospitalización fue menor (15,5 y 40,1 años frente a 25,7 y 60,2).

**Tabla 29. Pacientes hospitalizados por grupo y franja de edad.**

Grupos edad hospitalizados	S. 1,4,[5],12:i:n (%)	Otros serotipos n (%)
0-4	0	3 (18,8)
5-9	2 (8,3)	2 (12,5)
10-14	0	3 (37,5)
15-24	1 (100)	0
25-34	2 (66,7)	0
35-44	0	0
45-54	0	2 (50)
55-64	1 (100)	2 (28,6)
>=65	1 (50)	7 (70)
Total pacientes	7 (10,4%)	19 (25%)

Con respecto al padecimiento de patologías de base, el 48% de los pacientes sin enfermedad crónica y el 43,9% de los que referían antecedentes patológicos pertenecieron al grupo caso 1. No hubo diferencia significativa entre los dos grupos en cuanto a la enfermedad crónica ( $p=0,413$ ). La media de edad de los pacientes del grupo caso 1 con alguna patología de base fue de 21,2 (mediana: 8, rango:1-65), mientras que en el grupo caso 2 fue de 54,5 años (mediana: 57, rango:13-89). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0,000$ ).

Cuando se analizó la influencia que los antecedentes patológicos tuvieron en la gravedad de la infección, se encontró que sólo el 2% de los pacientes sin enfermedad de base del grupo caso 1 y el 7,8% de los del grupo caso 2 fueron hospitalizados. Estos porcentajes aumentaron a 12,2% y 26,8%, respectivamente, en los que tenían algún padecimiento crónico (tabla 30).

**Tabla 30. Características de los pacientes de cada grupo según tratamiento ambulatorio u hospitalario.**

Variables	1,4,[5],12:i:-		Otros serotipos	
	Ambulatorios n=60 n (%)	Hospitalizados n=7 n (%)	Ambulatorios n=57 n (%)	Hospitalizados n=19 n (%)
<b>Media edad</b>	8,2	30,6	20,1	46,8
<b>Sexo:</b>				
H	36 (43,9)	3 (3,7)	31 (37,8)	12 (14,6)
M	24 (39,3)	4 (6,6)	26 (42,6)	7 (11,3)
<b>Antecedentes patológicos:</b>				
No	47 (46,1)	2 (2)	45 (44,1)	8 (7,8)
Sí	13 (31,7)	5 (12,2)	12 (29,3)	11 (26,8)
<b>Tipo de patología:</b>				
Alergia	1 (50)		1 (50)	
Arritmia			1 (100)	
Asma	3 (100)			
By-pass gástrico				1 (100)
Colitis ulcerosa				1 (100)
Colon irritable			1 (100)	
Comunicación intraventricular		1 (100)		
Diabetes mellitus		1 (20)	1 (20)	3 (60)
Dispepsia	1 (33,3)		2 (66,7)	
Epilepsia	2 (40)	1 (20)	2 (40)	
Fenilcetonuria	1 (100)			
Gran prematuro	2 (100)			
Hernia hiato			2 (66,7)	1 (33,3)
Hipertensión Arterial	1 (33,3)	1 (33,3)		1 (33,3)
Hipoacusia severa bilateral		1 (100)		
Hipotiroidismo	1 (50)			1 (50)
Infarto Agudo de Miocardio			1 (50)	1 (50)
Monorreno	1 (100)			
Pancreatitis crónica				1 (100)
Transplantado renal				1 (100)
Vitíligo			1 (100)	

## 2.3.- Análisis univariante de los factores de riesgo de infección por S. 1,4,[5],12:i:-

La tabla 31 muestra la comparación entre los dos grupos de estudio, mediante análisis univariante de regresión logística, de los siguientes potenciales factores de riesgo de salmonelosis: contacto con pacientes con diarrea, tener una mascota o estar relacionado con animales, el uso reciente de antibióticos, antecedentes de realización de un viaje y jugar con tierra o realizar trabajos de jardinería.

**Tabla 31. Comparación de factores de riesgo entre los casos de los dos grupos.**

Variables	S. 1,4,(5),12:i:- n=67 (%)	Otros serotipos n=76 (%)	OR (95% IC)	p
<b>Contacto pacientes con diarrea</b>			2,2 (0,62-8,80)	0,259
No	58 (45)	71 (55)		
Sí	9 (64,3)	5 (35,7)		
<b>Animales domésticos</b>			0,84 (0,12-5,20)	0,868
No	34 (47,9)	37 (47,9)		
Sí	33 (45,8)	39 (54,2)		
<b>Tipo de animal:</b>				
caballos	0	2 (100)		
cabras	0	1 (100)		
cerdos	0	2 (100)		
conejos	0	1 (100)		
gallinas	2 (33,3)	4 (66,7)		
gatos	9 (42,9)	12 (57,1)	0,84 (0,30-2,36)	0,815
ovejas	0	2 (100)		
pájaros	4 (50)	4 (50)		
peces	0	3 (100)		
perros	28 (52,8)	25 (47,2)	1,02 (0,49-2,13)	1,000
roedores	3 (60)	2 (40)		
tortugas	5 (83,3)	1 (16,7)		
<b>Antibióticos 15 días antes</b>			0,84 (0,12-5,20)	1,000
No	64 (47,1)	72 (52,9)		
Sí	3 (42,9)	4 (57,1)		
<b>Viajes</b>			1,15 (0,29-4,53)	1,000
No	61 (46,6)	70 (53,4)		
Sí	6 (50)	6 (50)		
<b>Contacto con tierra (juegos/jardinería)</b>			1,67 (0,67-4,24)	0,291
No	51 (44,3)	64 (55,7)		
Sí	16 (57,1)	12 (42,9)		

No se encontró asociación significativa con ninguno de los factores, aunque el contacto de los pacientes con otros casos de diarrea tuvo un OR elevado.

La tabla 32 detalla la comparación mediante análisis univariante de regresión logística del consumo de alimentos procedentes del cerdo y huevo y sus derivados entre los pacientes con salmonelosis causadas por la variante monofásica y las originados por el resto de los serotipos.

**Tabla 32. Comparación del consumo de alimentos en los 15 días previos entre los casos de los dos grupos a estudio.**

Variables	S. 1,4,(5),12:i- n=67 (%)	Otros serotipos n=76 (%)	OR 95% IC	p
<b>Consumo de productos porcinos (1 vez/semana o más)</b>				
<b>Curados crudos:</b>	54 (54)	46 (46)	<b>2,71 (1,20-6,32)</b>	<b>0,011</b>
<i>Jamón Serrano</i>	31 (46,3)	36 (53,7)	0,96 (0,47-1,95)	1,000
<i>Panceta</i>	2 (40)	3 (60)	0,75 (0,06-6,76)	1,000
<i>Longaniza seca</i>	30 (76,9)	9 (23,1)	<b>6,03 (2,44-15,87)</b>	<b>0,000</b>
<i>Fuet</i>	22 (64,7)	12 (35,3)	<b>2,61 (1,10-6,37)</b>	<b>0,019</b>
<i>Salchichón</i>	23 (57,5)	17 (42,5)	1,81 (0,81-4,07)	0,136
<i>Lomo embuchado</i>	4 (57,1)	3 (42,9)	1,54 (0,25-10,91)	0,706
<i>Sobrasada</i>	6 (60)	4 (40)	1,77 (0,40-8,90)	0,516
<b>Cocidos crudos:</b>	47 (51,7)	44 (48,3)	1,71 (0,81-3,64)	0,164
<i>Jamón de York</i>	43 (51,2)	41 (48,8)	1,53 (0,74-3,17)	0,237
<i>Mortadela/Catalana</i>	47 (50)	47 (50)	2,2 (0,64-8,66)	0,187
<i>Cabeza de jabalí</i>	0	0		
<i>Salchichas Frankfurt</i>	13 (65)	7 (35)	2,37 (0,81-7,49)	0,094
<i>Paté</i>	6 (66,7)	3 (33,3)	2,39 (0,48-15,31)	0,305
<b>Fritos/cocidos:</b>	42 (50,6)	41 (49,4)	1,43 (0,70-2,96)	0,313
<i>Salchicha fresca/longaniza</i>	36 (55,4)	29 (44,6)	1,88 (0,92-3,87)	0,067
<i>Morcilla fresca</i>	4 (80)	1 (20)	4,76 (0,45-237,54)	0,186
<i>Butifarra</i>	3 (60)	2 (40)	1,73 (0,19-21,29)	0,665
<i>Costilla</i>	9 (64,3)	5 (35,7)	2,2 (0,62-8,80)	0,259
<i>Lomo</i>	5 (83,3)	1 (16,7)	1,28 (0,59-2,79)	0,584
<b>Consumo de huevos de gallina y derivados (1 vez/semana o más)</b>				
<b>Mayonesa</b>	2 (50)	2 (50)	1,14 (0,08-16,10)	1,000
<b>Tortilla</b>	55 (46,6)	63 (53,4)	0,94 (0,36-2,48)	1,000
<b>Huevo crudo</b>	0	8 (100)	<b>0,09 (0-0,63)</b>	<b>0,007</b>
<b>Huevo frito</b>	18 (41,9)	25 (58,1)	0,75 (0,34-1,64)	0,469

Se comprobó que el consumo de alimentos porcinos curados crudos (se sumaron: jamón serrano, panceta, longaniza seca, fuet, salchichón, lomo embuchado y sobrasada) se asoció significativamente con la infección por S. 1,4,[5],12:i:- (OR=2,71, 95% IC 1,20-6,32), y dentro de estos productos en concreto con la longaniza seca (OR=6,04, 95% 4,44-15,87) y el fuet (OR=2,61, 95% IC 0,81-4,07). El OR de la longaniza seca indicó que su consumo implica un riesgo muy alto de adquirir salmonelosis debida a este serotipo. Aunque no se observó asociación estadísticamente significativa con el consumo del resto de alimentos estudiados, el OR de la ingesta de mortadela, salchichas Frankfurt, paté, morcilla fresca y costilla fue mayor de 2, lo que parece indicativo de cierto riesgo. En el caso del huevo crudo, su consumo se asoció significativamente de forma negativa con la infección por S. 1,4,[5],12:i:- (OR=0,09, 95% IC 0,00-0,63).

A partir de la información de consumo semanal obtenida de las encuestas, se empleó la prueba de tendencia Z con la que se comprobó que, a mayor frecuencia de ingesta de longaniza seca y fuet, los dos alimentos porcinos con asociaciones significativas, mayor era la posibilidad de sufrir infección por la variante monofásica (longaniza seca: Z=4,32 p=0,000; fuet Z=3,08 p=0,002).

Con el fin de comprobar si la asociación significativa con los dos productos porcinos estaba relacionada con la edad, se realizó un análisis univariante separando los pacientes en dos grupos, por un lado, los de entre 0 y 9 años, y por otro los de 10 años o más. En el primer grupo aumentó la asociación tanto para el conjunto de alimentos curados-crudos (OR=3,79, 95% IC 1,42-10,03, p=0,008) como para la longaniza seca (OR=10,04, 95% IC 2,72-37,02, p=0,001), pero no para el fuet (OR=2,05, 95% IC 0,71-5,90, p=0,185) que perdió la significación. En los mayores de 9 años la significación no se mantuvo para ninguno de los dos (curados-crudos OR=1,90, 95% IC 0,46-7,85, p=0,377; longaniza seca OR=1,72, 95% IC 0,37-8,06, p=0,487; fuet OR=3,51, 95% IC 0,88-14,15, p=0,076)

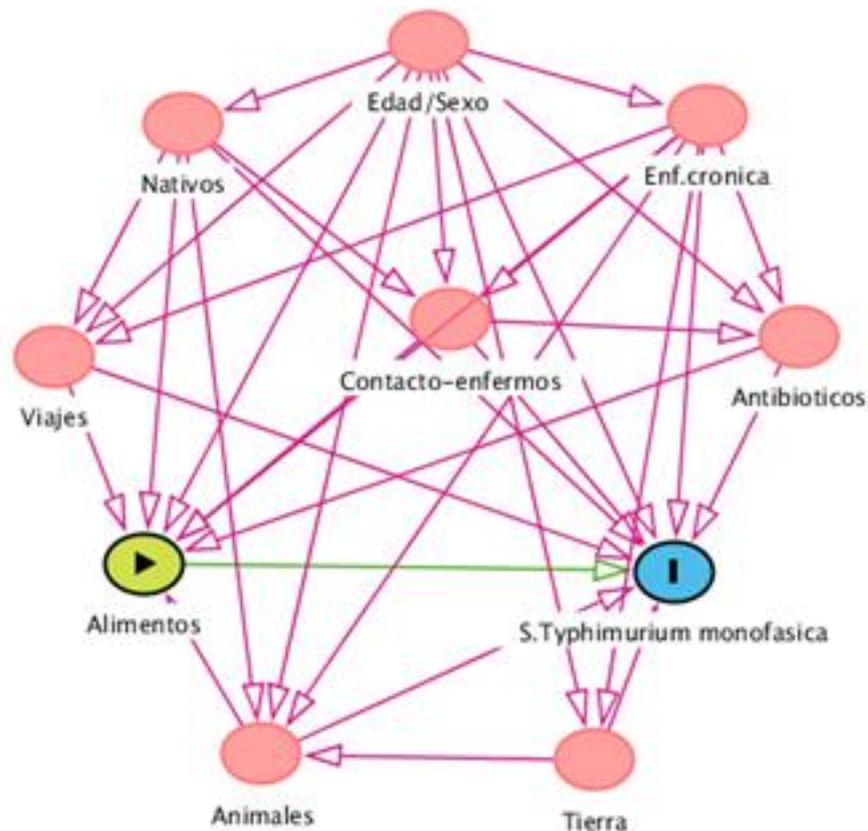
Por último, dado que el tamaño final de la muestra estudiada fue menor que el estimado en un principio para poder obtener asociaciones con una potencia del 80% (muestra estudio: 143, muestra estimada: 214), se calculó la potencia

estadística real de las asociaciones significativas que se encontraron con los alimentos porcinos. De esta manera para el conjunto de curados-crudos fue de 70,5%, para la longaniza seca de 99,36% y para el fuet de 66,6%.

## 2.4.- Análisis multivariante de los factores de riesgo de infección por S. 1,4,[5],12:i:-

Se estudiaron las variables con significación estadística en el análisis univariante. Se utilizó el programa DaGitty 3.0 para determinar los factores de confusión a controlar mediante ajuste en el análisis multivariante, cuyo resultado se muestra en la figura 7.

Figura 7. Diagrama explicativo de la relación causa-efecto entre el consumo de alimentos (productos porcinos) y el efecto (infección por S. 1,4,[5],12:i:-), ajustado por factores de confusión



Tras ajustar por los factores de confusión edad, sexo, nacionalidad, padecimiento de enfermedad crónica, contacto con pacientes con diarrea, relación con animales, consumo de antibióticos, viajes y contacto con tierra, se mantuvo la asociación estadística entre el consumo de productos porcinos curados-crudos (OR=3,65, 95% IC 1,56-8,53, p=0,003), el consumo de longaniza seca (OR=7,87, 95% IC 2,88-21,52, p=0,000).y el consumo de fuet (OR=2,65, 95% IC 1,09-6,42, p=0,031) con padecer salmonelosis por S. 1,4,[5],12:i:- (tabla 33).

**Tabla 33. Análisis multivariante de consumo de determinados productos porcinos como factores de riesgo de infección por S. 1,4,[5],12:i:- (ajustado por edad, sexo, enfermedad crónica, contacto con pacientes con diarrea, animales, consumo de antibióticos, viajes y contacto con tierra)**

<b>Variables</b>	<b>OR 95% IC</b>	<b>p</b>
<b>Curados crudos:</b>	<b>3,65 (1,56-8,53)</b>	<b>0,003</b>
<i>Longaniza seca</i>	<b>7,87 (2,88-21,52)</b>	<b>0,000</b>
<i>Fuet</i>	<b>2,65 (1,09-6,42)</b>	<b>0,031</b>
<i>Salchichón</i>	1,58 (0,70-3,58)	0,269
<b>Cocidos crudos:</b>	1,63 (0,75-3,53)	0,217
<i>Jamón de York</i>	1,49 (0,70-3,16)	0,301
<i>Salchichas Frankfurt</i>	1,72 (0,59-5,01)	0,317
<b>Fritos/cocidos:</b>	1,43 (0,70-2,96)	0,313
<i>Salchicha fresca/longaniza</i>	1,44 (0,68-3,07)	0,345
<i>Morcilla fresca</i>	5,42 (0,52-56,65)	0,158

### 3.- ESTUDIO EXPERIMENTAL

Se recogieron y conservaron criopreservadas a -80°C 271 cepas de *Salmonella enterica* subsp *enterica*, de las cuales tres (una serotipo Hadar y dos 1,4,[5],12:i:) no se recuperaron al cultivarse de nuevo en medio sólido poder ser analizadas mediante espectrometría de masas. El algoritmo de Dieckmann y Malorny que posibilita distinguir los serotipos Enteritidis, Typhimurium/1,4,[5],12:i:-, Virchow, Infantis y Hadar se realizó utilizando el espectrómetro MALDI Biotyper de Bruker. Para validar la aproximación diagnóstica de estos autores con nuestro espectrómetro de masas VITEK® MS de bioMérieux dispusimos de 123 cepas

de *S. Typhimurium*/1,4,[5],12:i:-, 79 cepas de *S. Enteritidis*, 3 cepas de *S. Infantis*, ninguna cepa de *S. Virchow* y *S. Hadar*, y 63 cepas de otros serotipos (ver tabla 11).

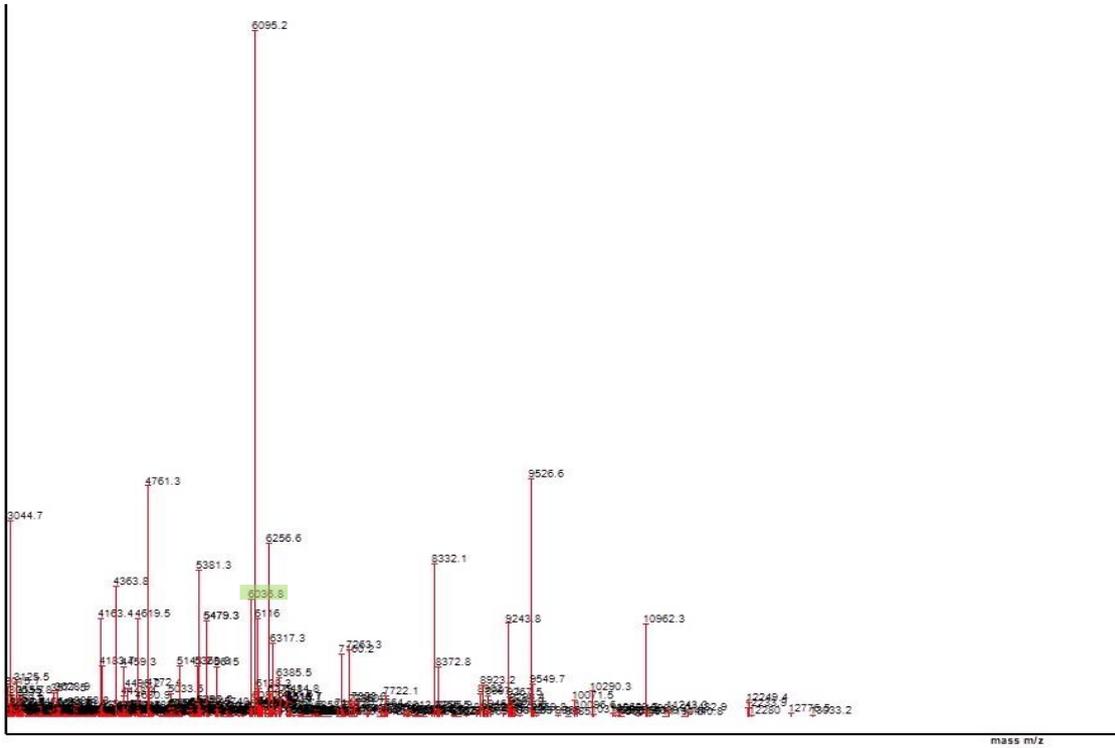
En primer lugar, analizamos los espectros generados a partir de las cepas de *Enteritidis*, *Typhimurium*/1,4,[5],12:i:- e *Infantis* mediante RUO SARAMIS® buscando la presencia/ausencia de los picos biomarcadores discriminatorios propuestos para estos serotipos, encontrando las diferencias descritas en la tabla 34.

La masa del pico principal de los aislamientos de *Enteritidis* en Vitek® MS fue de 6036,8 Daltons en lugar de 6036, y en el caso de *Typhimurium*/1,4,[5],12:i:- de 7098,5 Daltons en lugar de 7097 (figuras 8 y 9). No encontramos ninguno de los picos accesorios de *Typhimurium*/1,4,[5],12:i:- descritos por Dieckmann y Malorny, lo que imposibilitaría diferenciar estos serotipos de *Virchow* (ver tabla 6). Sí se mantuvo la ausencia de los picos de 6009 y 7111 Daltons en los espectros de *Enteritidis* y *Typhimurium*/1,4,[5],12:i:-, respectivamente. En cuanto a *Infantis*, la muestra (n=3) fue demasiado pequeña para obtener conclusiones válidas; la masa del pico principal fue de 18636,5 Daltons en lugar de 18635 y no encontramos ninguno de los picos accesorios ni los que debían estar ausentes (18644 y 18655 Daltons).

**Tabla 34. Diferencias entre los biomarcadores propuestos por Dieckmann y Malorny<sup>282</sup> y los encontrados con VITEK® MS**

Serotipos	Biomarcadores				
	Presencia				Ausencia
	Principal		Accesorios		
Biotyper	VITEK MS	Biotyper	VITEK MS	Biotyper/VITEK MS	
<i>Enteritidis</i>	6036	6036,8	-	-	6.009
<i>Typhimurium</i> /1,4,[5],12:i:-	7097	7098,5	8.686,10.067, 22.949	-	7.111
<i>Infantis</i>	18635	18636,5	6.512, 8.699,9.374	-	18.644, 18.655

**Figura.8. Espectro obtenido con VITEK® MS correspondiente a *S. Enteritidis* (biomarcador principal resaltado)**



Aplicamos el algoritmo con las modificaciones descritas para categorizar los 268 espectros obtenidos de las 268 cepas en Enteritidis/Otros serotipos y Typhimurium/1,4,[5],12:i-/Otros serotipos, comparando así la espectrometría de masas con los resultados de la serotipificación tradicional (tablas 35 y 36).

**Tabla 35. Comparación de los resultados de identificación del serotipo Typhimurium/1,4,[5],12:i- mediante espectrometría de masas con los obtenidos con la serotipificación tradicional**

Espectrometría de masas	Serotipificación		Totales
	Typhimurium/1,4,[5],12:i-	Otros serotipos	
Typhimurium/1,4,[5],12:i- +	121	0	121
Typhimurium/1,4,[5],12:i- -	2	145	147
<b>Totales</b>	123	145	268

**Tabla 36. Comparación de los resultados de identificación del serotipo Enteritidis mediante espectrometría de masas con los obtenidos con la serotipificación tradicional**

Espectrometría de masas	Serotipificación		Totales
	Enteritidis	Otros serotipos	
Enteritidis+	79	0	79
Enteritidis-	0	189	189
<b>Totales</b>	79	189	268

La Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) del espectrómetro de masas VITEK® MS para identificar los serotipos Typhimurium/1,4,[5],12:i- fueron 98,4%, 100%, 100% y 98,6%, respectivamente. Y en cuanto al serotipo Enteritidis, los valores de S, E, VPP y VPN resultaron todos del 100%. Las pruebas exactas de Fisher para Typhimurium/1,4,[5],12:i- y para Enteritidis fueron muy significativas ( $p=0.000$ ), indicando la validez de los resultados.

# DISCUSIÓN

## 1.-ESTUDIO GENERAL DESCRIPTIVO

Pensamos que este estudio constituye una buena aproximación a la situación epidemiológica real de la salmonelosis en la población de nuestro Departamento. Se muestra la distribución de todos los serotipos de *Salmonella* spp y el nivel de resistencia de los aislamientos clínicos en nuestra región, información que resulta indispensable como paso previo para lograr el control de esta infección.

Un valor añadido de la parte descriptiva de este trabajo es la comparación de las variables sociodemográficas, clínicas y microbiológicas analizadas entre el periodo antes del inicio del confinamiento decretado por la pandemia de COVID-19 y el de después de esta fecha. El colapso que sufrió el Sistema Sanitario dificultó sobremanera el diagnóstico de cualquier infección no grave que no estuviese causada por el SARS-CoV-2, pero también proporcionó la oportunidad de estudiar cómo las circunstancias excepcionales que rodearon la pandemia pudieron afectar a la epidemiología de una enfermedad infecciosa que ya era endémica en nuestra población.

Aunque *Salmonella* spp es la segunda etiología más frecuente de los casos de gastroenteritis declarados en nuestro país, son pocos los estudios epidemiológicos actualizados sobre salmonelosis<sup>283,284,285</sup>. Los últimos datos que analiza la RENAVE acerca de las Enfermedades Transmisibles, entre las que se incluyen las vehiculizadas por alimentos y agua, corresponde a los años 2017-2018<sup>75</sup>; y la publicación más reciente con la distribución de los serotipos de las cepas de *Salmonella* humana aisladas en España a partir de la información recogida por la Sección de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología se remonta al 2005<sup>57</sup>.

A pesar de que desde el año 2015, de acuerdo con la última revisión del Real Decreto 2210/1995, la salmonelosis en humanos es considerada una enfermedad de notificación obligatoria sigue siendo difícil disponer de toda la información microbiológica de los casos. Tanto es así que en el mencionado informe de la RENAVE los serotipos están diferenciados solo en Enteritidis,

Typhimurium y otros; y tampoco aportan más datos la mayoría de los trabajos publicados<sup>283,284,285</sup>.

No abundan los laboratorios clínicos que dispongan de la serotipificación completa de sus cepas de *Salmonella*<sup>63,286,287,288</sup> debido a la dificultad que supone realizar esta técnica de rutina y a que, aunque existe la posibilidad de remitir los aislamientos al Centro Nacional de Microbiología, esto implica una carga de trabajo adicional que no siempre es asumible.

El Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón lleva a cabo el envío sistemático de una cepa de cada episodio de salmonelosis al Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* para su serotipificación. Disponer de esta información permitió detectar la emergencia de S. 1,4,[5],12:i:- y el desplazamiento del serotipo Typhimurium, hechos que motivaron el planteamiento de este trabajo.

Si nos centramos en las características de los pacientes, la distribución por sexo fue idéntica a la encontrada en nuestro departamento en el periodo 2000-2006<sup>63</sup>, y muy similar a la que muestra el último informe de la RENAVE<sup>75</sup> en el que la frecuencia en hombres es levemente superior a la de las mujeres. La edad media de nuestros enfermos es prácticamente la misma que la encontrada en el trabajo de Cores-Calvo et al<sup>283</sup>, sin embargo, ésta ha aumentado de 14,4 a 21,8 años cuando la comparamos con nuestra publicación anterior<sup>63</sup>.

El grupo de niños entre 0-4 años concentra el mayor número de casos, al igual que describen en España Cores-Calvo et al<sup>283</sup> y Sala-Farré MR et al<sup>284</sup>, y en Estados Unidos Olsen SJ et al<sup>71</sup> y Li X et al<sup>289</sup>. A pesar de que este grupo es el más perjudicado, el porcentaje que representa (32%) ha disminuido desde nuestra revisión de 2000-2006<sup>63</sup> (49,5%). En la literatura consultada los niños menores de 5 años aparecen habitualmente como el grupo más afectado por esta infección y entre las posibles causas se incluyen su menor masa corporal y la inmadurez de su sistema inmunitario; sin embargo, también se ha planteado que exista un sesgo en el diagnóstico porque sea el grupo de edad en el que más se trate de identificar el agente causal de las gastroenteritis<sup>75</sup>. La

proporción de la población pediátrica de nuestro estudio (59,6%) es mayor que la comunicada por Moreno-Flores et al en Pontevedra (45,9%)<sup>285</sup>.

El 48,9% de los pacientes acceden a la atención sanitaria a través del servicio de Urgencias, siendo este porcentaje prácticamente el mismo en los periodos pre y postpandemia, sin embargo, sólo el 14,3% del total de casos necesitan ingreso hospitalario. Estos datos podrían sugerir que los pacientes perciben su proceso como grave, o que conseguir una cita en atención primaria en el momento de la infección aguda no es fácil, o que los pacientes tienen la impresión de que serán mejor atendidos en las Urgencias de un Hospital, aunque los síntomas/signos que presenten no sean de relevancia. En cuanto a las hospitalizaciones, Sala-Farré et al<sup>284</sup> comunican un porcentaje muy similar al nuestro (15%) y Cores-Calvo et al<sup>283</sup> mayor (23,6%). A nivel europeo, resulta muy llamativo que en el último informe de la EFSA de 2019<sup>1</sup> la media de casos hospitalizados notificados por los estados miembros sea del 42,5%. Seguramente esta cifra es una señal de la gran variabilidad de los sistemas nacionales de vigilancia que en muchos países europeos todavía se centran solo en los casos más graves.

Bien es sabido que los pacientes con salmonelosis que presentan mayor riesgo de complicaciones y que, supuestamente, van a acumular un mayor número de ingresos hospitalarios, son los lactantes y los ancianos<sup>68</sup>. En nuestra serie, el grupo con mayor proporción de hospitalizaciones es el de 55-64 años (62,5%), seguido del de  $\geq 65$  años (48,3%); mientras que los niños pequeños de 0-4 años presentan uno de los porcentajes más bajos (5,7%). El análisis estadístico confirma que los pacientes de mayor edad tienen más riesgo de ser hospitalizados tras adquirir una infección gastrointestinal por *Salmonella* ( $p=0,000$ ), y también los hombres ( $p=0,006$ ), aunque no se ha encontrado en la literatura médica ninguna referencia respecto al mayor riesgo de desarrollar salmonelosis grave en los hombres respecto a las mujeres.

Con relación a la estacionalidad, entre finales de primavera y principios de otoño hay significativamente más casos que el resto del año ( $p=0,011$ ), al igual que en el estudio de Li X et al en Florida<sup>289</sup>, región que tiene una climatología

similar a la nuestra. Tanto en el informe anual de Vigilancia de *Salmonella* del año 2017 de los CDC como en el de la EFSA de 2017-2018 se indica que el mayor porcentaje de casos de salmonelosis tiene lugar en los meses de verano<sup>1,188</sup>.

Por otro lado, y del mismo modo que en un estudio epidemiológico de salmonelosis realizado durante los años 2005 a 2014 en Salamanca<sup>283</sup> y también en el informe más reciente de la RENAVE<sup>75</sup>, apreciamos una tendencia a la disminución de episodios de salmonelosis a lo largo del tiempo, aunque este descenso no alcanza significación.

Cuando se analizan los serotipos circulantes en una región o un país y se comparan con los encontrados en otras zonas del mundo se toma conciencia de la complejidad de la infección que nos ocupa, de la influencia que tienen las costumbres culturales, las prácticas de producción alimentaria y la localización geográfica<sup>80</sup>. En el periodo 2000-2006 en nuestro departamento el 50% de los casos de salmonelosis se debían al serotipo Enteritidis y el 28,4% a Typhimurium, mientras que el serotipo 1,4,(5),12:i:- era muy minoritario y suponía el 2,33%<sup>63</sup>. Sólo 10 años más tarde, en 2016 y 2017, el serotipo monofásico ya es el más prevalente representando nada menos que el 62,6% y el 66,6% del total de casos respectivamente (datos no publicados). Aunque el hecho de que recientemente se haya producido una emergencia del serotipo monofásico no es novedoso, la magnitud que ha alcanzado en nuestra región sí que lo es y no tiene precedentes en la literatura científica consultada. En el periodo de este estudio el serotipo más frecuente es 1,4,(5),12:i:- con un 43%, seguido de Enteritidis, 29%, Montevideo, 7,4% y Typhimurium, con sólo un 3,7%. En España, tanto en el informe de la RENAVE más actual<sup>75</sup> como en los últimos estudios publicados<sup>283,285</sup> sólo tenemos datos acerca de que la incidencia de Typhimurium es mayor que la de Enteritidis pero no se diferencia la variante monofásica. En la Unión Europea los serotipos más frecuentes por orden decreciente son Enteritidis, Typhimurium, 1,4,[5],12:i-, Infantis y Newport<sup>1</sup>, y en los Estados Unidos, Enteritidis, Newport, Typhimurium, Javiana y 1,4,[5],12:i:-<sup>188</sup>, en ambos casos se documenta que la incidencia del serotipo Typhimurium está disminuyendo mientras la de 1,4,[5],12:i:- va en aumento. En un trabajo del

Noreste de Italia los dos serotipos más prevalentes son el monofásico y Typhimurium con un 29,5% y un 26,5% respectivamente<sup>290</sup>; y Hauser et al<sup>200</sup> en Alemania describen el aumento del número de cepas del serotipo 1,4,[5],12:i:- del 0,1% en 1999 al 14,0% en 2008. Por último, en una serie de diez años de Florida (2009-2018)<sup>289</sup> los serotipos más frecuentes son Enteritidis, Javiana, Newport, Sandiego y Braenderup, mientras que el 1,4,[5],12:i:- ocupa la dieciseisava posición.

Los sistemas de notificación de los distintos países europeos no son homogéneos y en algunos casos son de cumplimiento voluntario<sup>1</sup>. Pensamos que esto tiene mucha influencia en los datos presentados por la EFSA y seguramente también por el resto de las organizaciones, por lo que hay que manejar la información que proporcionan con alguna reserva. Por ejemplo, es curioso que tras la implementación de programas de control de *Salmonella* en aves de corral, huevos y ovoproductos por parte de los Estados miembros para cumplir con el Reglamento (CE) N° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, en España se haya producido el reemplazo de *S. Enteritidis* por *S. Typhimurium*<sup>75</sup>, pero no a nivel del conjunto de Europa<sup>1</sup>. Enteritidis es el serotipo más asociado con el consumo de huevos y carne de ave de corral contaminadas, por lo que las citadas medidas de control deberían ser más efectivas frente a Enteritidis<sup>284</sup> que frente a cualquier otro serotipo.

Pensamos que el elevado número de casos originados por *S. 1,4,[5],12:i:-* en nuestra región con respecto al resto de series consultadas podría deberse, entre otras razones, a la infradeclaración de este serotipo en otras zonas por considerarlo erróneamente como Typhimurium y a que el consumo de productos porcinos es muy elevado en nuestro entorno. No olvidemos que España tiene uno de los niveles más altos de la Unión Europea de infección por *Salmonella* spp tanto en cerdos como en muestras recogidas de sus carcasas<sup>1,245</sup>, y que, al parecer, la variante monofásica 1,4,[5],12:i:- es muy prevalente<sup>246</sup>.

La mayoría (59,8%) de los aislamientos del serotipo 1,4,(5),12:i:- del estudio expresan el antígeno O:5, mientras que en el 40,2% dicho antígeno es

indetectable , al igual que en un estudio alemán que abarca los años 2006-2007 donde el porcentaje de cepas de la variante monofásica encontradas en humanos con el antígeno O:5 es aún mayor (76%)<sup>200</sup>.

En nuestra serie la frecuencia de aislamiento de S. Montevideo (7,4%) es llamativa, tercera tras S. 1,4,(5),12:i:- y S. Enteritidis. No hemos encontrado que este serotipo esté entre los más aislados en otros estudios publicados<sup>1,188,200,289,290</sup>.

Por otro lado, el único serotipo relacionado con la edad de los pacientes es 1,4,[5],12:i:-. Ser más joven se asocia significativamente con padecer una infección causada por este serotipo ( $p=0,000$ ), lo que concuerda con otros estudios en los que la mayoría de los individuos con salmonelosis por la variante monofásica son jóvenes<sup>291</sup>.

La conocida tendencia estacional del serotipo Enteritidis con mayor número de casos en primavera y verano<sup>1,75</sup> se aprecia de forma significativa en nuestro estudio. El comportamiento estacional es menos marcado para el serotipo 1,4,[5],12:i:- y no resulta significativo, presentando picos de casos de abril a octubre tal y como describen otros autores<sup>1,291</sup>.

El empleo de antibióticos en veterinaria puede seleccionar los serotipos más resistentes y causar que sean estos los que lleguen a los productos de consumo humano<sup>73</sup>. El aumento de la resistencia de *Salmonella* spp no tifoidea frente a los antimicrobianos considerados clásicamente de elección para su tratamiento es un hecho que preocupa a nivel mundial<sup>159,160</sup>. Nosotros hemos constatado este incremento con respecto al periodo 2000-2006<sup>63</sup>: la resistencia a AMP ha pasado del 34,8% al 47,8%, a AMC del 18,4% al 34,9%, a CIP del 0,1% al 2,6%, a SXT del 6,6% al 8,8%, y a CTX del 0,2% al 0,7%. Superamos el porcentaje de cepas resistentes a AMP y SXT respecto a las comunicadas para el conjunto de los Estados miembros (47,8% vs 25,8% y 8,8 vs 7%, respectivamente)<sup>1</sup>. Pensamos que las fluoroquinolonas y las cefalosporinas de tercera generación mantienen una buena actividad para el tratamiento de la salmonelosis grave en nuestro departamento, y los carbapenems, con el 100%

de sensibilidad, se mantienen como alternativa para la infección invasiva. De todos los serotipos, 1,4,[5],12:i- es el que presenta un mayor porcentaje de cepas con resistencia a los antimicrobianos, mientras que Enteritidis tiene el más bajo, lo que concuerda con el último informe de la EFSA<sup>1</sup>. La resistencia frente AMP de este serotipo monofásico es muy alta (89,7%) y es mayor que la comunicada por otros autores<sup>1,237</sup>, mientras que la resistencia a STX (8,8%) está en el mismo nivel que la del resto de países europeos<sup>1</sup>. A nuestro entender el aumento de aislamientos de S. 1,4,[5],12:i- ha contribuido al incremento del nivel de resistencia global de nuestras cepas.

Una limitación que presenta nuestro estudio es un posible sesgo de selección, ya que sólo disponemos datos de los pacientes a los que se les solicitó un coprocultivo, bien debido a la severidad de su proceso, a lo prolongado de sus síntomas, a su edad o a que pudieron acceder a la atención sanitaria.

En cuanto a la comparación de los periodos pre y post inicio del confinamiento, y como cabía esperar, se aprecia una disminución de la frecuencia de los casos diagnosticados (0,42/día frente a 0,16/día) que podría explicarse, por una parte, por la dificultad para acceder a la atención sanitaria en el confinamiento, pero también por la imposibilidad de mantener las costumbres sociales dada la obligatoriedad de permanecer en nuestros hogares. En lo que respecta a la edad y al sexo de los pacientes, se encuentran diferencias entre las dos etapas sólo para la primera. Los enfermos son significativamente más mayores en el periodo post-confinamiento, bien porque el sesgo de diagnóstico del que hablamos antes fue menor, bien porque los más jóvenes dejaron de tener contacto con los productos que habitualmente son la fuente de sus salmonelosis. En este segundo periodo también aumentan significativamente los pacientes hospitalizados y la edad de estos. Hospitalización y mayor edad van de la mano, si los enfermos son más añosos la probabilidad de que requieran ingreso es también más alta. Otra de las diferencias y una de las más llamativas es el cambio del serotipo más frecuente. Antes del inicio del confinamiento predomina 1,4,[5],12:i-, y después Enteritidis. La disminución del primero y el aumento del segundo es tan destacable que resulta estadísticamente significativo aun ajustando por edad y sexo. Claramente, las

fuentes más asociadas con *S. Enteritidis* (huevos y sus derivados) se siguieron consumiendo durante la pandemia, mientras que no fue así con los productos que contienen *S. 1,4,[5],12:i:-*, hecho que pone de manifiesto la estrecha relación entre las costumbres y tradiciones alimentarias, y la epidemiología de *Salmonella*. Por último, en relación con la comparación de la sensibilidad frente a los antibióticos estudiados, la sensibilidad frente AMP aumenta significativamente a expensas de la disminución de cepas de la variante monofásica y el aumento de *Enteritidis*.

## 2.- ESTUDIO CASO-CASO

Que conozcamos, este es el primer trabajo que estudia las fuentes animales asociadas a casos esporádicos de gastroenteritis originados por el serotipo *1,4,[5],12:i:-*, aunque en diversas publicaciones ya se ha intentado relacionar las infecciones esporádicas causadas por *Salmonella* con distintos productos de origen animal<sup>3,292,293,294</sup>. Hasta el momento, la mayor parte del conocimiento disponible acerca de estas infecciones provenía de investigaciones de brotes<sup>56,193,197,250,251</sup>, cuya capacidad para explicar la epidemiología de los casos esporádicos ignorábamos.

Debido a que *S. 1,4,[5],12:i:-* se considera una variante de *S. Typhimurium* suponemos que ambas se van a comportar de la misma forma en cuanto a que su presentación más común va a ser en forma de infecciones aisladas<sup>295</sup> que son las se incluyen en nuestro estudio. De hecho, ninguno de los casos que excluimos por estar relacionados con brotes alimentarios está causado por alguno de estos dos serotipos, sino que todos pertenecen a *S. Enteritidis*.

La elección del diseño caso-caso se ha basado en que es más eficiente, rápido e imparcial para analizar la asociación entre determinadas exposiciones y el desarrollo de una infección que el caso-control. Además, disminuye la probabilidad de sesgos de selección y sesgos de información; y resulta especialmente útil cuando los casos de una enfermedad infecciosa pueden dividirse en subgrupos tal y como sucede en la salmonelosis: los distintos

serotipos se transmiten a través de fuentes diferentes y puede presumirse que los pacientes infectados por un tipo concreto comparten determinada exposición que puede ser definida y comparada con los casos provocados por otros serotipos<sup>3,296</sup>. Este formato también puede aplicarse para encontrar rápidamente la fuente asociada a brotes alimentarios<sup>297</sup>. Por otra parte, la realización de un cuestionario vía telefónica, método que hemos empleado para la recogida de datos, ya ha demostrado su utilidad y validez en otros trabajos<sup>3,292,293,297</sup>.

Nuestro estudio se centra en S. 1,4,[5],12:i-, serotipo emergente que se encuentra habitualmente en la carne de cerdo<sup>98,200</sup> y cuya prevalencia es especialmente elevada en nuestro país<sup>1,247</sup> y más aún en nuestra región<sup>249</sup>. Para atajar su expansión, el primer nivel dónde actuar es la cadena de producción de alimentos derivados del cerdo. Como ya se ha comentado anteriormente, en los Estados miembros de la Unión Europea no es obligatorio adoptar Programas de Control de *Salmonella* en el ganado porcino, a diferencia de lo que sucede con las explotaciones aviares, así que cada país decide si establecerlos o no y los objetivos que considera que tiene que cumplir<sup>247</sup>. Hoy en día, en España no existe ningún programa oficial de control de *Salmonella* en este campo<sup>298</sup>. Con el panorama actual de la industria de producción porcina intensiva y el comercio de animales y productos cárnicos entre países con sistemas sanitarios con distintos grados de desarrollo, la reducción de la prevalencia de este serotipo en los cerdos se vislumbra muy improbable<sup>299</sup>. Así pues, parece que la forma de prevenir las toxiinfecciones alimentarias por S. 1,4,[5],12:i- pasa por conocer qué tipo concreto de productos, supuestamente porcinos<sup>200</sup>, actúan como vehículo de las mismas. De esta manera podrían establecerse recomendaciones dirigidas a los consumidores como las que ya están instauradas para los huevos y sus derivados.

Si bien es conocido que uno de los grupos poblacionales más afectados por las gastroenteritis por *Salmonella* son los niños<sup>300</sup>, la salmonelosis por el serotipo 1,4,[5],12:i- puede considerarse prácticamente una infección pediátrica ya que el 85,1% de los afectados en nuestro estudio tienen entre 0 y 14 años, mientras este porcentaje en el conjunto del resto de serotipos es del 52,7%. La edad

media de los pacientes con infección por esta variante monofásica es significativamente menor que la de los infectados por otros serotipos. Los hallazgos de Seixas et al<sup>291</sup> en Portugal son similares a los nuestros, pues encuentran que el 69,3% de los infectados son menores de 15 años. No hallamos diferencias significativas ni por sexo ni por país de origen de los pacientes, al igual que Arnedo et al<sup>3</sup> en un estudio caso-caso que compara salmonelosis esporádica por *S. Typhimurium* y su variante monofásica con la causada por otros serotipos.

Los dos síntomas/signos más frecuentes de nuestros pacientes con infección por *S. 1,4,[5],12:i:-*, diarrea y fiebre, concuerdan y con un porcentaje muy similar con los comunicados por de Frutos et al<sup>251</sup> en la descripción de un brote de toxiinfección alimentaria por este serotipo; mientras que difieren en cuanto al tercero más común, en nuestro caso el dolor abdominal y en el suyo los vómitos. Ambos estudios también presentan una proporción muy semejante de enfermos hospitalizados. En el estudio de otro brote de *S. 1,4,[5],12:i:-* en Francia<sup>98</sup>, los tres síntomas que se registraron más frecuentemente fueron la diarrea, la fiebre y el dolor abdominal, exactamente los mismos que en nuestro trabajo. Estos datos podrían sugerir que tanto las infecciones ocasionadas por la variante monofásica asociadas a brotes como las esporádicas presentan el mismo comportamiento en cuanto a manifestaciones clínicas y gravedad.

Comparando la sintomatología causada por *S. 1,4,[5],12:i:-* con la del resto de serotipos, el único punto remarcable es que la diarrea con productos patológicos en los pacientes del primer grupo aparece acompañada por otros síntomas como la fiebre, mientras que en los del segundo grupo se presenta como manifestación clínica aislada, y esta diferencia es estadísticamente significativa. Podría inferirse que la variante monofásica, poseedora de genes de virulencia que promueven el proceso de invasión celular<sup>238</sup>, es capaz de causar cuadros severos, aunque la mayoría no lo sean, conclusión a la que también llegan Arnedo et al<sup>3</sup>.

Hemos observado que, en general, las hospitalizaciones por salmonelosis aumentan significativamente con la edad. Así que como los enfermos por *S.*

1,4,[5],12:i- son más jóvenes que los del resto de serotipos su proporción de ingresos hospitalarios es también menor. Está descrito que los individuos con múltiples comorbilidades tienen más riesgo de padecer infecciones invasivas<sup>137</sup> y, por tanto, de necesitar tratamiento hospitalario; lo que ha quedado constatado al comprobar que el porcentaje de pacientes del grupo 1 y del grupo 2 hospitalizados con enfermedades de base es seis y tres veces mayor, respectivamente, que el de los que no las tienen.

En teoría, la metodología caso-caso no es adecuada para estudiar los factores generales que suponen un riesgo de desarrollar salmonelosis debida a cualquier serotipo ya que, supuestamente, estos van a distribuirse de forma similar en ambos grupos<sup>296</sup>. Puede que esta sea la razón por la que no encontramos asociación significativa entre ninguno de los factores de riesgo comúnmente asociados a las gastroenteritis por *Salmonella* y las infecciones debidas a S. 1,4,[5],12:i-. Sin embargo, en el estudio caso-caso de Arnedo et al<sup>3</sup>, jugar en el suelo con tierra, que puede estar contaminada con heces de animales se asocia más con los casos de salmonelosis esporádica por S. Typhimurium y su variante monofásica que con los debidos a otros serotipos; aunque en el referido trabajo agrupan 1,4,[5],12:i- y Typhimurium, y quizás esto influya en la obtención de este dato.

En principio, los resultados de nuestro estudio indican que el consumo de productos porcinos curados-crudos en general, y de longaniza seca y fuet en particular, se asocia significativamente con las infecciones por S. 1,4,[5],12:i-; y que, además, el riesgo aumenta cuanto mayor es la frecuencia de consumo de estos dos productos. Sin embargo, cuando se divide a los pacientes por edad, en los menores de 10 años aumenta la asociación con el consumo de alimentos curados-crudos (OR=3,79) y de longaniza seca (OR=10,04), pero se pierde para el fuet; y en los que tienen 10 o más años ningún producto se mantiene como factor de riesgo. Así pues, esta información indica que la ingesta de longaniza seca en niños menores de 10 años supone un riesgo muy alto de adquisición de infección por S. 1,4,[5],12:i-. Además, la potencia estadística de esta asociación es altísima (99,36%).

La longaniza seca, también conocida como longaniza de Pascua, es un tipo de embutido típico de nuestra región, originario de la Comunidad Valenciana y de la comarca aragonesa del Maestrazgo, que se elabora con magro de cerdo y se consume tras un proceso de curación corto. Cuando la demanda de estos productos es muy elevada, como sucede por ejemplo durante las fiestas locales, puede que el proceso de curación o maduración se acorte y que así el secado no sea adecuado, de manera que la bacteria, en caso de estar presente, puede sobrevivir y producir infección<sup>301</sup>.

La ingesta de este producto porcino ya ha sido estadísticamente asociada a la variante monofásica en el estudio de un brote de gastroenteritis ocurrido en Castellón en 2011<sup>197</sup>, los autores incluso consiguieron aislar esta salmonela de muestras de longaniza que uno de los afectados todavía conservaba en su casa. Otros derivados del cerdo también se han considerado fuentes de infección de brotes alimentarios causados por este serotipo, como, por ejemplo, un tipo de salchicha curada en Francia en 2010-2011<sup>195,302</sup>, un chorizo de elaboración casera en Vizcaya en 2014<sup>196</sup>, carne picada en Alemania en 2013<sup>250</sup> o carne cocinada en Italia en 2011<sup>56</sup> y en Valladolid en 2016<sup>251</sup>.

Que sean los menores de 10 años los significativamente afectados por el consumo de los productos porcinos contaminados con esta bacteria ya se sugiere en una publicación de Gossner et al<sup>302</sup> que, ante los resultados de su estudio, proponen que los individuos en esta franja de edad no consuman este tipo de alimentos. Es posible que habitualmente la concentración de S. 1,4,[5],12:i:- que contengan estos derivados del cerdo curados-cruados, y la longaniza seca en particular, sea baja y que, como estos alimentos suelen consumirse en pequeña cantidad, la infección en adultos sanos sea asintomática o muy leve<sup>295</sup> mientras que en los niños pequeños su menor peso posibilite que esta concentración sea suficiente para ocasionar manifestaciones clínicas de mayor o menor gravedad.

Dos hechos observados durante el estudio apoyan aún más si cabe la asociación entre la longaniza seca y los casos de S. 1,4,[5],12:i:-. El primero es un pico de casos en niños durante la primera semana de abril de 2019, una

semana después de las fiestas de la Magdalena, fiestas fundacionales de Castellón, durante las cuales es muy típico comer longaniza seca. Y el segundo es la disminución espectacular de casos a partir del confinamiento, periodo en el que se dejó de celebrar la Pascua y otras muchas festividades. El consumo de longaniza seca en estas celebraciones es una costumbre que forma parte de nuestra cultura y que nunca se ha percibido como un riesgo. Nuestra población asume que la causa principal de la salmonelosis son los huevos, cuando su consumo se asocia negativamente a las infecciones causadas por el serotipo más frecuente en nuestra región. Creemos que la población tendría que ser informada y concienciada acerca del potencial riesgo de ingerir productos porcinos curados-crudos y que debería recomendarse que los niños menores de 10 años evitaran su ingesta, principalmente la de longaniza seca.

Entre las posibles limitaciones de este estudio tenemos, por un lado, que el número de casos incluidos tanto del serotipo monofásico como del resto ha sido menor que el que en un principio se estimó necesario, aunque suficiente para encontrar diferencias significativas entre exposiciones e infecciones y con una potencia estadística muy alta para uno de los productos. En segundo lugar, la presencia en el grupo caso 2 de serotipos también asociados con el cerdo como Derby (1 caso), Rissen (2 casos) y Typhimurium (5 casos) podría haber dificultado encontrar asociación estadísticamente significativa entre productos porcinos y el serotipo monofásico (hipótesis nula). En tercer lugar y aunque se tomaron medidas para evitar posibles sesgos de clasificación como que no se conociera el serotipo causante de la infección en el momento de la entrevista, no podría descartarse debido a un potencial sesgo de memoria provocado por la falta de inmediatez en la realización del cuestionario telefónico tras el aislamiento de *Salmonella*, en el caso de que la información proporcionada por los participantes no tuviera la exactitud deseada o se hubieran obviado datos importantes. En cuanto a esto, como la salmonelosis es una infección con entidad en los niños, principalmente las madres, que eran las que respondieron con mayor frecuencia, recordaban con detalle las circunstancias que rodearon el proceso de sus hijos; y los adultos tampoco manifestaban dudas cuando respondían a la encuesta. Por último, cabe la posibilidad de que, si se hubiera

empleado algún método de epidemiología molecular, alguno de los casos considerados esporádicos se hubiese reclasificado como perteneciente a algún brote.

### **3.- ESTUDIO EXPERIMENTAL**

No hemos encontrado en la literatura científica ningún estudio anterior al nuestro que valide en su entorno un esquema de identificación de algunos de los serotipos de *Salmonella enterica* subsp *enterica* epidemiológicamente más relevantes basado en la espectrometría de masas MALDI-TOF<sup>281</sup>. Dentro de los serotipos que identifica el protocolo de Dieckmann y Malorney se encuentran los dos más frecuentemente aislados en nuestro Departamento: 1,4,[5],12:i:- (indistinguible por este método de Typhimurium) y Enteritidis. Nuestra intención era poder disminuir sustancialmente el número de aislamientos a remitir al laboratorio de referencia de *Salmonella* del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III para su categorización mediante serotipado tradicional, aprovechando el perfil proteico obtenido al identificar estas cepas en nuestro laboratorio mediante el sistema VITEK® MS.

La posibilidad de identificar serotipos de *Salmonella enterica* subsp *enterica* utilizando la espectrometría de masas resulta atractiva por muchas razones: cada vez son más numerosos los laboratorios que disponen de esta tecnología, la identificación y el tipado se realizarían en un solo paso, y se terminaría con la dependencia de laboratorios de referencia que llevan a cabo el serotipado completo; en definitiva, se ahorraría en tiempo y recursos económicos. Dieckmann y Malorny estiman en su estudio que el coste de identificar y tipar *Salmonella enterica* mediante espectrometría de masas es tres veces menor que si se utilizan pruebas bioquímicas y serotipificación mediante aglutinación<sup>281</sup>. Por desgracia, todavía estamos lejos de disponer de esta herramienta y conseguirla no va a ser tarea fácil.

De entrada, la aproximación basada en la creación de un superespectro por serotipo queda descartada ya que cuando se comparan dos serotipos

diferentes no se observan más de aproximadamente quince de picos potencialmente discriminatorios que, además, suelen estar presentes en más de un serotipo<sup>281</sup>. Así que queda la opción de la búsqueda de biomarcadores, ya sea uno específico o bien una combinación de estos, que permitan distinguir entre distintos serotipos de *Salmonella enterica* subsp *enterica*<sup>280-282</sup>. Muy pocos investigadores se han embarcado en este cometido<sup>280,282</sup>, y el único trabajo encontrado en la literatura que propone un algoritmo de identificación de algunos de los tipos más frecuentemente aislados y que, además, a priori parece sencillo es en el que hemos basado nuestro estudio<sup>281</sup>.

Para evitar que el procedimiento de preparación de nuestras colonias afectara a la reproducibilidad del método, seguimos fielmente las indicaciones de los autores<sup>281</sup>. A pesar de que parece que la “edad” de las cepas es el único factor que influye realmente en la correcta caracterización mediante espectrometría de masas de los microorganismos gram negativos como *Salmonella*, pues el número y la intensidad de los picos generados es menor cuanto más viejo es el cultivo<sup>257</sup>, todas las condiciones de la siembra y preparación de las colonias han sido estrictamente controladas: se ha empleado un medio no selectivo ni diferencial sin sangre incubado a 37°C, no se ha utilizado ninguna colonia de más de 24 horas para la obtención de su espectro de masas y todo el proceso ha sido realizado por la misma persona.

Pensamos que el hecho de que el algoritmo esté diseñado con el espectrómetro MALDI Biotyper de Bruker Daltonics y que en nuestro laboratorio dispongamos del VITEK® MS de bioMérieux es la causa de las diferencias entre los biomarcadores principales (6036,8 vs 6036 para Enteritidis y 7098,5 vs 7097 para Typhimurium/1,4,[5],12:i:-) y de que no encontramos ninguno de los picos accesorios de Typhimurium/1,4,[5],12:i:-.

Según nuestros resultados, el pico m/z 6036,8 resulta 100% sensible y específico para identificar cepas de *S. Enteritidis*, mientras que en el estudio de Dieckmann y Malorney hallan una sensibilidad del 86,5% para su biomarcador. Estos autores achacan sus falsos negativos a una posible subexpresión de determinadas proteínas que provoca que su concentración esté por debajo del

límite de detección de las mismas y que se debe a mutaciones puntuales que tienen lugar durante el proceso de almacenamiento (congelación) y resiembra de las cepas<sup>281</sup>. En cuanto al pico 7098,5 como biomarcador principal de Typhimurium/1,4,[5],12:i:- encontramos una sensibilidad menor que el comunicado en el trabajo en que nos basamos para el pico 7097 (98,4% vs 100%). La fórmula antigénica de los dos aislamientos falsos negativos es 4,12:i;- desconocemos si la falta de expresión del antígeno somático 5 puede influir en estos resultados o si son producto de alteraciones en la expresión proteica causadas por la congelación-descongelación de las cepas de la misma manera que podría haber sucedido con los falsos negativos de Enteritidis. En relación con la especificidad del 100% en nuestra serie del biomarcador 7098,5 en solitario para Typhimurium/1,4,[5],12:i:- pensamos que puede explicarse por la ausencia de cepas de S. Virchow que no se hubieran podido distinguir debido a la ausencia de biomarcadores adicionales.

A pesar de que la identificación de la mayoría de los serotipos sigue dependiendo del método tradicional, empleando los biomarcadores de Dieckmann y Malorney validados en nuestro estudio para VITEK® MS podríamos evitar tanto serotipar de forma preliminar en nuestro laboratorio como posteriormente remitir al Centro Nacional de Referencia las cepas de S. Enteritidis que representan un 29% de nuestros aislamientos. En cuanto a S. Typhimurium/1,4,[5],12:i:-, aunque más del 90% se corresponderían con el serotipo monofásico no podríamos asegurar una identificación precisa por lo que dejaríamos de hacer el serotipado preliminar pero seguiríamos enviando esas cepas al laboratorio de Referencia.

# **CONCLUSIONES**

- 1.- Consideramos que la información presentada respecto a la epidemiología de *Salmonella* spp es amplia y que ayudará al control de la salmonelosis en nuestra región.
- 2.- El serotipo que se aísla más frecuentemente en casos esporádicos de salmonelosis en nuestro Departamento es el 1,4,[5],12:i:-, seguido de Enteritidis, Montevideo y Typhimurium.
- 3.- La frecuencia de gastroenteritis en hombres es levemente superior a la de las mujeres y la edad media de nuestros enfermos es 21,8 años. El grupo que concentra el mayor número de casos es el de los niños de 0-4 años.
- 4.- Aunque casi la mitad de los pacientes son atendidos en el Servicio de Urgencias, muy pocos requieren ingreso hospitalario. Los enfermos que presentan significativamente más riesgo de ser hospitalizados son los hombres y los pacientes de mayor edad.
- 5.- El único serotipo relacionado con la edad de los pacientes a los que infecta es el 1,4,[5],12:i:-. Ser más joven se asocia significativamente con padecer una salmonelosis causada por este serotipo.
- 6.- Las fluoroquinolonas, las cefalosporinas de tercera generación y los carbapenems siguen siendo una buena opción para el tratamiento de la salmonelosis grave.
- 7.- El serotipo 1,4,[5],12:i:- es el que presenta un mayor porcentaje de cepas resistentes a los antimicrobianos estudiados.
- 8.- A partir del confinamiento decretado a causa de la pandemia de COVID-19, se aprecia una disminución de los casos. El serotipo Enteritidis pasa a ser el predominante, los enfermos son significativamente más mayores y el porcentaje de hospitalización es más elevado.

8.- La salmonelosis debida al serotipo 1,4,[5],12:i:- puede considerarse prácticamente una infección pediátrica ya que el 85% de los afectados en nuestro estudio tienen entre 0 y 14 años.

9.- Los resultados de nuestro estudio caso-caso indican que el consumo de productos porcinos curados-crudos en general, y de longaniza seca y fuet en particular, se asocia significativamente con las infecciones por S.1,4,[5],12:i:-; y que el riesgo aumenta cuando se incrementa su consumo que es muy habitual en la población de nuestra región.

10.- El análisis de los datos obtenidos indica que la ingesta de longaniza seca en niños menores de 10 años supone un riesgo muy alto de padecer una salmonelosis por el serotipo 1,4,[5],12:i:-, siendo altísima la potencia estadística de esta asociación (99,36%).

11.- Creemos que nuestra población tiene que ser informada y concienciada acerca del riesgo potencial de adquirir una infección por *Salmonella* tras consumir productos porcinos curados-crudos, y que los niños menores de 10 años deben evitar su ingesta, principalmente de longaniza seca.

12.- VITEK®MS permite una identificación precisa del serotipo Enteritidis, que supone un 30% de nuestras cepas. Para diferenciar el serotipo Typhimurium del 1,4,[5],12:i deberíamos seguir remitiendo estos aislamientos al laboratorio de Referencia.

## REFERENCIAS

1. European Food Safety Authority and European Center for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal [Internet].2021 [Consultado 19 Oct 21]. 19(2):6406. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.
2. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal [Internet]. 2016 [Consultado 10 Sep 18]. 14(12):4634. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>.
3. Arnedo-Pena A, Vivas-Fornas I, Meseguer-Ferrer N, Tirado-Balaguer MD, Yagüe-Muñoz A, Herrera-León S, Sabater-Vidal S, Romeu MA, Vizcaino-Batlles A, Bellido-Blasco JB, Moreno-Muñoz R. Comparison of sporadic cases of *Salmonella* Typhimurium with other *Salmonella* serotypes in Castellon (Spain): case-case study. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Ed. Eng)*. 2018; 36(8):478-83.
4. Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA. Emergence and Spread of an Atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Society*.1999; 37(10):3425.
5. Centro Nacional de Epidemiología. CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual 2015 [Internet]. Madrid. 2017 [Consultado 23 Sep 18]. Disponible en: [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/RENAVE\\_INFORME\\_ANUAL\\_2015.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/RENAVE_INFORME_ANUAL_2015.pdf).
6. Poppoff MY. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th ed. WHO Collaborating Centre of Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Institut Pasteur. 2001.

7. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of Prokariotes. En: Garrity GM, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Springer-Verlag; 2005. pp:79-122.
8. Bailey JS, Richardson LJ, Cox NA. *Salmonella*. En: Juneja VK and Sofos JN, editores. *Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions*. Washington, D.C: ASM; 2010. pp108-18.
9. Heinitz ML, Ruble RD, Wagner DE, Tatini SR. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *J. FoodProt.* 2000; 63:579-92.
10. Lopes PD, Freitas-Neto OC, Batista DF, Denadai J, Alarcon MF, Almeida AM, Vasconcelos RO, Setta A, Barrow PA, Berchieri A Junior. Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Gallinarum*. *Vet J.* 2016; 214:40-6.
11. Schofield FW. *Salmonella* Infections of Domestic Animals: Their Relationship to Salmonellosis (Food Infection in Man). *Can J Comp Med Vet Sci.* 1945; 9(3):62-8.
12. Popoff MY, Le Minor L. *Salmonella*. En: Garrity GM, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Springer-Verlag; 2005. pp764-99.
13. D'Aoustand J, Maurer J. *Salmonella* species. En: Doyle M, Beuchat L, editores. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 3<sup>a</sup> ed. Washington, DC: ASM Press; 2007. pp. 187-236.
14. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci.* 2008; 86(14 Suppl):173-87.
15. Salmon DE, Smith T. Report on swine plague. 2nd Annual Report, U.S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry. 1885; 184–246.
16. Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Leng SH, Chan KG, Han LL. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front LifeSci.* 2015; 8(3):284-93.

17. *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology. The Genus *Salmonella* Lignières, 1900. J Hyg (Lond). 1934; 34(3):333-50.
18. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th Edition [Internet]. Paris: Pasteur Institute. 2007 [Consultado 17 mayo 19]. Disponible en: [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf).
19. Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. Molecular relationships among the *Salmonellae*. J. Bacteriol.1973; 115(1):307-15.
20. Le Minor L, Veron M, Popoff M. A proposal for *Salmonella* nomenclatura. Annals of Microbiology.1981; 133:245-54.
21. Penner JL. International Committee on Systematic Bacteriology Taxonomic Subcommittee on *Enterobacteriaceae*. International Journal of Systematic Bacteriology.1988; 38:223-4.
22. Le Minor L, Popoff MY. 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.1987; 37:465-8.
23. Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ 3rd. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. J Clin Microbiol. 1989; 27(2):313-20.
24. Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. Biomed Res Int. 2017; 2017:3782182.
25. Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzéby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55(1):521-4.
26. Brenner FW. Guest commentary: *Salmonella* Nomenclature. J Clin Microbiol. 2001;17(2):69-74.

27. CDC. National *Salmonella* Surveillance Overview [Internet]. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011 [Consultado 15 Sep 20]. Disponible en: [https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf).
28. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PA, Weill FX. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2010; 161(1):26-9.
29. Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56(1):301-3.
30. Andrews WH, Wang H, Jacobson A, Hammack TS. *Salmonella*. En: Andrews WH, Hammack TS, editores. Bacteriological Analytical Manual. 8ª ed. U.S. Food and Drug Administration, United States; 2009.
31. Anderson RC, Ziprin RL. Bacteriology of *Salmonella*. En: Hui YH, Pierson MD, Gorham JR, editores. Foodborne Disease Handbook, Bacterial Pathogens. New York, Marcel Dekker; 2001. pp. 247-63.
32. Lee KM, Runyon M, Herrmann TJ, Phillips R, Hsieh J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. Food Control. 2015; 47:264-76.
33. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. Supplement 2008-2010 (nº. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2014; 165(7):526-30.
34. Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. Foodborne Pathog Dis. 2009; 6(4):407-15.
35. Agasan A, Kornblum J, Williams G, Pratt CC, Fleckenstein P, Wong M, Ramon A. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. J Clin Microbiol. 2002; 40(6):1924-9.

36. Nataro J, Bopp C, Fields P, Kaper J, Strockbine N. *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. En: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editores. Manual of Clinical Microbiology, 10<sup>a</sup> ed. Washington,DC.,USA: ASM Press; 2011. pp: 603-26.
37. Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. Vet World. 2019; 12(4):504-521.
38. III Curso Avanzado WHO Global Foodborne Infections Network (WHO-GFN). Diagnóstico de *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp por PCR. Inversión de fase en *Salmonella* spp [Internet]. Servicio Enterobacterias Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Anlis "Carlos G. Malbran". Año 2010 [Consultado 25 Sep 21]. Disponible en: <https://www.paho.org/disasters/dmdocuments/ManualTallerGFN2010.pdf>.
39. Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. Res Microbiol. 2002; 153(2):107-13.
40. Echeita MA, Usera MA. Rapid identification of *Salmonella* spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using "multiplex PCR". Res Microbiol. 1998; 149(10):757-61.
41. Herrera-León S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. J Clin Microbiol. 2004; 42(6):2581-6.
42. Herrera-León S, Ramiro R, Arroyo M, Díez R, Usera MA, Echeita MA. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. Res Microbiol. 2007; 158(2):122-7.
43. Zhang S, Yin Y, Jones MB, Zhang Z, Deatherage Kaiser BL, Dinsmore BA, Fitzgerald C, Fields PI, Deng X. *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. J Clin Microbiol. 2015; 53(5):1685-92.

44. Scaltriti E, Sasser D, Comandatore F, Morganti M, Mandalari C, Gaiarsa S, Bandi C, Zehender G, Bolzoni L, Casadei G, Pongolini S. Differential single nucleotide polymorphism-based analysis of an outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Manhattan reveals epidemiological details missed by standard pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(4):1227-38.
45. Bakker HC, Switt AI, Cummings CA, Hoelzer K, Degoricija L, Rodríguez-Rivera LD, Wright EM, Fang R, Davis M, Root T, Schoonmaker-Bopp D, Musser KA, Villamil E, Waechter H, Kornstein L, Furtado MR, Wiedmann M. A whole-genome single nucleotide polymorphism-based approach to trace and identify 5 outbreaks linked to a common *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo pulsed-field gel electrophoresis type. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(24):8648-55.
46. Bekal S, Berry C, Reimer AR, Van Domselaar G, Beaudry G, Fournier E, Doualla-Bell F, Levac E, Gaulin C, Ramsay D, Huot C, Walker M, Sieffert C, Tremblay C. Usefulness of High-Quality Core Genome Single-Nucleotide Variant Analysis for Subtyping the Highly Clonal and the Most Prevalent *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Clone in the Context of Outbreak Investigations. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(2):289-95.
47. Taylor AJ, Lappi V, Wolfgang WJ, Lapierre P, Palumbo MJ, Medus C, Boxrud D. Characterization of Foodborne Outbreaks of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis with Whole-Genome Sequencing Single Nucleotide Polymorphism-Based Analysis for Surveillance and Outbreak Detection. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(10):3334-40.
48. Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(22):7877-85.
49. Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect.* 2002; 129(1):1-8.
50. Rankin AM, Platt DJ. Phage conversion in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: Implications for epidemiology. *Epidemiol Infect.* 1995; 114:227-36.

51. Tabe ES, Oloya J, Doetkott DK, Khaita ML. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium var Copenhagen and Typhimurium isolated from feedlot cattle. FoodProt Trends. 2010; 30:273-9.
52. de Oliveira FA, Grazzon APG, Bradelli A, Tondo EC. Use of PCR-ribotyping, RAPD and antimicrobial resistance typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in southern Brazil. J. Infect Dev Ctries. 2007; 1:170-6.
53. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV; CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg Infect Dis. 2001; 7(3):382-9.
54. Lawson B, Hughes LA, Peters T, de Pinna E, John SK, Macgregor SK, Cunningham AA. Pulsed-field gel electrophoresis supports the presence of host-adapted *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strains in the British garden bird population. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(22):8139-44.
55. Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1626-35.
56. Lettini AA, Saccardin C, Ramon E, Longo A, Cortini E, Dalla Pozza MC, Barco L, Guerra B, Luzzi I, Ricci A. Characterization of an unusual *Salmonella* phage type DT7a and report of a foodborne outbreak of salmonellosis. Int J Food Microbiol. 2014; 189:11-7.
57. Echeita MA, Aladueña AM, Díez R, Arroyo M, Cerdán F, Gutiérrez R, de la Fuente M, González-Sanz R, Herrera-León S, Usera MA. Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005; 23(3):127-34.
58. Ward LR, de Sa JD, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella* enteritidis. Epidemiol Infect. 1987; 99(2):291-4.

59. Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ, de Sa JD. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* typhimurium. J Hyg (Lond). 1977; 78(2):297-300.
60. De Sá, JDH, Ward RL, Rowe, B. A scheme for the phagotyping of *Salmonella* Hadar. FEMS Microbiol Lett. 1980; 9:175-7.
61. Chambers RM, McAdam P, De Sa JD.H, Ward LR, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella* virchow. FEMS Microbiol Lett. 1987; 40:155-7.
62. Guinne'e PAM, Van Neuween WJ. Phagotyping of *Salmonella*. Methods Microbiol. 1978; 11:157-91.
63. Tirado MD, Moreno R, Celades ME, Bellido-Blasco J, Pardo FJ. Evolución de los serotipos, fagotipos y resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* sp en el departamento de salud 02 de la provincia de Castellón, España (2000-2006). Rev. chil. infectol. 2009; 26(6):520-7.
64. Fernández F, López L, Pascual A. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31(Supl 1):20-5.
65. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis. 2006; 3(1):59-67.
66. Xia X, Zhao S, Smith A, McEvoy J, Meng J, Bhagwat AA. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. Int J Food Microbiol. 2009; 129(1):93-8.
67. Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, Kapperud G. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. J Clin Microbiol. 2003; 41:1469-79.

68. Trevejo RT, Courtney JG, Starr M, Vugia DJ. Epidemiology of salmonellosis in California, 1990-1999: morbidity, mortality, and hospitalization costs. *Am J Epidemiol.* 2003; 157:48-57.
69. Bellido JB, Galiano JV, Tirado MD, González-Cano JM, Safont L. Incidencia de casos esporádicos de las infecciones intestinales más frecuentes en Castellón. *Rev Esp Salud Pública.* 2003; 77(5):629-38.
70. González-Hevia MA, Cruz-Martín M, Lobato MJ, Gutiérrez F, Solar P, Álvarez-Riesgo JA. *Salmonella* y salmonelosis en Asturias, España durante un periodo de siete años. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1999; 17:166-70
71. Olsen SJ, Bishop R, Brenner FW, Roels TH, Bean N, Tauxe RV, Slutsker L. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *J Infect Dis.* 2001; 183(5):753-61.
72. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, Praet N, Bellinger DC, de Silva NR, Gargouri N, Speybroeck N, Cawthorne A, Mathers C, Stein C, Angulo FJ, Devleeschauwer B. World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* 2015; 12(12):e1001923.
73. Ballesté-Delpierre C, Vila Estapé J. Why are we still detecting food-related *Salmonella* outbreaks in Spain? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34(9):541-3.
74. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal.* 2015; 13(1):e03391.
75. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Años 2017-2018 [Internet]. Madrid; 2020 [Consultado 3 septiembre 21]. Disponible en: [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES%20RENAVE/RENAVE\\_Informe\\_anual\\_\\_2017-2018.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES%20RENAVE/RENAVE_Informe_anual__2017-2018.pdf) .

76. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. Interventions for the control of non-typhoidal *Salmonella* spp. in beef and pork: meeting report and systematic review [Internet]. 2016. World Health Organization. 2016 [Consultado 5 septiembre 21]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/249529>.
77. Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, Cieslak PR, Deneen VC, Tauxe RV. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(Suppl 3): S127-34.
78. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(1):7-15.
79. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM. International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(6):882-9.
80. World Health Organization, Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases [Internet]. Geneva, Switzerland; 2015 [Consultado 29 septiembre 21]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>.
81. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan, B. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(7): 2465-7.
82. Evangelopoulou G, Kritas S, Govaris A, Burriel AR. Animal salmonellosis: A brief review of "Host Adaptation and Host Specificity" of *Salmonella* spp. *Veterinary World*. 2013; 6(10):703-8.
83. Chen HM, Wang Y, Su LH, Chiu CH. Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and Neonatology*. 2013; 54:147-52

84. Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 1998; 66(10):4579-87.
85. Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* 2000; 125:229-55.
86. Kisiela DI, Chattopadhyay S, Libby SJ, Karlinsey JE, Fang FC, Tchesnokova V, Kramer JJ, Beskhlebnaya V, Samadpour M, Grzymajlo K, Ugorski M, Lankau EW, Mackie RI, Clegg S, Sokurenko EV. Evolution of *Salmonella enterica* Virulence via Point Mutations in the Fimbrial Adhesin. *PLoS Pathog.* 2012; 8(6):e1002733
87. Heithoff DM, Shimp WR, Lau PW, Badie G, Enioutina EY, Daynes RA, Byrne BA, House JK, Mahan MJ. Human *Salmonella* Clinical Isolates Distinct from Those of Animal Origin. *Appl. Environ Microbiol.* 2008; 74(6):1757-66.
88. Uzzau S, Leori GS, Petruzzi V, Watson PR, Schianchi G, Bacciu D, Mazzarello V, Wallis TS, Rubino S. *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. *Infect Immun.* 2001; 69(5):3092-9.
89. Mustaffa SS, Saleha AA, Jalila A. Occurrence of antibiotic-resistant *Salmonella* and *Campylobacter* in wild birds. *J Vet Malaysia.* 2014; 26(2):17-9.
90. Botti V, Valérie NF, Domenis L, Orusa R, Pepe E, Robetto S, Guidetti C. *Salmonella* spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in North-Western Italy from 2002 to 2010. *Vet Ital.* 2013; 49(2):195-202.
91. Andrés-Barranco S, Vico JP, Garrido V, Samper S, Herrera-León S, de Frutos C, Mainar-Jaime RC. Role of wild birds and rodents in the epidemiology of subclinical salmonellosis in finishing pigs. *Foodborne Patho Dis.* 2014; 11(9): 689-97.
92. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal.* 2017; 15(2):4694.

93. Paudyal N, Pan H, Liao X, Zhang X, Li X, Fang W, Yue M. A meta-analysis of major foodborne pathogens in Chinese food commodities between 2006 and 2016. *Foodborne Pathog Dis.* 2018; 15:187-97.
94. Pires SM, Vieira AR, Hald T, Cole D. Source attribution of human salmonellosis: an overview of methods and estimates. *Foodborne Pathog Dis.* 2014; 11:667–76.
95. Fatica MK, Schneider KR. *Salmonella* and produce: survival in the plant environment and implications in food safety. *Virulence.* 2001; 2:573-9.
96. Laufer AS, Grass J, Holt K, Whichard JM, Griffin PM, Gould LH. Outbreaks of *Salmonella* infections attributed to beef--United States, 1973-2011. *Epidemiol Infect.* 2015; 143:2003–13.
97. Mindlin MJ, Lang N, Maguire H, Walsh B, Verlander NQ, Lane C, Taylor C, Bishop LA, Crook PD. Outbreak investigation and case-control study: penta-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 associated with biltong in London in 2008. *Epidemiol Infect.* 2013; 141:1920-7.
98. Raguenaud ME, Le Hello S, Salah S, Weill FX, Brisabois A, Delmas G, Germonneau P. Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:i:- in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010. *Euro Surveill.* 2012; 17(40):20289.
99. Beshearse E, Bruce BB, Nane GF, Cooke RM, Aspinall W, Hald T, Crim SM, Griffin PM, Fullerton KE, Collier SA, Benedict KM, Beach MJ, Hall AJ, Havelaar AH. Attribution of Illnesses Transmitted by Food and Water to Comprehensive Transmission Pathways Using Structured Expert Judgment, United States. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27(1):182-95.
100. Blaser MJ, Newman LS. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev Infect Dis.* 1982; 4:1096-106.

101. Bell C. *Salmonella*. En: Blackburn C de W, McClure PJ, editores. Food-borne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control. Boca Raton: CRC; 2002. pp:307-34.
102. Mazzotta, AS. D- and z-values of *Salmonella* in ground chicken breast meat. J. Food Saf. 2000; 20:217-23.
103. Cosby DE, Cox NA, Harrison MA, Wilson JL, Jeff Buhr R, Fedorka-Cray PJ. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review. J. Appl Poult Res. 2015; 24:408-26.
104. Sörqvist S. Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., and *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., and *Campylobacter* spp. Acta Vet Scand. 2003; 44:1-19.
105. Obafemi A, Davies R. The destruction of *Salmonella* Typhimurium in chicken exudates by different freeze-thaw treatments. J Appl Bacteriol. 1986; 60:381-7.
106. Lound L, Aleu H, Broggi L, Genaro V, Tesouro R, Favre L, Plem S, Tofolón E. Resistencia térmica de *Salmonella*. Efecto del pH y la actividad del agua. Ciencia, Docencia y Tecnología. 2017; 7:1-17.
107. Molbak K. Human health consequences of antimicrobial drug-resistant *Salmonella* and other foodborne pathogens. Clin Infect Dis. 2005; 41:1613-20.
108. Hoffmann S, Batz MB, Morris JG Jr. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. J Food Prot. 2012; 75:1292-302.
109. McLinden T, Sargeant JM, Thomas MK, Papadopoulos A, Fazil A. Association between component costs, study methodologies, and foodborne illness-related factors with the cost of nontyphoidal *Salmonella* illness. Foodborne Pathog Dis. 2014; 11:718-26.
110. World Health Organization. Drug-resistant *Salmonella* [Internet]. Geneva, Switzerland; 2005 [Consultado 29 septiembre 21]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en>.

111. Johnson LR, Gould LH, Dunn JR, Berkelman R, Mahon BE. Foodnet Travel Working Group. *Salmonella* infections associated with international travel: a Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) study. *Foodborne Pathog Dis.* 2011; 8(9):1031-7.
112. Su LH, Chiu CH, Chu C, Ou JT. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin Infect Dis.* 2004; 39:546-51.
113. BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO Núm. 65 Sec. I. Pág. 24012 I. DISPOSICIONES GENERALES MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD 2837 Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional [Internet]. Madrid; 2015 [Consultado 1 octubre 21]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/días/2015/03/17/pdfs/BOE-A-2015-2837.pdf>.
114. Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ. Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(3):149-56.
115. Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2019; 85(14):e00591-19.
116. Gal-Mor O, Boyle EC, Grassl GA. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front Microbiol.* 2014; 5:391.
117. Instituto de Salud Carlos III. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolo de Vigilancia de Salmonelosis (*Salmonella* spp. distinta de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*) [Internet]. Madrid [Consultado 1 octubre 21]. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSalud>

Publica RENAVE /EnfermedadesTransmisibles/Documents/PROTOCOLOS /Protocolo%20de%20Vigilancia%20de%20Salmonelosis.pdf.

118. Ponka A, Anderson Y, Sutonen A, de Jong B, Jahkola M, Haidala O, Kuhmonen A, Pakkala P. *Salmonella* in alfalfa sprouts. Lancet. 1995; 345:462-3.

119. Figueroa IM, Verdugo A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* Rev Latinoam Microbiol. 2005; 47(1-2): 25-42.

120. Yue M, Schifferli DM. Allelic variation in *Salmonella*: An underappreciated driver of adaptation and virulence. Front Microbiol. 2013; 4:419.

121. Mol O, Oudega B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Rev. 1996; 19(1): 25-52.

122. Townsend SM, Kramer NE, Edwards R, Baker S, Hamlin SM, Simmonds M, Stevens K, Maloy S, Parkhill J, Dougan G, Bäumlér A. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. Infect Immun. 2001; 69:2894-901.

123. Dufresne K, Daigle F. *Salmonella* Fimbriae: What is the Clue to their Hairdo?. En: Mares M, editor. Current Topics in Salmonella and Salmonellosis. London, TechOpen; 2017. pp59-79.

124. Daigle F. Typhi genes expressed during infection or involved in pathogenesis. J Infect Dev Ctries. 2008; 2(6):431-7.

125. Pegues DA, Miller SI. Salmonellosis. En: Fauci AS, Braunwald, E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. HARRISON. Principios de Medicina Interna. Enfermedades Infecciosas. Volumen I. 17<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill; 2008. p208.

126. Wotzka SY, Nguyen BD, Hardt WD. *Salmonella* Typhimurium Diarrhea Reveals Basic Principles of Enteropathogen Infection and Disease-Promoted DNA Exchange. Cell Host Microbe. 2017; 21:443-54.

127. Yang X, Wu Q, Zhang J, Huang J, Guo W, Cai S. Prevalence and characterization of monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- of food origin in China. PLoS One. 2015; 10(9):1-10.
128. Ashkenazi S, Cleary TG, Murray BE, Wanger A, Pickering LK. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. Infect. Immun. 1988; 56(12): 3089-94.
129. Van Asten AJA, Van Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2005; 44(3):251-9.
130. Ahmer BMM, Tran M, Heffron F. The virulence plasmid of *Salmonella* Typhimurium is self-transmissible. J Bacteriol. 1999; 181(4):1364-8.
131. Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeisen J. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. Microbiol Mol Biol Rev. 2013; 77(4): 582-607.
132. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: Big virulence in small packages. Microbes Infect. 2000; 2(2):145-56.
133. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(1):14-56.
134. Groisman EA, Ochman H. How *Salmonella* became a pathogen. Trends Microbiol. 1997; 5:343-8.
135. Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. Immunol Lett. 2017; 190:42-50.
136. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999; 5(5):607-25.
137. Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. Clin. Microbiol Rev. 2015; 28:901-37.

138. Crum-Cianflone NF. Salmonellosis and the gastrointestinal tract: more than just peanut butter. *Curr Gastroenterol Rep*. 2008; 10(4):424-31.
139. Tsai MH, Huang YC, Lin TY, Huang YL, Kuo CC, Chiu CH. Reappraisal of parenteral antimicrobial therapy for nontyphoidal *Salmonella* enteric infection in children. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17:300-5.
140. DuPont, HL. Clinical practice. Bacterial diarrhea. *N Engl J Med*. 2009; 361:1560-9.
141. Quirós FJ, Zarcoa P, Carmona L, Collantes, Simón F. Artritis reactiva por *Salmonella* hadar en la epidemia de gastroenteritis asociada al consumo de pollo precocinado en España. *Reumatol Clin*. 2007; 3:36-8.
142. Beltran-Fabregat J, Arnedo-Pena A, Bellido-Blasco JB, Tirado-Balaguer MD, Fenosa-Salillas A, Pac-Sad MR. Incidencia de artritis reactiva y síntomas osteoarticulares después de un brote de *Salmonella* enteritidis fagotipo 14 b. *Med Clin*. 2006; 126(14):532-4.
143. Deen J, von Seidlein L, Andersen F, Elle N, White NJ, Lubell Y. Community-acquired bacterial bloodstream infections in developing countries in south and southeast Asia: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2012; 12(6):480-7.
144. Crump JA, Mintz ED. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(2):241-6.
145. Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, Mcfarland MA, Brown EW. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: A food and environmental perspective. *Microbial Biotechnology*. 2016; 9:279-92.
146. Raffatellu M, Wilson RP, Winter SE, Bäumlér AJ. Clinical pathogenesis of typhoid fever. *J Infect Dev Ctries*. 2008; 2(4):260-6.
147. Parry CM, Wijedoru L, Arjyal A, Baker S. The utility of diagnostic tests for enteric fever in endemic locations. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011; 9(6):711-25.
148. Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid fever. *N Engl J Med*. 2002; 347(22):1770-82.

149. Instituto de Salud Carlos III. Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Enfermedades transmisibles. Protocolo de Vigilancia de Fiebre Tifoidea y Paratifoidea (*Salmonella* Typhi y *S. Paratyphi*) [Internet]. Madrid Versión 1 de junio de 2013. Revisado el 3 de septiembre de 2016 [Consultado 2 octubre 21]. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/PROTOCOLOS/Protocolo%20de%20Vigilancia%20de%20Fiebre%20Tifoidea%20y%20Paratifoidea.pdf>.
150. Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*. 2005; 366(9487):749-62.
151. Sirinavin S, Garner P. Antibiotics for treating salmonella gut infections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000; 2:CD001167.
152. Gordon MA. Invasive nontyphoidal *Salmonella* disease: epidemiology, pathogenesis and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2011; 24(5):484-9.
153. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis*. 2001; 32:263-9.
154. Tratamiento de las Infecciones producidas por Microorganismos Específicos. *Salmonella*. En: Mensa J, Soriano A, López-Suñe E, Llinares P, Zboromyrska Y, Barberán J, editores. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2022. Barcelona, Editorial Antares; 2022. pp 533-4.
155. Hammack T. *Salmonella species*. En: Lampel KA, editor. Bad bug book e handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. 2ª ed. Washington DC: Food and Drug Administration; 2012. pp. 12-6.
156. Niki M, Shakeel A, Zahid K, Konstantinos CK. Prevalence, Risks and Antibiotic Resistance of *Salmonella* in Poultry Production Chain. En: Mares M, editor. Current Topics in Salmonella and Salmonellosis. London, TechOpen; 2017. pp 216-34.
157. Torres C, Zarazaga M. Repercusiones en el hombre del consumo de antibióticos por animales. *Rev Esp Quimioterapia*. 1998; 11(1):29-35.

158. Threlfall EJ, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschäpe H, Cormican M, Luzzi I, Schnieder F, Wannet W, Machado J, Edwards G. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill.* 2003; 8(2):41-5.
159. Collignon P, Powers JH, Chiller TM, Aidara-Kane A, Aarestrup FM. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(1):132-41.
160. Scientific Advisory Group on Antimicrobials of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. *J Vet Pharmacol Ther.* 2009; 32(6):515-33.
161. U. S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 [Internet]. Atlanta, Georgia. 2013. [Consultado 2 octubre 21]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
162. World Health Organization & WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use, 5th revision [Internet]. Geneva, Switzerland. 2017. [Consultado 2 octubre 21]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255027/9789241512220-eng.pdf>.
163. Iwamoto M, Reynolds J, Karp BE, Tate H, Fedorka-Cray PJ, Plumblee JR, Hoekstra RM, Whichard JM, Mahon BE. Ceftriaxone-resistant nontyphoidal *Salmonella* from humans, retail meats, and food animals in the United States, 1996-2013. *Foodborne Pathog. Dis.* 2017; 14(2):74-83.

164. Lee HY, Su LH, Tsai MH, Kim SW, Chang HH, Jung SI, Park KH, Perera J, Carlos C, Tan BH, Kumarasinghe G, So T, Chongthaleong A, Hsueh PR, Liu JW, Song JH, Chiu CH. High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2696-9.
165. Voss-Rech D, Potter L, Vaz CS, Pereira DI, Sangioni LA, Vargas AC, de Avila Botton S. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella* Isolated from Human and Poultry-Related Samples in Brazil: 20-Year Meta-Analysis. *Foodborne Pathog Dis.* 2017; 14(2):116-24.
166. Su LH, Wu TL, Chiu CH. Development of carbapenem resistance during therapy for non-typhoid *Salmonella* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:E91-4.
167. Hall RM. *Salmonella* genomic islands and antibiotic resistance in *Salmonella enterica*. *Future Microbiol.* 2010; 5:1525-38.
168. Lauderdale TL, Aarestrup FM, Chen PC, Lai JF, Wang HY, Shiao YR, Huang IW, Hung CL; TSAR hospitals. Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 55(2):149-55.
169. Helms M, Ethelberg S, Molbak K. DT104 Study Group. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:859-67.
170. Chatham-Stephens K, Medalla F, Hughes M, Appiah GD, Aubert RD, Caidi H, Angelo KM, Walravelr AT, Hatley N, Masani S, Nash J, Belko J, Ryan ET, Mintz E, Friedman CR. Emergence of Extensively Drug-Resistant *Salmonella* Typhi Infections Among Travelers to or from Pakistan-United States, 2016-2018. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2019; 68(1):11-3.
171. Mead G, Lammerding AM, Cox N, Doyle MP, Humbert F, Kulikovskiy A, Panin A, do Nascimento VP, Wierup M. *Salmonella* On Raw Poultry Writing Committee. Scientific and technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. *J Food Prot.* 2010; 73(8):1566-90.

172. Campos J, Mourão J, Peixe L, Antunes P. Non-typhoidal salmonella in the pig production chain: A comprehensive analysis of its impact on human health. *Pathogens*. 2019; (1):1-28.

173. European Parliament. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and the Council of 17 November 2003 on the Control of Salmonella and Other Specified Zoonotic Agents [Internet]. 2003 [Consultado 11 Oct 21]. Disponible en://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/ALL/?uri =CELEX % 3A32003R2160.

174. Messens W, Vivas-Alegre L, Bashir S, Amore G, Romero-Barrios P, Hugas M. Estimating the public health impact of setting targets at the European level for the reduction of zoonotic *Salmonella* in certain poultry populations. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(10):4836-50.

175. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Programa Nacional de Control de determinados serotipos de *Salmonella* en gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus* 2022. [Internet]. 2022 [Consultado 30 Dic 21]. Disponible en [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pn-c-sreproductoras2022\\_tcm30-640121.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pn-c-sreproductoras2022_tcm30-640121.pdf).

176. Schmidt S, Sassu EL, Vatzia E, Pierron A, Lagler J, Mair KH, Stadler M, Knecht C, Spargser J, Dolezal M, Springer S, Theuß T, Fachinger V, Ladinig A, Saalmüller A, Gerner W. Vaccination and Infection of Swine With *Salmonella* Typhimurium Induces a Systemic and Local Multifunctional CD4+ T-Cell Response. *Front Immunol*. 2021; 11:603089.

177. Wales AD, Davies RH. *Salmonella* Vaccination in Pigs: A Review. *Zoonoses Public Health*. 2017; 64(1):1-13.

178. Young I, Wilhelm BJ, Cahill S, Nakagawa R, Desmarchelier P, Rajić A. A Rapid Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Slaughter and Processing Interventions to Control Non-Typhoidal *Salmonella* in Beef and Pork. *J Food Prot*. 2016; 79(12):2196-210.

179. Bollaerts K, Messens W, Aerts M, Dewulf J, Maes D, Grijspeerdt K, Van der Stede Y. Evaluation of scenarios for reducing human salmonellosis through household consumption of fresh minced pork meat. *Risk Analysis*. 2010; 30:853–65.
180. Crayford G, Coombes JL, Humphrey TJ, Wigley P. Monophasic expression of FliC by *Salmonella* 4,[5],12:i:- DT193 does not alter its pathogenicity during infection of porcine intestinal epithelial cells. *Microbiology*. 2014; 160(11):2507-16.
181. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal* [Internet]. 2010 [Consultado 1 Oct 21]. 8(10):1826. Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1826>.
182. Machado J, Bernardo F. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. *J Appl Bacteriol* 1990; 69(4):477-80.
183. Echeita MA, Díez R, Usera MA. 1999. Distribución de serotipos de *Salmonella* spp. aislados en España durante un periodo de 4 años (1993–1996). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999; 17:9-14.
184. Dionisi AM, Graziani C, Lucarelli C, Filetici E, Villa L, Owczarek S, Caprioli A, Luzzi I. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (*S.* 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. *Foodborne Pathog Dis*. 2009; 6:711-7.
185. Gallati C, Stephan R, Hachler H, Malorny B, Schroeter A, Nuesch-Inderbinen M. Characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,[5],12:i:- clones isolated from human and other sources in Switzerland between 2007 and 2011. *Foodborne Pathog Dis*. 2013; 10:549-54.
186. Ido N, Lee K, Iwabuchi K, Izumiya H, Uchida I, Kusumoto M, Iwata T, Ohnishi M, Akiba M. Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium. *PLoS One*. 2014; 5;9(8):e104380.

187. Majtan V, Majtanova L, Majtan J. Phenotypic and molecular characterization of human *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- isolates in Slovakia. *Curr Microbiol.* 2011; 63:491-5.
188. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National *Salmonella* Surveillance Annual Report, 2016 [Internet]. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2018. [Consultado 10 En 21]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>.
189. Deng X, Ran L, Wu S, Ke B, He D, Yang X, Zhang Y, Ke C, Klena JD, Yan M, Feng Z, Kan B, Liu X, Mikoleit M, Varma JK. Laboratory-based surveillance of non-typhoidal *Salmonella* infections in Guangdong Province, China. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9(4):305-12.
190. Mulvey MR, Finley R, Allen V, Ang L, Bekal S, El Bailey S, Aldane D, Hoang L, Horsman G, Louie M, Robberts L, Wylie J, McCracken M, Langner S, Ahmed R, Tabor H, Gilmour M. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- involving human cases in Canada: Results from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2003-10. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68:1982-6.
191. Tavechio AT, Fernandes SA, Ghilardi ÂC, Soule G, Ahmed R, Melles CE. Tracing lineage by phenotypic and genotypic markers in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 1,4,[5],12:i:- and *Salmonella* Typhimurium isolated in state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:1042-6.
192. Cuenca-Arias P, Montañó LA, Villarreal JM, Wiesner M. Molecular and phenotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium monophasic variant (1,4,[5],12:i:-) from Colombian clinical isolates. *Biomed.* 2020; 40(4):722-33.
193. Mossong J, Marques P, Ragimbeau C, Huberty-Krau P, Losch S, Meyer G, Moris G, Strottner C, Rabsch W, Schneider F. Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. *Euro Surveill.* 2007;12(6):E11-2.

194. Trüpschuch S, Laverde Gomez JA, Ediberidze I, Flieger A, Rabsch W. Characterisation of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium 4,[5],12:i:-DT193 strains carrying a novel genomic island adjacent to the thrW tRNA locus. *Int J Med Microbiol.* 2010; 300:279-88.
195. Bone A, Noel H, Le Hello S, Pihier N, Danan C, Raguenaud ME, Salah S, Bellali H, Vaillant V, Weill FX, Jourdan-da Silva N. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15(24):19592.
196. Hernández-Arricibita E, Santamaria-Zuazua R, Ramos-López G, Herrera-León S, Kárkamo-Zuñeda JA, Muniozguren-Agirre N. Brote de infecciones por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium asociado al consumo de chorizo en Bizkaia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34(9):577-8.
197. Arnedo-Pena A, Sabater-Vidal S, Herrera-León S, Bellido-Blasco JB, Silvestre-Silvestre E, Meseguer-Ferrer N, Yague-Muñoz A, Gil-Fortuño M, Romeu-García A, Moreno-Muñoz R. An outbreak of monophasic and biphasic *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Derby associated with the consumption of dried pork sausage in Castellon (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34(9):544-50.
198. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal.* 2014; 12(2):3547.
199. Gomes-Neves E, Antunes P, Manageiro V, Gärtner F, Caniça M, da Costa JM, Peixe L. Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir. *Vet Microbiol.* 2014; 168(1):229-33.
200. Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, Rabsch W, Appel B, Fruth A, Malorny B. Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(14):4601-10.

201. Yamamoto S, Kutsukake K. FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2006; 188:958-67.
202. Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *J Bacteriol.* 2003; 185:3567-74.
203. Soyer K, Soni V, Waltman D, Sanchez S, Theriault EC, Bray J, Maurer JJ. Molecular characterization reveals *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- from poultry is a variant Typhimurium serovar. *Avian Dis.* 2007; 51:958-64.
204. Soyer Y, Moreno Switt A, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Root T, Warnick LD, Gröhn YT, Wiedmann M. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(11):3546-56.
205. Wasyl D, Hoszowski A. Occurrence and characterization of monophasic *Salmonella enterica* serovar typhimurium (1,4,[5],12:i:-) of non-human origin in Poland. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9:1037-43.
206. Elnekave E, Hong S, Mather AE, Boxrud D, Taylor AJ, Lappi V, Johnson TJ, Vanucci F, Davies P, Hedberg C, Pérez A, Álvarez J. *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- in swine in the United States Midwest: an emerging multidrug resistant clade. *Clin Infect Dis.* 2018; 66(6):877-85.
207. Boland C, Bertrand S, Mattheus W, Dierick K, Jasson V, Rosseel T, Van Borm S, Mahillon J, Wattiau P. Extensive genetic variability linked to IS26 insertions in the fljB promoter region of atypical monophasic variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81(9):3169-75.
208. Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, Frye J, Usera MA, McClelland M. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(6):2074-8.

209. Barco L, Longo A, Lettini AA, Cortini E, Saccardin C, Minorello C, Olsen JE, Ricci A. Molecular characterization of "inconsistent" variants of *Salmonella* Typhimurium isolated in Italy. *Foodborne Pathog Dis.* 2014; 11:497-9.
210. Echeita Sarrionandia MA, Herrera León S, Simón Baamonde C. Gastroenteritis invasivas, ¿algo nuevo? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(Supl 3):55-60.
211. Echeita MA, Herrera S, Usera MA. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(8):2981-3.
212. Guerra B, Junker E, Helmuth R. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among German *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:2712-5.
213. de la Torre E, Zapata D, Tello M, Mejía W, Frías N, García Peña FJ, Mateu EM, Torre E. Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(6):2395-400.
214. Amavisit P, Boonyawiwat W, Bangtrakulnont A. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:2736-40.
215. Echeita MA, Herrera S, Usera MA. Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:2981-3.
216. Burnens AP, Stanley J, Sack R, Hunziker P, Brodard I, Nicolet J. The flagellin N-methylase gene *fliB* and an adjacent serovar-specific IS200 element in *Salmonella* typhimurium. *Microbiology.* 1997; 143:1539-47.
217. Arai N, Sekizuka T, Tamamura Y, Tanaka K, Barco L, Izumiya H, Kusumoto M, Hinenoya A, Yamasaki S, Iwata T, Watanabe A, Kuroda M, Uchida I, Akiba M. Phylogenetic Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and

Its Monophasic Variant Isolated from Food Animals in Japan Revealed Replacement of Major Epidemic Clones in the Last 4 Decades. *J Clin Microbiol.* 2018; 56(5):e01758-17.

218. Hauser E, Pietrucci D, Barco L, Ammendola S, Petrin S, Longo A, Mantovani C, Battistoni A, Ricci A, Desideri A, Losasso CA. Comparative Genomic Analysis Provides Novel Insights Into the Ecological Success of the Monophasic *Salmonella* Serovar 4,[5],12:i:-. *Front Microbiol.* 2018; 9:715.

219. Sun H, Wan Y, Du P, Bai L. The epidemiology of monophasic *Salmonella* typhimurium. *Foodborne Pathog Dis.* 2020; 17:87-97.

220. García P, Petrovska B, Bances M, Mendoza MC, Rodicio R. IncA/C plasmids mediate antimicrobial resistance linked to virulence genes in the Spanish clone of the emerging *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:2. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 543-9.

221. Laorden L, Herrera-León S, Martínez I, Sanchez A, Kromidas L, Bikandi J, Rementeria A, Echeita A, Garaizar J. Genetic evolution of the Spanish multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- monophasic variant. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(12):4563-6.

222. Guerra B, Laconcha I, Soto SM, González-Hevia MA, Mendoza MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 190:341-7.

223. Busani L, Graziani C, Battisti A, Franco A, Ricci A, Vio D, Digiannatale E, Paterlini F, D'Incau M, Owczarek S, Caprioli A, Luzzi I. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiol Infect.* 2004; 132(2):245-51.

224. Lucarelli C, Dionisi AM, Torpdahl M, Villa L, Graziani C, Hopkins K, Threlfall J, Caprioli A, Luzzi I. Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(6):2103-9.

225. Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, Jakubczak A, Threlfall EJ, Mevius DJ. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain?. *Euro Surveill.* 2010; 15:19580.

226. García P, Malorny B, Rodicio MR, Stephan R, Hächler H, Guerra B, Lucarelli C. Horizontal Acquisition of a Multidrug-Resistance Module (R-type ASSuT) Is Responsible for the Monophasic Phenotype in a Widespread Clone of *Salmonella* Serovar 4,[5],12:i:-. *Front Microbiol.* 2016; 7:680.

227. Moreno Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathog Dis.* 2009; 6:407-15.

228. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National *Salmonella* Annual Summary, 2007 [Internet]. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011 [Consultado 3 En 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/salmonella-annual-summary-2007-508c.pdf>.

229. Petrovska L, Mather AE, Abuoun M, Branchu P, Harris SR, Connor T, Hopkins KL, Underwood A, Lettini AA, Page A, Bagnall M, Wain J, Parkhill J, Dougan G, Davies R, Kingsley RA. Microevolution of Monophasic *Salmonella* Typhimurium during Epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(4):617-24.

230. Mourão J, Machado J, Novais C, Antunes P, Peixe L. Characterization of the emerging clinically-relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- (monophasic variant of *S. Typhimurium*) clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(12):2249-57.

231. Arrieta-Gisasola A, Atxaerandio-Landa A, Garrido V, Grilló MJ, Martínez-Ballesteros I, Laorden L, Garaizar J, Bikandi J. Genotyping Study of *Salmonella* 4,[5],12:i:- Monophasic Variant of Serovar Typhimurium and Characterization of

the Second-Phase Flagellar Deletion by Whole Genome Sequencing. *Microorganisms*. 2020; 8(12):2049.

232. EFSA y ECDC (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades). Informe resumido de la Unión Europea sobre tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario en 2017. *EFSA Journal* [Internet]. 2018 [Consultado 2 Oct 21].16(12):5500. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>.

233. Guerra JBP, Yamatogi RS, Possebon FS, Fernandes SA, Tiba-Casas MR, Lara GHB, Ribero MG, Pinto JPAN. Frequency, serotyping and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* from feces and lymph nodes of pigs. *Pesqu Vet Bras*. 2016; 36:1165-70.

234. Lucarelli C, Dionisi AM, Filetici E, Owczarek S, Luzzi I, Villa L. Nucleotide sequence of the chromosomal region conferring multidrug resistance (R-type ASSuT) in *Salmonella* Typhimurium and monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. *J Antimicrobial Chemother*. 2012; 67:111-4.

235. Slade RD, Kyriazakis I, Carroll SM, Reynolds FH, Wellock IJ, Broom LJ, Miller HM. Effect of rearing environment and dietary zinc oxide on the response of group-housed weaned pigs to enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 challenge. *Animal*. 2011; 5:1170-8.

236. Mastroilli E, Pietrucci D, Barco L, Ammendola S, Petrin S, Longo A, Mantovani C, Battistoni A, Ricci A, Desideri A, Losasso C. A Comparative Genomic Analysis Provides Novel Insights Into the Ecological Success of the Monophasic *Salmonella* Serovar 4,[5],12:i:-. *Front Microbiol*. 2018; 9:715.

237. Seixas R, Machado J, Bernardo F, Vilela C, Oliveira M. Biofilm formation by *Salmonella* enterica serovar 1,4,5,12:i:- Portuguese isolates: a phenotypic, genotypic, and socio-geographic analysis. *Curr Microbiol*. 2014; 68:670-7.

238. Barilli E, Bacci C, StellaVilla Z, Merialdi G, D'Incau M, Brindani F, Vismarra A. Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in *Salmonella* isolated from pigs bred on intensive farms. *Ital J Food Saf*. 2018; 7(2):7223.

239. Arya G, Holtslander R, Robertson J, Yoshida C, Harris J, Parmley J, Nichani A, Johnson R, Poppe C. Epidemiology, Pathogenesis, Genosero typing, Antimicrobial Resistance, and Prevention and Control of Non-Typhoidal *Salmonella* Serovars. *Curr Clin Microbiol Rep*. 2017; 4:43-53.
240. Bonardi S. *Salmonella* in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. *Epidemiol Infect*. 2017; 145(8):1513-26.
241. De Knecht LV, Pires SM, Hald T. Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. *Epidemiol Infect*. 2015; 143:1175-86.
242. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2015, Annual Report [Internet]. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2017 [Consultado 3 En 2020]. Disponible en: [https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/2015FoodBorneOutbreaks\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/2015FoodBorneOutbreaks_508.pdf).
243. Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Wray C. *Salmonella* infections in pigs. En: Wray C, Wray A, editores. *Salmonella* in Domestic Animals. Wallingford: CAB International, 2000, pp.191–207.
244. Hurd HS, McKean JD, Griffith RW, Wesley IV, Rostagno MH. *Salmonella enterica* infections in market swine with and without transport and holding. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(5):2376-81.
245. European Food Safety Authority. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007- Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*. 2008; 135:1-111.
246. Vico JP, Rol I, Garrido V, San Roman B, Grilló MJ, Mainar-Jaime RC. Salmonellosis in finishing pigs in Spain: prevalence, antimicrobial agent susceptibilities and risk factor analysis. *J Food Prot*. 2011; 74:1070-8.
247. Yuan C, Krull A, Wang C, Erdman M, Fedorka-Cray PJ, Logue CM, O'Connor AM. Changes in the prevalence of *Salmonella* serovars associated swine

production and correlations of avian, bovine and swine-associated serovars with human-associated serovars in the United States (1997-2015). *Zoonoses Public Health*. 2018; 65(6):648-61.

248. Naberhaus SA, Krull AC, Arruda BL, Arruda P, Sahin O, Schwartz KJ, Burrough ER, Magstadt DR, Matias Ferreyra F, Gatto IRH, Meiroz de Souza Almeida H, Wang C, Kreuder AJ. Pathogenicity and Competitive Fitness of *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- compared to *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in Swine. *Front Vet Sci*. 2020; 6:502.

249. Teng KT, Martínez Avilés M, Ugarte-Ruiz M, Barcena C, de la Torre A, Lopez G, Moreno MA, Dominguez L, Alvarez J. Spatial Trends in *Salmonella* Infection in Pigs in Spain. *Front Vet Sci*. 2020; 7:345.

250. Alt K, Simon S, Helmeke C, Kohlstock C, Prager R, Tietze E, Rabsch W, Karagiannis I, Werber D, Frank C, Fruth A. Outbreak of uncommon O4 non-agglutinating *Salmonella* typhimurium linked to minced pork, Saxony-Anhalt, Germany, January to April 2013. *PLoS One*. 2015; 10(6):e0128349.

251. de Frutos M, López-Urrutia L, Berbel C, Allue M, Herrera S, Azcona JM, Beristaín X, Aznar E, Albert M, Ruiz C, Eiros JM. Brote de *Salmonella* Typhimurium monofásica asociada al consumo de carne asada de cerdo [Monophasic *Salmonella* Typhimurium outbreak due to the consumption of roast pork meat]. *Rev Esp Quimioter*. 2018; 31(2):156-9.

252. Bonardi S, Alpighiani I, Bruini I, Barilli E, Brindani F, Morganti M, Cavallini P, Bolzoni L, Pongolini S. Detection of *Salmonella enterica* in pigs at slaughter and comparison with human isolates in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2016; 218:44-50.

253. Zamperini K, Soni V, Waltman D, Sanchez S, Theriault EC, Bray J, Maurer JJ. Molecular characterization reveals *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- from poultry is a variant Typhimurium serovar. *Avian Dis*. 2007; 51(4):958-64.

254. Alcaine SD, Sukhnanand SS, Warnick LD, Su WL, McGann P, McDonough P, Wiedmann M. Ceftiofur-resistant *Salmonella* strains isolated from dairy farms represent multiple widely distributed subtypes

that evolved by independent horizontal gene transfer. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(10):4061-7.

255. Mody RK, Meyer S, Trees E, White PL, Nguyen T, Sowadsky R, Henao OL, Lafon PC, Austin J, Azzam I, Griffin PM, Tauxe RV, Smith K, Williams IT. Outbreak of *Salmonella* enterica serotype 1,4,5,12:i:- infections: the challenges of hypothesis generation and microwave cooking. *Epidemiol Infect.* 2014;142(5):1050-60.

256. Guillier L, Danan C, Bergis H, Delignette-Muller ML, Granier S, Rudelle S, Beaufort A, Brisabois A. Use of quantitative microbial risk assessment when investigating foodborne illness outbreaks: the example of a monophasic *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:i:- outbreak implicating beef burgers. *Int J Food Microbiol.* 2013; 166(3):471-8.

257. Oviaño-García M, Rodríguez Sánchez B, Caballero-Pérez J de D, Muñoz-Bellido JL. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Procedimiento en Microbiología Clínica 65: Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica [Internet]. Cercenado-Mansilla E, Cantón-Moreno R, editores; 2019 [Consultado 17 Nov 2019]. Disponible en: [https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento-microbiologia65 .pdf](https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento-microbiologia65.pdf).

258. Queroa S, Párraga-Nino N, García-Núñez M, Sabrià M. Revisión Proteómica en enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34(4):253-60.

259. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. Revisión La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(10):635-44.

260. Lay Jr JO, Holland RD. Rapid identification of bacteria based on spectral patterns using MALDI-TOF MS. *Methods Mol Biol.* 2000; 146:461-87.

261. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk, DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26: 547-603.
262. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1996; 14:1584-6.
263. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO Jr. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996; 10(10):1227-32.
264. Culebras E, Alvarez-Buylla A, Jose Artacho Reinoso M, Antonio Lepe J. Estudios de tipificación con MALDI-TOF [Studies of bacterial typing with MALDI-TOF]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34 (Supl 2):42-6.
265. Spinali S, van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, Pincus DH, Arzac M, Durand G. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation?. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(3):760-5.
266. Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2009; 4:732-42.
267. Cabrolier N, Sauget M, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:1395-8.
268. Mulet X, García R, Gayá M, Oliver A. O-antigen serotyping and MALDI-TOF, potentially useful tools for optimizing semi-empiric antipseudomonal treatments through the early detection of high-risk clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38:541-4.
269. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T. Rapid identification and typing of listeria species by

matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(17):5402-7.

270. Oviaño M, Rodríguez-Sánchez B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed).* 2021; 39(4):192-200.

271. Vila J, Zboromyrska Y, Burillo A, Bouza E. Perspectivas de futuro de la espectrometría de masas en microbiología [Future applications of mass spectrometry in microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34 (Supl 2):53-8.

272. Cheng K, Chui H, Domish L, Hernandez D, Wang G. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics - Clin Appl.* 2016; 10(4):346-57.

273. Bilecen K, Yaman G, Ciftci U, Laleli YR. Performances and Reliability of Bruker Microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF Mass Spectrometry Systems for the Identification of Clinical Microorganisms. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:516410.

274. Deak E, Charlton CL, Bobenchik AM, Miller SA, Pollett S, McHardy IH, Wu MT, Garner OB. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 ;81(1):27-33.

275. Porte L, García P, Braun S, Ulloa MT, Lafourcade M, Montaña A, Miranda C, Acosta-Jamett G, Weitzel T. Head-to-head comparison of Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry in Chile. *PLoS One.* 2017; 12(5):e0177929.

276. Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis.* 2013; 57(4):564-72.

277. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio.* 2018; 22(1): 35-45.

278. Hernández AP, Ballester-Téllez M, Galán-Sánchez F, Iglesias MR. Aplicación de la espectrometría de masas en la identificación de bacterias [Application of mass spectrometry to bacterial identification]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016; 34 (Supl 2):8-18.
279. Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74(24):7767-78.
280. Leuschner RGK, Beresford-Jones N, Robinson C. Difference and consensus of whole cell *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry spectra. *Lett Appl Microbiol*. 2004; 38:24-31.
281. Dieckmann R, Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(12):4136-46.
282. Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, Grob U. Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2012; 7(6):e40004.
283. Cores-Calvo O, Valero-Juan LF, García-Sánchez E, García-Sánchez JE, García-García MI. Cambios en la epidemiología de las gastroenteritis causadas por *Salmonella* durante 2005-2014 en Salamanca, España. *Rev Esp Quimioter*. 2016; 29(2):91-8.
284. Sala Farré MR, Osorio Sánchez D, Arias Varela C, Simó Sanahuja M, Recasens Recasens A, Pérez Jové J. Aspectos epidemiológicos y carga asistencial de gastroenteritis agudas por *Campylobacter* y *Salmonella* [*Campylobacter* and *Salmonella* acute gastroenteritis: epidemiology and health care utilization]. *Med Clin (Barc)*. 2015; 145(7):294-7.
285. Moreno-Flores A, Martínez-López J, Pulian-Morais V, García-Campello M. Evolución de la salmonelosis no tifoidea en el norte de la provincia de

Pontevedra, España (2003-2010) [Evolution of non-typhoidal salmonellosis in the north of the province of Pontevedra, Spain (2003-2010)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31(2):120-1.

286. Rodríguez Fde C, Solís Cuesta F, Navarro F, Muñoz J, Tejero R, Ibarra González A, Linares Sicilia MJ, Casal M. *Salmonella* spp. Serotipos aislados en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba durante un período de 8 años (1993-2000) [*Salmonella* spp. serotypes isolated at the Hospital Universitario Reina Sofía in Córdoba during an 8-year period, 1993-2000]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2002; 20(5):208-11.

287. Gil-Setas A, Mazón Ramos A, Martín Salas C, Urtiaga Domínguez M, Inza Elia ME. Salmonellosis no tifoidea en un Area de Salud de Navarra, España [Non-typhoid salmonellosis in in a basic health area of Navarra, Spain]. *Rev Esp Salud Publica*. 2002; 76(1):49-56.

288. González-Hevia MA, Cruz Martín M, Lobato MJ, Gutiérrez F, Solano P, Alvarez-Riesgo JA. *Salmonella* y salmonellosis en el Principado de Asturias durante un período de siete años (1990-1996) [*Salmonella* and salmonellosis in the Asturias District, Spain, during a seven year period (1990-1996)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999; 17(4):166-70.

289. Li X, Singh N, Beshearse E, Blanton JL, DeMent J, Havelaar AH. Spatial Epidemiology of Salmonellosis in Florida, 2009–2018. *Front Public Heal*. 2021;8.

290. Frasson I, Bettanello S, De Canale E, Richter SN, Palù G. Serotype epidemiology and multidrug resistance patterns of *Salmonella* enterica infecting humans in Italy. *Gut Pathog*. 2016; 8(1):26.

291. Seixas R, Nunes T, Machado J, Tavares L, Owen SP, Bernardo F, Oliveira M. Demographic characterization and spatial cluster analysis of human *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- infections in Portugal: A 10year study. *J Infect Public Health*. 2018; 11(2):178-182.

292. Ziehm D, Dreesman J, Campe A, Kreienbrock L, Pulz M. Risk factors associated with sporadic salmonellosis in adults: a case-control study. *Epidemiol Infect.* 2013; 141(2):284-92.
293. Ziehm D, Rettenbacher-Riefler S, Kreienbrock L, Campe A, Pulz M, Dreesman J. Risk factors associated with sporadic salmonellosis in children: a case-control study in Lower Saxony, Germany, 2008-2011. *Epidemiol Infect.* 2015; 143(4):687-94.
294. Arnedo-Pena A, Vivas-Fornas I, Meseguer-Ferrer N, Tirado-Balaguer MD, Yagüe-Muñoz A, Herrera-León S, Herrera-León L, Sabater-Vidal S, Romeu-García MA, Vizcaino-Batlles A, Bellido-Blasco JB, Moreno-Muñoz M. Risk factors of sporadic of *Salmonella* and *Salmonella* typhimurium infections in Castellon (Spain): a matched case-control study. *Rev Enf Emerg.* 2019; 18(1):7-16.
295. Arnedo-Pena A, Bellido-Blasco JB, Romeu-Garcia MA, Meseguer-Ferrer N. Detection of foodborne *Salmonella* Typhimurium outbreaks. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017; 35(7):470-1.
296. McCarthy N, Giesecke J. Case-case comparison to study causation of common infectious diseases. *Int J Epidemiol.* 1999; 28(4):764-8.
297. Knoblauch AM, Bratschi MW, Zuske MK, Althaus D, Stephan R, Hächler H, Baumgartner A, Prager R, Rabsch W, Altpeter E, Jost M, Mäusezahl M, Hatz C, Kiefer S. Cross-border outbreak of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Bovismorbificans: multiple approaches for an outbreak investigation in Germany and Switzerland. *Swiss Med Wkly.* 2015; 145:w14182.
298. Martínez-Avilés M, Garrido-Esteba M, Álvarez J, de la Torre A. *Salmonella* surveillance systems in swine and humans in Spain: a review. *Vet Sci.* 2019; 6:20.
299. Sanchez-Maldonado AF, Aslam M, Service C, Narváez-Bravo C, Avery BP, Johnson R, et.al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from two pork processing plants in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.* 2017; 241:49-59.

300. Bellido-Blasco JB, Celades-Porcar ME, Tirado-Balaguer MD, González-Cano JM, Gil-Fortuno M, Arnedo-Pena A. Estudio de la diarrea infecciosa en Castellón (EDICS): incidencia poblacional de casos esporádicos en 2004 y su comparación con el año 2000. *Med Clin (Barc)*. 2006; 127:448–50.
301. Piras F, Spanu C, Mocci AM, Demontis M, Santis EPL, Scarano C. Occurrence and traceability of *Salmonella* spp. in five Sardinian fermented sausage facilities. *Ital J Food Saf*. 2019; 8(1):8011.
302. Gossner CM, van Cauteren D, le Hello S, Weill FX, Terrien E, Tessier S, Janin C, Brisabois A, Dusch V, Vaillant V et al. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:l:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Euro Surveill*. 2012; 17(5):1-4.

# **ANEXOS**

## ANEXO I. CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO/CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Nº Paciente: \_\_\_\_\_

Edad                      Sexo                      Localidad                      País de origen (caso  
de los niños los padres):                      Fecha entrevista:

Situación actual (enfermo o asintomático):                      Fecha inicio síntomas:  
Hospitalización: NO      SI: Duración

¿Sufre alguna enfermedad crónica? NO      SI: Detallar

¿A qué atribuye la infección?

¿Contacto con pacientes con diarrea?

¿Tiene animales domésticos? NO      SI: Detallar

Toma de antibióticos 15 días antes: NO      SI: Detallar

Viajes últimos 15 días (fecha, lugares):

Jugar con la tierra/trabajos de jardinería:

Consumo de productos del cerdo/ huevos (días x semana) en los 15 días previos a la clínica

Nunca    Raro    1    2    3    4    5    6    7

**Productos del Cerdo**

**Curados-consumo crudo**

Jamón Serrano

Panceta-bacon-tocino

Longaniza seca o de Pascua

Fuet-Secallona-Espetec

Salchichón/Salami/Chorizo

Lomo embuchado-Morcón

Sobrasada

**Cocción-consumo crudo**

Jamón de York

Mortadela-Catalana

Chopped cerdo

Salchichas Frankfurt

Butifarra

Paté cerdo

**Fritos-cocidos**

Longaniza

Morcilla

Butifarra

Costilla

Lomo

**Huevos**

Gallina, pato, codorniz,

Mayonesa casera

Tortilla

Huevos crudos

-Lugar habitual de compra (de productos del cerdo y huevos):

## ANEXO II. TABLA ANONIMIZADORA

Número	Nombre del paciente	SIP	Nº de Historia Clínica
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
....			

### ANEXO III. CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Nº Paciente	Fecha aislamiento cepa	Sexo	Edad	Nacionalidad	Procedencia	Serotipo	Estudio de Sensibilidad
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
...							

# ANEXO IV. INFORME COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓ

CEIm



GENERALITAT  
VALENCIANA



CASTELLÓ  
DEPARTAMENT DE SALUT

## INFORME COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS (CEIm) HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓ

Doña Amparo Barreda Aznar, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital General Universitario de Castelló,

### CERTIFICA

Que el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓ en su reunión del día 28 de mayo de 2018, acta 5/2018, tras la evaluación de la propuesta realizada por: M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer del Proyecto de investigación "Factores de riesgo de casos esporádicos de gastroenteritis por la variante monofásica de Salmonella Typhimurium 1.4, (5), 12:1-: un estudio caso-caso. Evaluación de la utilidad de la espectromía de masas para diferenciar distintos serotipos de Salmonella spp". Protocolo versión 2 de junio de 2018 y HIP/CI versión 2 de junio de 2018.

Servicio: Microbiología H.G.U. Castellón  
Investigador Principal: M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer

Y teniendo en consideración las siguientes cuestiones:

1. Cuestiones relacionadas con la idoneidad del investigador y sus colaboradores.
2. Cuestiones relacionadas con la idoneidad de las instalaciones.
3. Cuestiones relacionadas con la idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se consideran justificados los riesgos y las molestias previsibles para el sujeto.
4. Consideraciones generales del estudio.

### EMITE UN INFORME FAVORABLE.

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 223/2004, y su composición actual es la siguiente:

<b>Presidente</b>	
<b>Vicepresidente</b>	<b>D. Raimundo García Boyero</b> Facultativo Especialista Hematología
<b>Secretaria</b>	<b>D<sup>a</sup> Amparo Barreda Aznar</b> Farmacéutica Atención Primaria
<b>Vocales</b>	<b>D<sup>a</sup> Amparo Andrés Pruñonosa</b> Graduada en Enfermería <b>D. José Vicente Castelló Carrascosa</b> Facultativo Especialista Alergología <b>D<sup>a</sup> Berta Claramonte Clausell</b> Facultativo Especialista Neurología <b>D. Juan Vicente Esplugues Mota</b> Farmacólogo Clínico <b>D<sup>a</sup> Ana Fernández Herrero</b> Miembro ajeno a la profesión sanitaria. Licenciada en Derecho <b>D<sup>a</sup> Amparo Ferrandiz Selles</b> Jefe de Servicio UCI

**D. Raúl Ferrando Piqueres**

Farmacéutico Hospitalario

**D. Mario Ferrer Vázquez**

Facultativo Especialista Pediatría

**D<sup>a</sup> Eufemia Marcos González**

Diplomada en Trabajo Social

**D<sup>a</sup> Estel Ortells Ros**

Facultativo Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.

**D. Antonio Palau Canos**

Facultativo Especialista Medicina Digestiva

**D<sup>a</sup> Maria Teresa Pitarch Saborit**

Miembro lego

**D<sup>a</sup> Neus Rodríguez Bacardit**

Facultativo Especialista Medicina Familiar y Comunitaria

**D<sup>a</sup> Maria Esther Roselló Sastre**

Facultativo Especialista Anatomía Patológica

**D. Carlos J. Soriano Navarro**

Facultativo Especialista Cardiología

**D. Juan Francisco Tosca Flores**

Licenciado en Medicina y Cirugía. Experto en BPC

Que en dicha reunión del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

Que en el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Lo que firmo en Castellón a 13 de junio de 2018

Fdo. Amparo Barreda Aznar  
Secretaria



## ANEXO V. AUTORIZACIÓN DE LA RESPONSABLE DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA

### Visto Bueno del Jefe de Servicio

Dra. Rosario Moreno Muñoz, Jefa del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón

### CERTIFICA:

Que conoce y acepta la realización en su servicio del proyecto de Investigación titulado:

“Factores de riesgo de casos esporádicos de gastroenteritis por la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-: estudio caso-caso. Evaluación de la utilidad de la espectrometría de masas para diferenciar distintos serotipos de *Salmonella spp.*”.

Que está de acuerdo con que este proyecto de investigación se lleve a cabo por la Investigadora principal: M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer.



Castellón 3 de Mayo de 2018

GENERALITAT  
VALENCIANA

Conselleria de Sanitat  
Universal i Salut Pública

Servici de Microbiologia  
Hospital General Universitari de Castelló

Fdo. Dra Rosario Moreno Muñoz

## ANEXO VI. CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL

**Título del estudio:** “Factores de riesgo de casos esporádicos de gastroenteritis por la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-: un estudio caso-caso. Evaluación de la utilidad de la espectrometría de masas para diferenciar distintos serotipos de *Salmonella* spp” v2 de Junio de 2018

**Nombre y Apellidos del paciente** (en caso de ser menor del tutor/a legal):

-----

-¿Desea participar?                      SI      NO

-¿Permite VD que en caso necesario accedamos a su historia clínica?      SI      NO

### Consentimiento expreso

Dadas las características del estudio y que las entrevistas se realizan telefónicamente, además de responder afirmativamente a la pregunta de si desea participar, se remitirá al paciente la Hoja de Información al Paciente vía correo electrónico y éste dará su consentimiento por escrito respondiendo a un formulario de Google Drive creado para tal fin cuyo acceso (<https://drive.google.com/open?id=1bEcNqiOs2DYY-syPIhn4VHBHYzYS1jOfleiK3vtAH3w>) se remitirá en el mismo correo. También se dispone de un modelo de consentimiento por escrito (anexo 4) en caso de requerirlo que una vez firmado se devolverá a la investigadora por cualquiera de las siguientes vías: correo electrónico o correo postal, ordinario o a través de la valija de su Centro de Salud de Atención Primaria a la atención de la investigadora (M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer), Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Castellón.

Para que la investigación se lleve a cabo con escrupuloso respeto a los principios éticos y no quede duda de la voluntad de participación, se identifica al investigador responsable de la recogida de datos.

La investigadora que realiza la entrevista: M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer

**Fecha:** ...../...../.....

## **ANEXO VII. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE ORAL**

(Contacto verbal telefónico con la persona)

### **Título del proyecto:**

“Factores de riesgo de casos esporádicos de gastroenteritis por la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-: un estudio caso-caso. Evaluación de la utilidad de la espectrometría de masas para diferenciar distintos serotipos de *Salmonella* spp”

### **Presentación:**

Mi nombre es M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer médico del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón

Estoy realizando un estudio sobre gastroenteritis/diarrea por *Salmonella* en Castellón para tratar de averiguar cómo prevenir estas enfermedades. Por ello solicitamos su cooperación que puede ser de mucho valor.

### **Procedimiento del estudio:**

-En el caso que desee participar, le haremos una serie de preguntas sobre su salud y hábitos alimenticios, mediante un cuestionario estandarizado.

-Si desea participar, y en el caso en que fuera necesario para la valoración del estudio, le solicitamos su autorización para poder consultar a través de su médico su historia clínica.

### **Aclaraciones a realizar en la llamada telefónica**

- Su participación es de carácter voluntario y en cualquier momento puede abandonar el estudio, sin perjuicio alguno por su parte.

- Podrá recibir información sobre el estudio.

- La información personal que se obtenga para la identificación de cada paciente será mantenida en la más estricta confidencialidad, y sólo el investigador, las autoridades sanitarias y el CEIM podrá consultarlas.

- Los datos recogidos podrán ser utilizados de forma anónima para la divulgación científica, salvaguardando su intimidad.

-Si tiene cualquier duda o necesita alguna aclaración puede ponerse en contacto con la médico M<sup>a</sup> Dolores Tirado en el teléfono 964725102 (extensión 454504).

## ANEXO VIII. CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

**Título del estudio:** “Factores de riesgo de casos esporádicos de gastroenteritis por la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-: un estudio caso-caso. Evaluación de la utilidad de la espectrometría de masas para diferenciar distintos serotipos de *Salmonella* spp” v2 de Junio de 2018

Yo,

(nombre y apellidos).

He leído la hoja de información que se me ha enviado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: M<sup>a</sup> Dolores Tirado Balaguer (investigadora principal)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo decidir no participar en el estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha: ...../.../....

Fecha: ..../..../.....

Firma del participante:

Firma del investigador: