

Fenotipos bioquímicos y fagotipos de cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas en Antofagasta, 1997-2000

Juan Silva A^a, Carmen Aravena M^b, Jorge Araya R^c, Patricia Colque-Navarro^d, Inger Kühn^e, Roland Möllby^f.

Biochemical phenotypes and phage types of Salmonella enteritidis strains isolated in Antofagasta during the period 1997-2000

Background: PhP-S48 (Phene Plate Techniques AB), a method based on biochemical phenotypes has been developed and used successfully to typify *S enteritidis* strains in epidemiological studies. **Aim:** To identify phenotypes of *S enteritidis* isolated from eggs, chicken meat and infected humans in Antofagasta during the period 1997-2000. **Material and Methods:** PhP-S48 and phage typing were used to identify phenotypes of 33 *S enteritidis* strains, sixteen isolated from poultry and 17 from clinical sources. *S enteritidis* ATCC17036 was used as control strain. **Results:** Twelve biochemical phenotypes (BTs) including 4 common (C) and 8 single (S) were identified. BTs C1 y C3 containing 16 and 5 strains, respectively, accounted for 63.6% of the isolates. BT C1 was found in poultry and human sources in the period 1997-2000, and BT C3 was isolated from humans, in the period 1999-2000. Using phage typing, 5 phage types (PT) and 3 strains could be not typed (NTs). PT1 and PT21 were the dominant phage types, with 14 and 13 strains respectively. Strains of PT1 were isolated from poultry and human sources in the period 1997-2000. PT21 was found in poultry samples in the period 1997-1998 and in clinical samples, in the period 1997-1998. Combination of biochemical phenotypes and phage typing divided the strains into 5 phenotypes (BT:PT). Two phenotypes were the most frequently isolated, phenotype C1:1 with 8 isolates found in eggs and humans in 1999, and phenotype C1:21 with 5 strains isolated in 1997-1999. **Conclusions:** These results indicate the presence of one persistent and one recently emerged phenotype among *S enteritidis* in Antofagasta, Chile. PhP-S48 also provided information about a relationship among the strains (Rev Méd Chile 2003; 131: 837-45).

(Key-words: Eggs; Poultry products; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella* phages)

Recibido el 30 de septiembre, 2002. Aceptado en versión corregida el 10 de junio, 2003. Trabajo financiado por proyecto FNDR-3328, Gobierno II Región, Chile y PEI BO11 DINV, Universidad de Antofagasta.

Departamento de Tecnología Médica-INDES, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile. Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia.

^aTecnólogo Médico, Magister en Microbiología, PhD en Biología. ^bBioquímico, Magister en Ciencias Biomédicas (C). ^cTecnólogo Médico, Doctor en Microbiología e Inmunología. ^dIngeniero Agrónomo, Licenciado en Microbiología. ^ePhD en Microbiología. ^fMédico, PhD en Microbiología.

Correspondencia a: Dr. Juan Silva. Departamento Tecnología Médica-INDES. Universidad de Antofagasta. Avenida Coloso s/n. Antofagasta, Chile. Fonofax: (56-55) 637 207. E mail: jsilva@uantof.cl

Durante las últimas dos décadas, *Salmonella enteritidis* ha sido reconocido como uno de los principales agentes etiológicos que causa infecciones gastrointestinales a nivel mundial^{1,2}. Estas infecciones ocurren generalmente por el consumo de huevos o productos avícolas contaminados³⁻⁵. En Sudamérica, los primeros hallazgos en que describieron infecciones por este microorganismo ocurrieron a mediados de la década de 1990-99, originando brotes epidémicos en Argentina, Brasil y Chile^{6,7}. En Chile, *S enteritidis* emergió con características epidémicas en 1994, afectando a un gran número de personas, con tasas que aumentaron en 3.000 por ciento con respecto a años anteriores². Durante el período epidémico, 1994-1996, 90% de las notificaciones de casos con infecciones por este microorganismo provinieron de Arica y Antofagasta⁷ y gran parte de estas infecciones alimentarias fueron atribuidas al consumo de huevos. Posteriormente, *S enteritidis* se ha diseminado por todas las regiones de Chile, constituyéndose en un patógeno humano endémico y, por consiguiente, en un importante problema de salud pública⁸.

Diversos autores han tratado de explicar las razones de la emergencia de las infecciones por *S enteritidis* en Chile, sugiriendo que los aislamientos de *S enteritidis* en nuestro país fueron introducidos en los planteles avícolas, por la importación de aves reproductoras de otros países^{8,9}.

En los estudios epidemiológicos de *S enteritidis* se han utilizado diversos marcadores para discriminar acerca de los tipos o clones circulantes, durante los brotes epidémicos. Algunos investigadores sostienen que los métodos genético-moleculares son altamente efectivos, confirmando su enorme potencial para el diagnóstico de estos agentes infecciosos; como es el caso de la electroforesis de campo pulsado (PFGE)^{10,11}, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{12,13}, amplificación randómica de ADN polimórfico (RAPD PCR)¹⁴ y la ribotipificación¹⁵⁻¹⁷. Todas estas técnicas presentan diferencias en el grado de discriminación de las cepas y los resultados han sido un poco variables; además, la poca accesibilidad a los laboratorios de hospitales por su elevado costo y manejo de las técnicas, hacen difícil su uso rutinario. Sin embargo, en forma paralela se han estado utilizando algunos marcadores fenotípicos bastante reproducibles para to-

dos los laboratorios. Uno de ellos, es la tipificación por bacteriófagos, que permite la separación de las cepas de acuerdo a su patrón de lisis por diferentes virus bacterianos. La fagotipia es un método rápido de tipificación de *S enteritidis* y ha sido ampliamente usado en estudios epidemiológicos¹⁸⁻²⁰.

Estudios de fagotipia realizados en Chile, han demostrado que los fagotipos 1 y 4 de *S enteritidis* han sido los responsables de la mayoría de las infecciones ocurridas en la reciente epidemia. El fagotipo 1 fue frecuentemente aislado en el norte de Chile (94%); en cambio, el fagotipo 4 en el centro y sur del país (92%)⁹. También, en un estudio orientado a detectar presencia de *S enteritidis* en productos avícolas en Santiago, se aisló mayoritariamente el fagotipo 4 (59,4%), concordando con su alto aislamiento en muestras clínicas, y además, se encontró el fagotipo 7 (25%), el cual no ha sido frecuentemente aislado en infecciones humanas²¹. Estos trabajos, señalan también la importancia de identificar correctamente los tipos de *S enteritidis* que están circulando en el país, con el fin de aplicar las medidas de control en forma oportuna.

El sistema Phene-Plate (PhP) es un nuevo método de tipificación fenotípica de serotipos de *Salmonella* y otras bacterias entéricas, desarrollado en 1985, por Kühn²² en Suecia. Es una técnica computarizada y fácil de realizar. El sistema se basa en el análisis numérico de la cinética de 48 reacciones bioquímicas del crecimiento bacteriano, en un medio líquido en una microplaca de titulación. Por cada cepa se produce un set característico de reacciones que se registran, los cuales pueden ser usados para establecer un nivel de identidad entre las cepas bacterianas ensayadas, usando un programa de computación. Para cada serotipo de *Salmonella* se ha elegido una batería de sustratos específicos con óptima discriminación. El sistema ha sido previamente evaluado por su poder discriminatorio, reproducibilidad²³ y estabilidad de los marcadores bioquímicos²⁴. También ha sido usado exitosamente en estudios epidemiológicos de diferentes serotipos de *Salmonella*²⁴⁻²⁶.

En base a estos antecedentes, los objetivos de este trabajo fueron: investigar la utilidad del sistema Ph-Plate para determinar los fenotipos bioquímicos de cepas de *S enteritidis* y, junto con

la fagotipia, estudiar la variación de los fenotipos detectados en las cepas de *S enteritidis* aisladas de productos avícolas y de casos clínicos, durante 1997-2000 en Antofagasta.

MATERIAL Y MÉTODO

Cepas bacterianas. Un total de 33 cepas de *S enteritidis* fueron incluidas en este estudio. Dieciséis fueron aisladas de muestras avícolas, 13 de huevos y 3 de carne de pollo. De las cuales, 10 fueron obtenidas del Instituto de Salud Pública de Chile, que habían sido enviadas por el Laboratorio de Bromatología del Servicio de Salud de Antofagasta y fueron aisladas en 1997-1998. Además, las 6 cepas restantes fueron aisladas en huevos en nuestro laboratorio (1999-2000). También, 17 cepas fueron obtenidas de muestras clínicas de pacientes ambulatorios atendidos por síndrome de diarrea aguda en Consultorios de Atención Primaria de Antofagasta, entre 1999-2000. *S enteritidis* ATCC 17036 se incluyó como cepa control.

Fagotipificación de las cepas. Las 33 cepas de *S enteritidis* fueron fagotipificadas de acuerdo con

los protocolos estandarizados, previamente descritos por Ward y col¹⁸, en el Instituto de Salud Pública de Chile. Los fagotipos fueron abreviados FT.

Fenotipos bioquímicos de las cepas. El sistema Phene-Plate (PhP-S48) se usó para determinar los fenotipos bioquímicos (FTs) de las 33 cepas de *S enteritidis* y para validar los ensayos, se incluyó la cepa ATCC 17036. El sistema PhP-S48 (Phene Plate™ System AB, Estocolmo, Suecia) consiste en microplacas que contienen 2 sets paralelos de 48 substratos desecados, especialmente elegidos para los fenotipos bioquímicos de cepas de *Salmonella* de diferentes serotipos. Para cada serotipo un set de pruebas con óptimo grado de discriminación ha sido seleccionado y anexado a un programa de computación (PhPWIN), que permite realizar los cálculos requeridos. Los substratos utilizados para la tipificación de las cepas de *S enteritidis*, se muestran en la Tabla 1.

Una colonia de la cepa a ensayar fue sembrada en tubo con 10 ml de proteosa peptona (Difco) 0,1%, conteniendo azul de bromotimol 0,01% y se inocularon alícuotas de 150 µl a los pocillos de las microplacas pre-preparadas, conteniendo los

Tabla 1. Set de reactivos usados para determinar fenotipos bioquímicos de *Salmonella enteritidis* por el Sistema Ph-Plate

Test	Reactivo	Test	Reactivo	Test	Reactivo
1	Acido Manoico -d-lactona	17	Adonitol	33	Arbutina
2	L-Arabinosa	18	Inositol	34	B-Metil glucósido
3	D-Xilosa	19	D-arabitol	35	5-Ketogluconato
4	Galactosa	20	Glicerol	36	Gluconato
5	Maltosa	21	Maltitol	37	Melobionato
6	Celobiosa	22	Sorbitol	38	Galactolactona
7	Trehalosa	23	Dulcitol	39	Salicina
8	Palatinosa	24	pH 7,4 Control	40	pH 5,5 Control
9	Sucrosa	25	Sorbosa	41	Citrato
10	Lactosa	26	Deoxiglucosa	42	Fumarato
11	Melibiosa	27	Deoxiribosa	43	Malinato
12	Lactulosa	28	Ramnosa	44	Malonato
13	Gentobiosa	29	D-Fucosa	45	Piruvato
14	Melezitosa	30	L-Fucosa	46	L-Tartarato
15	Rafinosa	31	Tagatosa	47	Urea
16	Inopina	32	Amigdalina	48	Ornitina

substratos (3,75 g/l) en cada pocillo. Los inóculos se dispusieron con micropipetas múltiples y para conseguir una apropiada rehidratación de los substratos, las placas inoculadas fueron mantenidas refrigeradas a 4°C toda la noche y, posteriormente, incubadas a 37°C. Después de la incubación, las placas fueron leídas en un lector de microplacas con un espectrofotómetro (iEMS, Labsystems, Finland) a 620 nm, la absorbancia de cada reacción fue medida a las 7, 24 y 48 h de incubación.

Los valores de absorbancia, transferidos a un computador personal, fueron multiplicados por 10, así los resultados producidos estuvieron en un rango de 0 a 30 por cada reacción; valores bajos indicaban reacciones ácidas (amarillo) y valores altos reacciones alcalinas (azul profundo). Después de la lectura final, el valor promedio de las 3 lecturas fue calculado proveyendo 12 números diferentes que varían 0-30 por cada cepa, constituyendo el fingerprinting bioquímico para cada cepa. Similitudes entre las cepas ensayadas fueron calculadas como coeficientes de correlación (*r*) de acuerdo con trabajos previos²³ y fueron reunidas de acuerdo al método de grupo par no pesados con promedios aritméticos (UPGMA)²⁷ en un dendrograma. Las cepas que mostraron coeficientes de correlación más altos que el nivel de identidad usado por el sistema PhP-S48 (0,980)

fueron asignados al mismo fenotipo bioquímico²⁸. Los fenotipos bioquímicos que se encontraron en más de una cepa fueron llamados fenotipos comunes (C), y aquellos que presentaron solamente un aislamiento fueron llamados fenotipos solos (S).

La recolección de los datos, incluyendo las lecturas ópticas, fueron realizadas con el software Programa PhPWIN (PhP-Plate Systems AB).

RESULTADOS

El sistema Ph-Plate de tipificación permitió diferenciar 12 fenotipos bioquímicos (FB) (Tabla 2). De ellos, 4 fueron FB comunes (C) y 8 FB solos (S) y la cepa ATCC 17036 presentó en este caso un FB solo (S). Los FBs C1 y C3 contenían 16 y 5 cepas respectivamente, lo que corresponde a 63,6% del total de las cepas ensayadas. El sistema Ph-Plate permitió establecer que 11 cepas de origen avícola y 5 clínicas, pertenecían al FB C1. Además en el FB C1, se encontró que 5 cepas avícolas y 5 clínicas fueron aisladas en el año 1999, las restantes cepas ambientales fueron aisladas en 1997 (3 cepas) y 1998 (3 cepas). En cambio, las 5 cepas del FB C3 fueron aisladas de muestras clínicas, aisladas en los años 1999 (2 cepas) y 2000 (3 cepas). El FB C2 incluye 2 cepas clínicas, aisladas en 1999 y 2000; y

Tabla 2. Fenotipos bioquímicos (FB) de cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas de muestras avícolas y clínicas en Antofagasta, Chile. 1997-2000

Fenotipos (FB)	Número de cepas	Origen y año aislamiento de cepas	
		Avícola	Clínico
C-1	16	1997 (3)-1998 (3)-1999 (5)	1999 (5)
C-2	2	-	1999 (1) - 2000 (1)
C-3	5	-	1999 (2) - 2000 (3)
C-4	2	1998 (1)	1999 (1)
S-1	1	-	2000 (1)
S-2	1	1999 (1)	-
S-3	1	1997 (1)	-
S-5	1	1998 (1)	-
S-6	1	-	2000 (1)
S-7	1	-	2000 (1)
S-8	1	-	1999 (1)
S-9	1	1998 (1)	-
Total	33	16	17

Tabla 3. Fagotipos (FT) de cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas de muestras avícolas y clínicas en Antofagasta. 1997-2000

Fagotipos (FT)	N de cepas	Origen y año aislamiento de cepas	
		Avícola	Clínico
1	14	1997 (1) -1999 (6)	1999 (2)- 2000 (5)
3	1	1998 (1)	-
4	1	-	1999 (1)
7	1	1997 (1)	-
21	13	1997 (2) - 1998 (5)	1999 (5) - 2000 (1)
NT	3	-	1999 (2) - 2000 (1)
Total	33	16	17

C4 presentó 1 cepa ambiental (1998) y 1 cepa clínica (1999). Las 8 cepas pertenecientes a los FBs (S) fueron todas aisladas de muestras avícolas (4) y clínicas (4), en los años 1997 a 2000. Estos resultados fueron validados con la cepa ATTC 17036 de *S enteritidis*.

Los estudios de fagotipia de las 33 cepas de *S enteritidis* permitió caracterizar 6 fagotipos, incluyendo aquellos designados como no tipificables (NT), los cuales se presentan en la Tabla 3. Los dos FTs dominantes fueron: FT1 con 14 cepas de *S enteritidis* y FT21 con 13 cepas, lo que incluye el 81,8% de las cepas ensayadas. Hubo 3 cepas que no pudieron ser asignadas a ningún fagotipo reconocido y fueron consideradas como no tipificables (NT). De las cepas del FT1, 7 de ellas fueron aisladas de muestras avícolas, 1997 (1 cepa) y 1999 (6), y además, 7 de muestras clínicas 1999 (2) y 2000 (5). Las cepas encontradas en el FT21, 7 fueron de muestras avícolas, 1997 (2 cepas) y 1998 (5), y además, seis de muestras clínicas, 1999 (5 cepas) y 2000 (1 cepa). Los aislamientos de las cepas clínicas y avícolas del FT21 ocurrieron en distintos años, como para establecer una relación entre ellas. En este trabajo, no se incluyeron cepas clínicas aisladas en el periodo 1997-1998, como así también, cepas avícolas pertenecientes al FT21 en 1999-2000. Las cepas del FT4 y NT fueron aisladas de muestras clínicas, en los años 1999 y 2000; y las de los FT3 y FT7 pertenecieron a muestras avícolas 1998 y 1997, en cada caso.

El sistema Ph-Plate permitió reconocer diferentes fenotipos y además, mediante el Programa

Computacional PhPWIN estableció las similitudes entre las cepas ensayadas que presentaron un mayor coeficiente de correlación (0,980). Sus resultados fueron registrados en un dendrograma, que permitió la comparación de los dos sistemas de tipificación (Figura 1). Al combinar los fenotipos bioquímicos con los fagotipos (FB:FT), pertenecientes a una misma cepa de *S enteritidis*, se pudieron encontrar 6 fenotipos comunes (con más de una cepa) y 13 solos (FB:FT). Entre los tipos comunes, dos mayores fenotipos fueron identificados. La combinación del fenotipo bioquímico y fagotipo C1:1 presentó el mayor número de aislamientos (8 cepas), de las cuales 5 correspondieron a cepas avícolas aisladas de huevos en 1999 y 3 a cepas clínicas aisladas en 1997 (1) y 1999 (2). También, la combinación de ambos fenotipos más frecuente fue C1:21 con 5 aislamientos, encontrándose 1 cepa aislada en huevo en 1997, dos cepas de huevos en 1998, una de carne de pollo en 1998 y una de muestra clínica en 1999. En los otros fenotipos comunes encontrados (FB:FT), los aislamientos correspondieron a 2 cepas en cada caso y presentaron variaciones en los años.

DISCUSIÓN

En los últimos 20 años, las infecciones por diferentes serotipos de *Salmonella* han aumentado notablemente en todo el mundo, especialmente infecciones gastrointestinales causadas por *S enteritidis*¹. En diversos reportes, se ha señalado la necesidad de contar con buenos marcadores

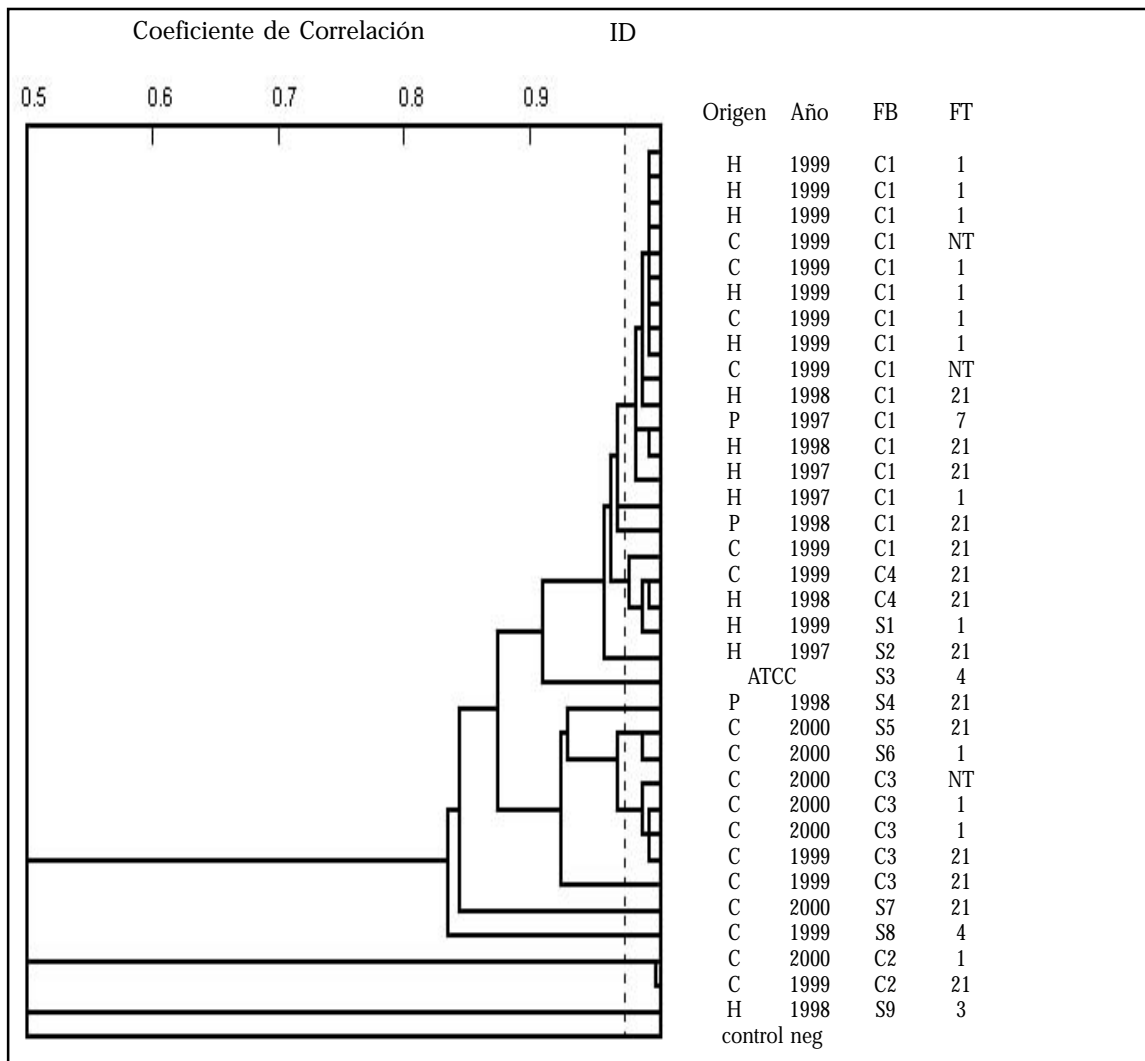


Figura 1. Dendrograma presentando las variaciones entre fenotipos bioquímicos (FBs) y fagotipos (FTs) de 33 cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas en Antofagasta, entre 1997 y 2000. El nivel de identidad (ID) señala que el nivel de identidad elegido ($r=0,980$) para cada cepa asignada al mismo FB. NT, cepas no tipificables. H = huevos; P = carne de pollo y C = clínicas.

epidemiológicos, ya que la serotipificación por sí sola no es efectiva como marcador. Diversas técnicas han sido empleadas para este fin, entre ellas sobresalen la fagotipificación¹⁸ que conjuntamente con análisis del perfil plasmidial^{29,30} y los patrones de resistencia (antibiotipo)³¹ han sido usadas extensamente para tipificar cepas de *S enteritidis*. También, marcadores bioquímicos han sido usados para tipificar los diferentes serotipos de *Salmonella*, pero en el caso de *S enteritidis*

existe escasa información sobre los datos obtenidos. Katouli y cols²⁶ realizaron un estudio para determinar la variación de fenotipos bioquímicos y fagotipos de cepas de *S enteritidis*, utilizando el sistema Ph-Plate Systems y la fagotipia. Los resultados descritos demostraron que este método presenta excelentes ventajas para tipificar cepas de *S enteritidis*. Ya que en un total de 86 cepas clínicas ensayadas, 56 cepas fueron reconocidas en dos FB dominantes y correspondieron casi al

65% del total de los aislamientos. Al combinar el fenotipo bioquímico (FB) con el fagotipo (FT) detectaron 10 fenotipos comunes (FB:FT) en las cepas de *S enteritidis* y en uno de los fenotipos dominantes, 9 aislados fueron identificados por el mismo FB y FT. Al igual que en nuestro trabajo, se incluyó como control la cepa de *S enteritidis* (ATCC 17036) que presentó las características bioquímicas correspondientes al mismo serotipo.

En este trabajo, también se utilizó el sistema Ph-Plate que permitió la identificación de fenotipos bioquímicos de cepas *S enteritidis* aisladas de muestras clínicas y avícolas de Antofagasta. Los resultados obtenidos fueron altamente satisfactorios. De un total de 33 cepas de *S enteritidis* ensayadas, se logró identificar 12 FB con este método. Dos tipos FB dominantes fueron encontrados, encontrándose 22 cepas (63,6% del total de las cepas) y en 13 de ellas, hubo correspondencia con los fagotipos mayormente aislados.

La fagotipia de las cepas de *S enteritidis* reveló la presencia de dos tipos dominantes de fagotipos, el FT1 (14 cepas) y FT21 (13 cepas). En estudio realizado con cepas chilenas, colectadas entre 1975 y 1996 por el Instituto de Salud Pública de Chile, se encontró que el FT1 era frecuentemente aislado en el norte y el FT4 en el centro y sur del país⁹. Estos resultados concuerdan en parte con nuestro estudio, ya que el fagotipo 1 aparece como el más común FT y se aísla con gran frecuencia en infecciones humanas por consumo de productos avícolas contaminados, desde 1997 al 2000. También, ha sido reconocido como el FT prevalente en infecciones ocurridas en el norte de Chile⁹, en la epidemia del 94-96. Todos estos trabajos señalan la existencia del FT1, como un fagotipo persistente en el norte de Chile. El FT1 es frecuentemente aislado en Europa⁹ y es posible que haya sido introducido a estas regiones del país en aves reproductoras provenientes de dicho continente.

Sin embargo, desde 1997 otro fagotipo aparece en nuestro escenario y es el FT21 (13 aislados), el cual había sido descrito en Santiago solamente en 1 caso en una muestra de productos avícolas²¹. En nuestro estudio, se aislaron 7 cepas de productos avícolas y 6 de muestras clínicas, pero ambos en diferentes períodos. La frecuencia de aislamiento del FT21, puede deberse a la importación de nuevas aves reproductoras de otros lugares para disminuir la presencia de *S enteritidis* en las

granjas avícolas, pero desgraciadamente estas aves al parecer venían contaminadas con el FT21. El FT21 ha sido frecuentemente aislado en la República Checa, Austria e Inglaterra³². Este hallazgo puede significar que tenemos un nuevo fagotipo emergente en el norte de Chile, FT21. En nuestro estudio, el FT21 fue detectado en los años que se analizaron muestras de huevos y pollos (1997 y 1998) y en muestras clínicas (1999 y 2000). Esta intermitencia en los hallazgos de este fagotipo, se debe a que en un principio se planeó el estudio con cepas avícolas y clínicas aisladas en 1999-2000. Pero, en los estudios de muestras avícolas se aislaron solamente 6 cepas de *S enteritidis* en huevos expendidos en Antofagasta (1999-2000) (resultados no publicados). Debido a su escaso número, se solicitaron cepas avícolas al Servicio de Salud de Antofagasta, pero solamente se habían aislado 10 cepas de productos avícolas en 1997-1998 y se incluyeron en el estudio. Por ello, no se puede establecer la relación entre en ellos y la vía de transmisión. Sin embargo, a pesar de que el tamaño de muestra es pequeño es posible que pudieran haber estado presentes en muestras avícolas y clínicas en el mismo período, al examinar un mayor número de muestras. Sólo podemos señalar que la presencia del FT21 en productos avícolas y muestras clínicas, sugiere una vía de transmisión al ser humano por el consumo de estos productos avícolas contaminados con este fagotipo.

Al comparar la relación FB:FT, se encontraron que los fenotipos más comunes fueron C1:1 y C1:21, con 8 y 5 aislamientos, respectivamente. Las cepas dominantes fueron aisladas de huevos (7), carnes de pollo (1) y clínicas (5), sugiriendo una estrecha relación y un origen clonal común. Esto concuerda con lo descrito por otros autores³⁻²⁰, en el sentido, que la vía de la transmisión de *S enteritidis* a los humanos en la zona norte de Chile, puede ser a través del consumo de productos avícolas contaminados con los mismos tipos de *S enteritidis*. También, la combinación de los fenotipos bioquímicos y fagotipos indicaron que solamente 8/14 del FT1 estaba presente en un mismo FB (C1). Las 6 cepas restantes pertenecían a otros FB (C2 y C3). El encontrar 8 cepas pertenecientes a un mismo fenotipo bacteriano que ha sido discriminado por ambos métodos fenotípicos (sistema Ph-Plate y fagotipia), nuevamente refuerzan la idea de

la vía de transmisión de un mismo clon, es a través del consumo de productos avícolas contaminados.

Al examinar la variación a través de los años de aislamiento de los fenotipos de *S enteritidis*, el sistema Ph-P-S48 con sus fenotipos bioquímicos permite explicar en mejor forma la diseminación de las cepas de *S enteritidis* en Antofagasta. En el año 1999, el FB C1 fue aislado de 5 muestras de productos avícolas y 5 de clínicas. Las demás cepas del FB C1 fueron aisladas en los productos avícolas, en años anteriores, en los cuales no se recolectaron cepas de origen clínico y es posible, que también estuvieran presentes. En relación a los años, muestra una clara persistencia en su aislamiento durante todos los años. En cambio, la fagotipia de las cepas de *S enteritidis*, mostró que el FT1 en los productos avícolas fue aislado en el año 1997 (1 aislado) y 1999 (6 aislados), y en las muestras clínicas en 1999 (2 aislados) y 2000 (5 aislados), mostrando variaciones en los aislamientos durante los años de estudio. También, el FT1 presentó diversos fenotipos bioquímicos detectados por el sistema de PhP-S48, lo que indica que este método es mucho más discriminatorio en la

identificación de los fenotipos de *S enteritidis*, lo cual ha sido reconocido en trabajos anteriores²⁶.

Finalmente, estos resultados muestran la presencia de dos mayores fenotipos (FB:FT) entre las cepas de *S enteritidis* aisladas entre 1997-2000 en Antofagasta. El fenotipo C1:1, el cual fue el más común entre las cepas aisladas durante 1997-1999, indicando una persistencia de este particular fenotipo a través del tiempo en Antofagasta. Otro fenotipo, representado por un nuevo tipo clonal emergente y diseminado (C1:21), que contiene cepas aisladas en 1997-1999. También, se concluye que la determinación de fenotipos bioquímicos por el método Ph-Plate, es fácil de realizar y constituye una nueva herramienta de tipificación bacteriana que se debe incorporar en estudios epidemiológicos de cepas de *S enteritidis* y de otras bacterias entéricas en nuestro país. Además, no sólo es una buena técnica que puede detectar cepas idénticas, sino que también, permite establecer la relación entre ellas. Esta información puede ser utilizada para trazar el origen de las cepas patógenas en estudios epidemiológicos.

REFERENCIAS

1. RODRÍGUEZ DC, CAMERON DN, PHUR ND, BRENNER FW, ST LOUIS ME, WACHSMUTH KI, TAUXE RV. Comparison of plasmid profiles, phage types and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enteritidis* isolates in United States. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 854-7.
2. SILVA J. *Salmonella enteritidis* un patógeno emergente de origen aviario. *Rev Cs Salud* 2000; 4: 25-36.
3. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreaks of *Salmonella* serotype *enteritidis* infection associated with eating raw or undercooked shell eggs-United State, 1996-1998. *Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49: 73-9.
4. HENZLER DJ, EBEL E, SANDERS J, KRADEL D, MASON J. *Salmonella enteritidis* in eggs from commercial chicken layer flock implicated in human outbreaks. *Avian Dis* 1994; 38: 37-43.
5. MISHU B, GRIFFIN PM, TAUXE R, CAMERON D, HUTHCHESON RH, ACHAFFNER W. *Salmonella enteritidis* gastroenteritis transmitted by intact chicken eggs. *Ann Intern Med* 1991; 115: 190-4.
6. IRINO K, FERNANDES SA, TAVECCHI AT, NEVES BC, DIAZ AM. Progression of *Salmonella enteritidis* paghe type 4 strains in Sao Paulo State. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996; 38: 193-6.
7. FICA A, FERNÁNDEZ, A, PRAT P, FIGUEROA O, GAMBOA R, TSUNEKAWA I, HEITMAN I. *Salmonella enteritidis*, un patógeno emergente en Chile. *Rev Méd Chile* 1997; 125: 544-51.
8. FICA A, ALEXANDRE M, PRAT S, FERNÁNDEZ A, FERNÁNDEZ O, HEITTMANN G. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. *Rev Chil Infect* 2001; 18: 85-93.
9. PRAT S, FERNÁNDEZ A, FICA A, FERNÁNDEZ J, ALEXANDRE M, HEITTMANN G. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella enteritidis* de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. *Rev Panam Salud Pública* 2001; 9: 7-12.
10. SUZUKI Y, ISHIHARA M, MATSUMOTO M, ARAKAWA S, SAITO M, ISHIKAWA ET AL. Molecular epidemiology of *Salmonella enteritidis*. An outbreak and sporadic cases studied by means of pulsed-field gel electrophoresis. *J Infection* 1995; 31: 211-7.

11. POWELL NG, THRELFALL EJ, CHART H, ROWE B. Subdivision of *Salmonella enteritidis* PT4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 119: 193-8.
12. FADL AA, NGUYEN AV, KHAN MI. Analysis of *Salmonella enteritidis* isolated arbitrarily primer PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 987-9.
13. LÓPEZ-MOLINA N, LACONCHA I, REMENTERIA A, AUDICANA A, PERALES I, GARAIZAR J. Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types of PCR fingerprinting. *J Appl Microbiol* 1998; 84: 877-82.
14. SOTO SM, GUERRA B, GONZÁLEZ-HEVIA MA, MENDOZA MC. Potential of three way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4830-6.
15. ESTEBAN E, SNIPES K, HIRD D, KASTEN RY, KINDE H. Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 233-7.
16. OLSEN JE, SKOV MN, THRELFALL EJ, BROWN DJ. Clonal lines of *Salmonella enteritidis* documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 1994; 40: 15-22.
17. THONG KL, NGEOW Y, ALTWEGG M, NAVARATMAN PY, PANG T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1070-4.
18. WARD L, DE SA RJH, ROWE B. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol Infect* 1987; 99: 291-4.
19. HICKMAN-BRENNER FW, STUBBS AD, FARMER JJ 3rd. Phage typing of *Salmonella enteritidis* in the United States. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2817-23.
20. EVANS MR, LANE W, RIBEIRO CD. *Salmonella enteritidis* PT6: another egg associated salmonellosis? *Emerging Infect Dis* 1998; 4: 667-9.
21. ALEXANDRE M, POZO C, GONZÁLEZ V, MARTÍNEZ MC, PRAT S, FERNÁNDEZ A, FICA A, FERNÁNDEZ O, HEITMANN G. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella enteritidis* de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. *Rev Méd Chile* 2000; 128: 1075-83.
22. KÜHN I. Biochemical fingerprinting of *Escherichia coli*: a simple method for epidemiological investigations. *J Microbiol Med* 1985; 3: 159-70.
23. KÜHN I, BURMAN LG, ERIKSSON L, MÖLLBY R. Subtyping of *Klebsiella* by biochemical fingerprinting: a simple system for epidemiological investigations. *J Microbiol Methods* 1990; 11: 177-85.
24. KATOULI M, WOLLIN R, KÜHN I, FARHOUDI-MOGHADDAM AA, MÖLLBY R. The use of biochemical fingerprinting, phage typing and antimicrobial susceptibility testing in detection of epidemic strains of *Salmonella* of serotype Typhimurium in Iran. *J Med Microbiol* 1992; 37: 252-7.
25. KATOULI M, KÜHN I, BRAUNER A, FARHOUDI-MOGHADDAM AA, MÖLLBY R. Application of biochemical fingerprinting to the investigation of clonal group of *Salmonella* of serotype Havana. *J Med Microbiol* 1992; 36: 382-8.
26. KATOULI M, SEUFFER RH, WOLLIN R, KÜHN I, MÖLLBY R. Variations in biochemical phenotypes and phage types of *Salmonella enteritidis* in Germany 1980-92. *Epidemiol Infect* 1993; 111: 199-207.
27. SNEATH PHA, SOKAL RR. *Numerical Taxonomy*. WH: Freeman, San Francisco, California 1973.
28. KÜHN L, ALLESTAM G, STENSTRÖM TA, MÖLLBY R. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring the phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 3171-7.
29. STUBBS AD, HICKMAN BRENNER FW, CAMERON DN, FARMER JJ. Differentiation of *Salmonella enteritidis* phage type-8 strain, evaluation of 3 additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns and biotyping. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 199-201.
30. WACHSMUTH IK, KIEHLBAUCH JA, BOPP CA, CAMERON DN, STROCKBINE NA, WELLS JG ET AL. The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigations of foodborne, diarrheal diseases. *Int J Food Microbiol* 1991; 12: 77-89.
31. LING JM, KOO IC, KAM KM, CHENG AF. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype enteritidis strains isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1693-9.
32. RYCHLIK I, SVESTKOVA A, KARPISKOVA R. Subdivision of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* phage types PT14b y PT21 by plasmid profiling. *Vet Microbiol* 2000; 74: 217-25.

Agradecimientos

Nuestros agradecimientos al Servicio de Salud de Antofagasta y al Laboratorio «Sarita Núñez» de la Corporación Municipal de Antofagasta por facilitarnos las cepas de *S enteritidis* incluidas en este estudio.