

Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001

María Aurora Echeita, Ana María Aladueña, Rosa Díez, Margarita Arroyo, Francisca Cerdán, Rafaela Gutiérrez, Manuela de la Fuente, Rubén González-Sanz, Silvia Herrera-León y Miguel Ángel Usera

Sección de Enterobacterias. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Majadahonda. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN. La salmonelosis continúa siendo una de las causas principales de gastroenteritis en España, siendo la serotipificación el marcador epidemiológico universalmente utilizado para la caracterización de los aislamientos de *Salmonella* spp. Algunos serotipos se identifican muy frecuentemente, reduciendo el poder de discriminación de esta técnica. Por ello, para el estudio epidemiológico de las salmonelosis producidas por estos serotipos es necesario utilizar marcadores complementarios como la fagotipificación.

MÉTODOS. Se serotipificaron, por aglutinación directa, las cepas de *Salmonella* spp. de origen humano recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (LNRSSSE) entre los años 1997 y 2001 y se fagotipificaron, según esquemas internacionales, las cepas de los serotipos Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow y Typhi.

RESULTADOS. Se analizaron 30.856 cepas de *Salmonella* spp. procedentes de la mayoría de las Comunidades Autónomas. Los serotipos Enteritidis (51%) y Typhimurium (24%) fueron los mayoritarios. Las combinaciones serotipo/fagotipo más frecuentes fueron: Enteritidis/FT1 (18%), Enteritidis/FT4 (15%), Enteritidis/FT6a (5%), Typhimurium/FT104 (5%) y Enteritidis/FT6 (3%). Las cepas del serotipo Enteritidis/FT1 tuvieron el mayor aumento en este período de tiempo, pasando del 11,61% en 1997 al 24,74% en 2001.

CONCLUSIONES. La utilización jerárquica de la serotipificación y posteriormente de la fagotipificación en cepas de *Salmonella* spp. de los serotipos más frecuentes aumentó enormemente el poder de discriminación de la serotipificación. Su aplicación en estudios epidemiológicos es de gran utilidad en la caracterización temprana de cepas relacionadas.

Palabras clave: *Salmonella*. Serotipificación. Serotipos. Fagotipificación. Fagotipos.

Serotype and phage type distribution of human *Salmonella* strains isolated in Spain, 1997-2001

INTRODUCTION. Salmonellosis is one of the most frequent causes of gastroenteritis in Spain. Serotyping is the gold standard epidemiological marker for subdividing *Salmonella* spp. strains. A small number of serotypes are very frequently isolated, reducing the discriminatory power of serotyping. Thus, to increase our knowledge of *Salmonella* spp. epidemiology, additional epidemiological markers, such as phage typing, should be used for this purpose.

METHODS. *Salmonella* spp. strains of human origin sent to the Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (LNRSSSE, Spanish Reference Laboratory for *Salmonella* and *Shigella*) between 1997 and 2001 were serotyped using conventional agglutination methods, and Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow and Typhi serotypes were additionally phage typed according to internationally-developed schemes.

RESULTS. A total of 30,856 *Salmonella* spp. strains, isolated in the majority of Spanish Autonomous Communities, were analyzed. Enteritidis (51%) and Typhimurium (24%) were the most frequently isolated serotypes. The following were the most frequent serotype/phage type combinations: Enteritidis/PT1 (18%), Enteritidis/PT4 (15%), Enteritidis/PT6a (5%), Typhimurium/DT104 (5%) and Enteritidis/PT6 (3%). The serotype Enteritidis/PT1 showed the greatest increase over the period studied, from 11.61% in 1997 to 24.74% in 2001.

CONCLUSIONS. A hierarchical typing approach for *Salmonella* spp., using serotyping coupled with phage typing allowed a higher level of discrimination among *Salmonella* serotypes. Application of this approach in epidemiological studies could be highly useful for early characterization of related strains.

Key words: *Salmonella*. Serotyping. Serotypes. Phage typing. Phage types.

Introducción

Salmonella spp. continúa siendo una de las causas principales de gastroenteritis en España¹. Según la clasificación taxonómica más aceptada, el género *Salmonella* se di-

Correspondencia: Dra. M.ª A. Echeita-Sarrionandia. Sección de Enterobacterias. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Ctra. Majadahonda a Pozuelo, km 2. 28220 Majadahonda. Madrid. España. Correo electrónico: aecheita@isciii.es

Manuscrito recibido el 9-6-2004; aceptado el 14-10-2004.

vide en dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*², siendo la serotipificación el marcador epidemiológico de elección para la tipificación de las cepas de este género. El conocimiento de los serotipos circulantes en un país permite saber cuáles son los reservorios o los alimentos que sirven de vehículo en las toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella*, la implicación de cada serotipo en la gravedad de la infección, la distribución de resistencias, la evolución de cada uno de ellos, la detección de brotes y la cuantificación de infecciones esporádicas³.

La serotipificación esta basada en el esquema, internacionalmente reconocido, de Kauffmann-White² y consiste en la caracterización, generalmente por aglutinación en portaobjetos, de los antígenos somáticos O, de los antígenos flagelares H y rara vez del antígeno capsular Vi. Muchos serotipos de *Salmonella* expresan dos tipos de antígenos flagelares, denominados tradicionalmente antígenos de fase 1 y de fase 2. Cada *Salmonella* expresa alternativamente estos dos tipos de antígenos mediante un mecanismo denominado "cambio de fase"⁴. En la última revisión de este esquema, llevada a cabo por el Instituto Pasteur (París), en el centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la Referencia e Investigación en *Salmonella*, se han descrito 2.523 serotipos⁵.

Sin embargo, algunos serotipos son los que con más frecuencia se identifican en cada país a lo largo del tiempo. En estos casos es necesaria la utilización de otros marcadores epidemiológicos complementarios que subdividan las cepas de estos serotipos. Entre ellos, la fagotipificación se ha utilizado con gran éxito en los principales serotipos de *Salmonella*. Esta técnica consiste en la separación de las cepas en fagotipos, de acuerdo con el patrón de lisis obtenido cuando se infectan con un juego de bacteriófagos, generalmente específicos de serotipo.

Existen esquemas de fagotipificación, reconocidos internacionalmente, para los serotipos Enteritidis⁶, Typhimurium⁷, Hadar⁸, Virchow⁹ y Typhi¹⁰. Los juegos de bacteriófagos para cada uno de estos serotipos son suministrados a los laboratorios nacionales de referencia por el Centro Colaborador de la OMS para la fagotipificación de enterobacterias, de la Agencia para la Protección de la Salud (HPA) (Colindale, Londres, Reino Unido).

Salmonella serotipo Typhi es el microorganismo causante de la fiebre tifoidea, que a diferencia de otras salmonelosis es una enfermedad sistémica generalizada. El tratamiento es preceptivo en el caso de la fiebre tifoidea y, por lo tanto, la vigilancia en la evolución de los patrones de resistencia a antimicrobianos que presentan los aislamientos del serotipo Typhi es imprescindible tanto desde el punto de vista epidemiológico como clínico.

El Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* (LNRSSSE) recibe y estudia todos los años las cepas de *Salmonella* de diferentes orígenes, procedentes de laboratorios de salud de nuestro país. Los resultados de la serotipificación y fagotipificación, en aquellos serotipos para los que existen esquemas reconocidos internacionalmente, y de los patrones de resistencia de las cepas del serotipo Typhi, se publican anualmente en el Boletín Epidemiológico Semanal del Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo)¹¹.

En este trabajo se analiza la tendencia de los principales serotipos y fagotipos de *Salmonella* identificados en el LNRSSSE durante los años 1997 a 2001, marcadores utili-

zados tradicionalmente en la investigación epidemiológica de *Salmonella* y el patrón de resistencias de las cepas del serotipo Typhi. Sin embargo, se debe tener en cuenta que para establecer relaciones clonales entre las cepas pertenecientes a un mismo serotipo y fagotipo sería necesaria la posterior utilización de marcadores moleculares¹².

Métodos

Las cepas de *Salmonella* recibidas en el LNRSSSE durante los años 1997-2001 se reaislaron en agar McConkey y se confirmaron como pertenecientes al género *Salmonella* con un número reducido de pruebas bioquímicas convencionales¹³.

Cuando se conocía el nombre de los enfermos, se seleccionaron las cepas de forma que se incluyó una única cepa por paciente y año en el estudio de la frecuencia de serotipos y fagotipos y la distribución de las cepas por sexo y grupos de edad.

La serotipificación de estas cepas se llevó a cabo por microaglutinación en tubo, con sueros producidos en nuestro laboratorio, siguiendo el protocolo elaborado por el Instituto Pasteur¹⁴, y/o aglutinación en porta con sueros comerciales (BioRad Laboratories, S.A., Madrid, España; Sifin, Izasa, Madrid, España y Staten Serum Institut Izasa, Madrid, España). Los antígenos somáticos se identificaron directamente a partir del crecimiento de la bacteria en BHI o TSA. Los antígenos flagelares se identificaron seleccionando las bacterias más móviles por cultivo en medio Sven-Gard (BioRad Laboratories, S.A., Madrid, España). Tras haber identificado una de las fases flagelares, cada cepa se volvió a sembrar en una placa con medio Sven-Gard que contenía antisuero (BioRad Laboratories, S.A., Madrid, España) de la fase previamente detectada, para identificar la otra fase.

En algunos serotipos fue también necesario determinar la subespecie a la que pertenecían, lo que se realizó siguiendo el método propuesto por Popoff y Le Minor, basado en la determinación de un pequeño número de características bioquímicas y la susceptibilidad frente al fago O1².

Tras la serotipificación, se llevó a cabo la fagotipificación de las cepas de *Salmonella* de los serotipos Enteritidis⁶, Typhimurium⁷, Hadar⁸, Virchow⁹ y Typhi¹⁰ siguiendo los esquemas internacionalmente reconocidos para estos serotipos, con los bacteriófagos suministrados por la Agencia para la Protección de la Salud (HPA) (Colindale, Londres, Reino Unido).

Con el crecimiento en fase exponencial, en caldo común con 0,8% de cloruro sódico, del aislamiento que se quería tipificar, se inundó una placa de agar común con 0,8% de cloruro sódico. Se retiró el sobrenadante y se depositó en la superficie de la placa una gota de 10 µl de cada uno de los bacteriófagos que constituyen el juego de fagos para ese serotipo. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C, excepto en el caso del serotipo Typhi para el que la temperatura de incubación es 38,5 °C, y se determinó la producción o no de lisis con cada uno de los bacteriófagos y la intensidad con que ésta se produjo (desde lisis total a placas aisladas de lisis).

Aquellos aislamientos que presentaban patrones de lisis que no se correspondían con ninguno de los fagotipos reconocidos para cada esquema se incluyeron en la denominación "patrón no reconocido" (PNR). Otros aislamientos "no tipificables" (NT) fueron los que no se lisaron con ninguno de los fagos de su juego.

Las cepas del serotipo 4,5,12:i:-, probablemente variantes monofásicas del serotipo Typhimurium¹⁵, se fagotipificaron con el juego de fagos del serotipo Typhimurium.

El LNRSSSE estudió el patrón de resistencias de todas las cepas recibidas del serotipo Typhi. La resistencia se determinó por la técnica de Kirby-Bauer de difusión en agar, siguiendo los criterios y los puntos de corte de la NCCLS¹⁶, frente a ampicilina (AMP), amoxicilina (AMX), carbenicilina (CRB), cefoperazona (CFP), cloranfenicol (CHL), gentamicina (GEN), kanamicina (KAN), estreptomycin (STR), sulfonamidas (SSS), trimetoprima (TMP), tetraciclina (TCY) y ciprofloxacino (CIP), según siglas WHONET (<http://200.68.11.22/Herramientas/Estandares/CodigosWhonetAntibioticos.htm>).

La tendencia temporal de los principales serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano se evaluó con la prueba exacta de Fisher para variables dicotómicas. Los resultados se analizaron con el paquete informático Epi Info 2002 (<http://www.cica.es/epiinfo/>).

Resultados y discusión

Se tipificaron 30.856 cepas de *Salmonella* de origen humano recibidas en el LNRSSSE durante los años 1997-2001. Las cepas se enviaban de forma voluntaria desde los laboratorios de salud, por lo que no todas las provincias estaban representadas con el mismo peso, aunque la mayoría de ellas estaban representadas en el estudio.

Se recibieron cepas procedentes de 264 laboratorios. De ellos, 87 laboratorios enviaron cepas al menos en 4 de los 5 años del estudio y 32 laboratorios en 3 años, lo que supuso el 88,5 y 93,3%, respectivamente, del total de las cepas recibidas y permite evaluar la tendencia de los serotipos en este período de tiempo.

Las cepas procedían mayoritariamente de heces (90,7%), seguido de sangre (3%) y orina (0,8%). Otros orígenes tuvieron una frecuencia inferior a 0,5%. En el 4,7% de las cepas se desconocía su origen. En cuanto a la distribución por sexo, cuando se conocía, el 52,6% procedían de varones y el 47,4% de mujeres.

El mayor número de cepas de *Salmonella* se aislaron en niños menores de 5 años y principalmente en niños de 1 y 2 años. La distribución por grupos de edad, en los 18.185 casos en los que se disponía de esta información, fue: menores de 1 año, 1.324 (7,3%); de 1 a 5 años, 6.587 (36,2%); de 6 a 14 años, 2.662 (14,6%); de 15 a 25 años, 1.430 (7,9%); de 26 a 35 años, 1.386 (7,6%); de 36 a 45 años, 1.088 (6,0%); de 46 a 55 años, 1.023 (5,6%); de 56 a 65 años, 863 (4,7%), y mayores de 65 años, 1.822 (10,0%) casos.

La distribución por años de los serotipos de *Salmonella* de origen humano más frecuentes se muestra en la tabla 1. Como en estudios anteriores, Enteritidis fue el más frecuente cada año seguido de Typhimurium¹⁷. Estos dos serotipos son también los más referidos en la mayoría de los países en los que se dispone de esta información^{18,19}, aunque en algunos de ellos como en Estados Unidos sea el serotipo Typhimurium el más frecuente³. En nuestro estudio, el serotipo Enteritidis, que mostraba una ligera tendencia a ir disminuyendo en años anteriores a 1997¹⁷, parece haber retomado una tendencia alcista en los últimos años, con un incremento del 45 al 61%, estadísticamente significativo ($p < 0,001$; *odds ratio* [OR], 0,53; intervalo de confianza del 95% [IC 95%], 0,49-0,57), justo al contrario de lo que ocurre con el serotipo Typhimurium cuya incidencia ha ido disminuyendo en este mismo período de tiempo ($p < 0,001$; OR, 1,9; IC 95%, 1,77-2,10). La frecuencia de aparición de otros serotipos varía en función del país (http://www.hpa.org.uk/hpa/inter/enter-net_menu.htm).

El serotipo Hadar, que experimentó un aumento estadísticamente significativo en el período 1993-1996¹⁷, paralelamente al aumento de este serotipo en cepas aisladas de carne de ave²⁰, continuó aumentando durante los 3 primeros años de este estudio para disminuir paulatinamente en 2000 y 2001. El serotipo Hadar se encuentra también entre los tres o cuatro serotipos más frecuentemente aislados en Europa (http://www.hpa.org.uk/hpa/inter/enter-net_inter_db.htm), pero es mucho menos frecuente en Estados Unidos²¹.

En el segundo semestre de 1997 se identificó en 14 de las 17 comunidades autónomas, una cepa monofásica atípica del serotipo 4,5,12:i:-, que rápidamente aumentó su incidencia pasando a ocupar el cuarto lugar en frecuencia en los años del estudio²². Según el esquema de Kauffmann-

TABLA 1. Distribución por año de los serotipos de *Salmonella* de origen humano más frecuentes

Serotipo	1997 (%)	1998 (%)	1999 (%)	2000 (%)	2001 (%)	Total (%)
Enteritidis	2.099 (44,94)	2.342 (42,01)	2.759 (49,40)	3.373 (53,17)	4.445 (60,80)	15.018 (50,93)
Typhimurium	1.509 (32,31)	1.583 (28,39)	1.049 (18,78)	1.352 (21,31)	1.454 (19,89)	6.947 (23,56)
Hadar	269 (5,76)	365 (6,55)	428 (7,66)	297 (4,68)	226 (3,09%)	1.585 (5,38)
4,5,12:i:-	0 (0,00)	227 (4,07)	220 (3,94)	223 (3,52)	169 (2,31)	839 (2,85)
Virchow	74 (1,58)	155 (2,78)	159 (2,85)	157 (2,47)	83 (1,14)	628 (2,13)
Ohio	34 (0,73)	124 (2,22)	44 (0,79)	103 (1,62)	62 (0,85)	367 (1,24)
Brandenburg	70 (1,50)	70 (1,26)	61 (1,09)	59 (0,93)	44 (0,60)	304 (1,03)
Infantis	35 (0,75)	37 (0,66)	44 (0,79)	60 (0,95)	82 (1,12)	258 (0,87)
Anatum	29 (0,62)	37 (0,66)	45 (0,81)	48 (0,76)	25 (0,34)	184 (0,62)
Bredeney	19 (0,41)	31 (0,56)	39 (0,70)	36 (0,57)	52 (0,71)	177 (0,60)
Muenchen	40 (0,86)	18 (0,32)	46 (0,82)	38 (0,60)	29 (0,40)	171 (0,58)
Grumpensis	11 (0,24)	11 (0,20)	104 (1,86)	25 (0,39)	18 (0,25)	169 (0,57)
Agona	27 (0,58)	14 (0,25)	71 (1,27)	27 (0,43)	28 (0,38)	167 (0,57)
Derby	10 (0,21)	21 (0,38)	40 (0,72)	60 (0,95)	35 (0,48)	166 (0,56)
Newport	35 (0,75)	41 (0,74)	15 (0,27)	26 (0,41)	40 (0,55)	157 (0,53)
Goldcoast	14 (0,30)	39 (0,70)	47 (0,84)	23 (0,36)	19 (0,26)	142 (0,48)
Typhi	27 (0,58)	25 (0,45)	36 (0,64)	26 (0,41)	19 (0,26)	133 (0,45)
Panama	19 (0,41)	37 (0,66)	37 (0,66)	26 (0,41)	12 (0,16)	131 (0,44)
Mbandaka	31 (0,66)	28 (0,50)	29 (0,52)	23 (0,36)	11 (0,15)	122 (0,41)
Braenderup	17 (0,36)	16 (0,29)	24 (0,43)	27 (0,43)	42 (0,57)	126 (0,43)
Heidelberg	33 (0,71)	25 (0,45)	21 (0,38)	22 (0,35)	10 (0,14)	111 (0,38)
Mikawasima	11 (0,24)	38 (0,68)	25 (0,45)	19 (0,30)	13 (0,18)	106 (0,36)
Rissen	0 (0,00)	4 (0,07)	4 (0,07)	28 (0,44)	63 (0,86)	99 (0,34)
Bovismorbificans	41 (0,88)	23 (0,41)	9 (0,16)	10 (0,16)	6 (0,08)	89 (0,30)
Otros	217 (4,65)	264 (4,74)	229 (4,10)	256 (4,04)	324 (4,43)	1.290 (4,37)
Total	4.671 (100,00)	5.575 (100,00)	5.585 (100,00)	6.344 (100,00)	7.311 (100,00)	29.486 (100,00)

White, esta combinación antigénica podría ser una variante monofásica del serotipo Typhimurium (4,5,12:i:1,2), del serotipo Lagos (4,5,12:i:1,5) o podría representar un nuevo serotipo. Estudios moleculares posteriores establecieron que, en su mayoría, constituían un clon de cepas probablemente derivado del serotipo Typhimurium^{15,23}.

El serotipo Virchow, que había ido decreciendo en el período 1993-1996¹⁷, se ha estabilizado en este período ocupando el quinto lugar.

Es de destacar el aumento estadísticamente significativo del serotipo Rissen ($p < 0,0001$; OR, 0,08; IC 95%, 0,03-0,22). En 2001, se recibieron 63 cepas de este serotipo procedentes de 29 laboratorios de 10 comunidades autónomas, por lo que parece que esté distribuido en todo el territorio nacional. Por el contrario, en el año 1999, la incidencia de los serotipos Grumpensis y Agona fue 6,4 veces y 2,4 veces respectivamente superior en Cataluña a la encontrada en el resto de las comunidades. En este año se recibieron 104 cepas del serotipo Grumpensis y 71 cepas del serotipo Agona. De ellas, 90 cepas (86,5%) del serotipo Grumpensis y 50 cepas (70,4%) del serotipo Agona procedían de Cataluña y sólo 3 cepas del serotipo Grumpensis se asociaron a un brote.

Cabe hacer algún comentario sobre *S. ser Typhi*, responsable de la fiebre tifoidea, ya que esta enfermedad es de "declaración obligatoria" (EDO) en nuestro país y por lo tanto se tiene más información sobre su incidencia. El número de cepas que se reciben en el LNRSSSE es relativamente bajo con relación a los casos de fiebre tifoidea declarados y suele suponer, como promedio, el 10% de estos casos. Esta comparación entre casos de salmonelosis y cepas recibidas en el LNRSSSE no puede hacerse en otros serotipos de *Salmonella*, ya que la rúbrica "salmonelosis" nunca ha sido de declaración obligatoria y, desde el año 1997 dejaron incluso de serlo las "toxiinfecciones alimentarias" y "otros procesos diarreicos", que hubieran permi-

tido estimar el alcance de las salmonelosis en España, si bien de forma indirecta (Real Decreto 2210/1995).

La distribución por años de las cepas de *Salmonella ser Typhi* recibidas no tiene una tendencia clara, aunque sí parece tener una tendencia descendente el número de casos de fiebre tifoidea declarados al Sistema EDO del Servicio de Vigilancia Epidemiológica (Centro Nacional de Epidemiología), desde 324 casos declarados en el año 1997 a 174 en 2001 (<http://cne.isciii.es/htdocs/bes/>).

La distribución por fagotipos de las cepas del serotipo Enteritidis se muestra en la tabla 2. El esquema utilizado en nuestro laboratorio para este serotipo ha sufrido sucesivas ampliaciones hasta el año 1999. Por ello, algunos fagotipos no aparecen en los primeros 2 años de este estudio y otros, por su escasa incidencia, han sido englobados en el fagotipo al que se hubiera asignado con el esquema original de 10 fagos.

Los fagotipos 1, 4, 6a y 6 han sido en el período 1997-2001 los más frecuentes (82% de las cepas), pero mientras que el fagotipo 1 ha experimentado un notable aumento a lo largo de estos años pasando del 26 al 41%, los fagotipos 4 y 6A han ido disminuyendo en una proporción similar. El fagotipo 4 sigue siendo el más frecuente en otros países, habiendo desplazado incluso al fagotipo 8, tan frecuente en países como Estados Unidos en años anteriores a 1997, pero que nunca ha ocupado un lugar predominante entre nuestros aislamientos²⁴.

El fagotipo 21 ha experimentado un aumento en estos años que cabe destacar y que le sitúa en el quinto lugar. Por el contrario el fagotipo 34, que empezó siendo el quinto en frecuencia en 1997, ha ido disminuyendo en este período de tiempo, identificándose en 2001 con una frecuencia inferior al 1%.

La distribución por años de los fagotipos más frecuentes del serotipo Typhimurium se muestra en la tabla 3.

TABLA 2. Distribución por año de los principales fagotipos del serotipo Enteritidis

Fagotipo	1997 (%)	1998 (%)	1999 (%)	2000 (%)	2001 (%)	Total (%)
1	540 (25,84)	662 (28,34)	991 (36,01)	1.368 (41,37)	1.746 (40,69)	5.307 (35,92)
4	845 (40,43)	757 (32,41)	918 (33,36)	913 (27,61)	923 (21,51)	4.356 (29,48)
6A	322 (15,41)	305 (13,06)	274 (9,96)	305 (9,22)	318 (7,41)	1.524 (10,31)
6	96 (4,59)	192 (8,22)	142 (5,16)	203 (6,14)	289 (6,74)	922 (6,24)
21	3 (0,14)	44 (1,88)	35 (1,27)	41 (1,24)	189 (4,40)	312 (2,11)
14B	18 (0,86)	78 (3,34)	36 (1,31)	35 (1,06)	120 (2,80)	287 (1,94)
34	82 (3,92)	55 (2,35)	41 (1,49)	37 (1,12)	38 (0,89)	253 (1,71)
8	16 (0,77)	30 (1,28)	36 (1,31)	77 (2,33)	80 (1,86)	239 (1,62)
3	6 (0,29)	5 (0,21)	13 (0,47)	23 (0,70)	79 (1,84)	126 (0,85)
13A	1 (0,05)	3 (0,13)	8 (0,29)	22 (0,67)	66 (1,54)	100 (0,68)
7	17 (0,81)	17 (0,73)	15 (0,55)	15 (0,45)	27 (0,63)	91 (0,62)
5A	16 (0,77)	6 (0,26)	8 (0,29)	9 (0,27)	44 (1,03)	83 (0,56)
6B	0 (0,00)	0 (0,00)	9 (0,33)	8 (0,24)	64 (1,49)	81 (0,55)
31	5 (0,24)	32 (1,37)	25 (0,91)	5 (0,15)	3 (0,07)	70 (0,47)
5C	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (0,15)	19 (0,57)	36 (0,84)	59 (0,40)
35	0 (0,00)	0 (0,00)	14 (0,51)	17 (0,51)	15 (0,35)	46 (0,31)
5B	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (0,15)	13 (0,39)	15 (0,35)	32 (0,22)
9	13 (0,62)	16 (0,68)	2 (0,07)	0 (0,00)	0 (0,00)	31 (0,21)
5	18 (0,86)	3 (0,13)	5 (0,18)	4 (0,12)	0 (0,00)	30 (0,20)
20A	2 (0,10)	8 (0,34)	5 (0,18)	10 (0,30)	4 (0,09)	29 (0,20)
20	0 (0,00)	10 (0,43)	12 (0,44)	5 (0,15)	0 (0,00)	27 (0,18)
Otros	11 (0,53)	15 (0,64)	61 (2,22)	62 (1,87)	84 (1,96)	233 (1,58)
PNR	55 (2,63)	84 (3,60)	74 (2,69)	94 (2,84)	112 (2,61)	419 (2,84)
NT	24 (1,15)	14 (0,60)	20 (0,73)	22 (0,67)	39 (0,91)	119 (0,81)
Total	2.090 (100,00)	2.336 (100,00)	2.752 (100,00)	3.307 (100,00)	4.291 (100,00)	14.776 (100,00)

PNR: patrón no reconocido; NT: no tipificable.

Los fagotipos 104, 104B, 193 y 120 se han mantenido entre los más frecuentes a lo largo de todos los años del estudio. La propagación internacional a partir de 1990, de un clon de cepas multirresistentes del fagotipo 104, incrementó drásticamente las tasas de resistencia de *Salmonella* a los antimicrobianos y este clon ha sido responsable de numerosos brotes epidémicos alrededor del mundo²⁵. En algunos países como en Inglaterra y Gales parece que esté declinando la incidencia de este clon²⁶, que puede ser resistente incluso a 9 antimicrobianos, siendo lo más habitual que sea resistente a AMP, CHL, STR, SSS, TCY, mientras que en nuestro país continúa siendo uno de los más frecuentes²⁷. Sin embargo, cabe mencionar que el fagotipo 120, algunas de cuyas cepas se cree que han aparecido por cambios en la susceptibilidad al juego de fagos en una pequeña proporción de cepas multirresistentes del fagotipo 104, ha disminuido drásticamente en estos años²⁸.

Cuando en 1998 se incorporan al esquema del serotipo Typhimurium dos nuevos fagos adicionales aparece un nuevo fagotipo U302, cuya frecuencia rápidamente le sitúa en el tercer lugar, desplazando incluso al fagotipo 104B en los años 2000 y 2001. El fagotipo U302 ha sido descrito como estrechamente relacionado al fagotipo 104²⁹.

También la mayoría de las cepas monofásicas del serotipo 4,5,12:i:- (651/887) se tipificaban como fagotipo U302²². Si además consideráramos a las cepas del serotipo 4,5,12:i:- como variantes monofásicas del serotipo Typhimurium^{15,23}, tendríamos 1.241 cepas del fagotipo U302, lo que apunta la verdadera importancia de este fagotipo.

Este clon, caracterizado molecularmente por electroforesis en campo pulsado, presenta un patrón de multirresistencia a antimicrobianos característico, siendo resistente a AMP, CHL, STR, GEN, SUL, TCY, SXT. Su frecuencia, que ha ido bajando progresivamente desde su

aparición en el segundo semestre de 1997 y su mayor incidencia en 1998 con 227 cepas (4,1%) a 169 cepas (2,3%) en 2001, se asoció al consumo de alimentos derivados de cerdo²². Cabe hacer notar la resistencia de estas cepas frente a gentamicina, resistencia poco frecuente entre las cepas de origen humano recibidas en el LNRSSSE³⁰.

La distribución por años de los fagotipos más frecuentes del serotipo Hadar, a partir del año 1998 en el que se dispone del juego de bacteriófagos para este serotipo se muestra en la tabla 4. Los fagotipos 2 y 1 son los más frecuentes a lo largo de todos los años. A estos 2 fagotipos pertenecen más del 50% de las cepas de este serotipo y la incidencia de cada uno de ellos es 5 veces superior a las de los demás.

La distribución por años de los fagotipos más frecuentes del serotipo Virchow se muestra en la tabla 5. En nuestro país el fagotipo 8 es el predominante, como sucede en otros países³¹, y como sucedía en Inglaterra y Gales hasta 1994, cuando fue reemplazado por el fagotipo 26³².

Finalmente se analizan los fagotipos del serotipo Typhi cuya distribución se muestra en la tabla 6. El LNRSSSE tiene una larga experiencia en el estudio de los fagotipos de este serotipo y su distribución se publica anualmente en los Boletines Epidemiológicos Semanales (<http://cucisciii.es/htdocs/bes/>). Debido al pequeño número de cepas recibidas la incidencia por año es tan variable que, en nuestra opinión, no permite extraer conclusiones. Sin embargo, los fagotipos E1a, A, C1 y AD se han mantenido durante todos los años del estudio, así como en estudios anteriores, como los más frecuentes³³.

En cuanto a las tasas de resistencia del serotipo Typhi, el 36,7% de las cepas fueron resistentes al menos a un antimicrobiano, si bien el 19,4% fueron resistentes sólo a estreptomycinina y el 10,1% sólo a las sulfonamidas. Cabe destacar la identificación de una cepa multirresistente (AMP,

TABLA 3. Distribución por año de los principales fagotipos del serotipo Typhimurium

Fagotipo	1997 (%)	1998 (%)	1999 (%)	2000 (%)	2001 (%)	Total (%)
104	303 (20,16)	385 (24,34)	211 (20,15)	214 (18,38)	194 (15,81)	1.307 (20,04)
104B	55 (3,66)	244 (15,42)	165 (15,76)	101 (8,68)	118 (9,62)	683 (10,47)
U302	0 (0,00)	74 (4,68)	129 (12,32)	163 (14,00)	197 (16,06)	563 (8,63)
193	111 (7,39)	87 (5,50)	62 (5,92)	55 (4,73)	71 (5,79)	386 (5,92)
120	191 (12,71)	81 (5,12)	3 (0,29)	11 (0,95)	8 (0,65)	294 (4,51)
195	47 (3,13)	38 (2,40)	17 (1,62)	18 (1,55)	11 (0,90)	131 (2,01)
208	0 (0,00)	0 (0,00)	14 (1,34)	53 (4,55)	54 (4,40)	121 (1,85)
12	32 (2,13)	12 (0,76)	17 (1,62)	33 (2,84)	6 (0,49)	100 (1,53)
160	10 (0,67)	15 (0,95)	4 (0,38)	5 (0,43)	14 (1,14)	48 (0,74)
41A	39 (2,59)	0 (0,00)	6 (0,57)	0 (0,00)	0 (0,00)	45 (0,69)
204C	7 (0,47)	11 (0,70)	4 (0,38)	12 (1,03)	5 (0,41)	39 (0,60)
68	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,17)	34 (2,77)	36 (0,55)
99	6 (0,40)	6 (0,38)	18 (1,72)	2 (0,17)	3 (0,24)	35 (0,54)
124	6 (0,40)	8 (0,51)	2 (0,19)	12 (1,03)	3 (0,24)	31 (0,48)
204	10 (0,67)	10 (0,63)	8 (0,76)	0 (0,00)	2 (0,16)	30 (0,46)
97	4 (0,27)	15 (0,95)	0 (0,00)	1 (0,09)	0 (0,00)	20 (0,31)
29	6 (0,40)	5 (0,32)	0 (0,00)	2 (0,17)	3 (0,24)	16 (0,25)
32	6 (0,40)	7 (0,44)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,16)	15 (0,23)
52	7 (0,47)	7 (0,44)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	14 (0,21)
U285	1 (0,07)	6 (0,38)	2 (0,19)	0 (0,00)	3 (0,24)	12 (0,18)
3	5 (0,33)	3 (0,19)	0 (0,00)	1 (0,09)	3 (0,24)	12 (0,18)
Otros	43 (2,86)	47 (2,97)	37 (3,53)	37 (3,18)	56 (4,56)	220 (3,37)
PNR	78 (5,19)	76 (4,80)	125 (11,94)	115 (9,88)	169 (13,77)	563 (8,63)
NT	536 (35,66)	445 (28,13)	223 (21,30)	327 (28,09)	271 (22,09)	1802 (27,63)
Total	1.503 (100,00)	1.582 (100,00)	1.047 (100,00)	1.164 (100,00)	1.227 (100,00)	6.523 (100,00)

PNR: patrón no reconocido; NT: no tipificable.

TABLA 4. Distribución por año de los principales fagotipos del serotipo Hadar

Fagotipo	1998 (%)	1999 (%)	2000 (%)	2001 (%)	Total (%)
2	97 (26,65)	136 (31,78)	85 (28,62)	95 (42,41)	413 (31,45)
1	85 (23,35)	103 (24,07)	79 (26,60)	54 (24,11)	321 (24,45)
17	30 (8,24)	23 (5,37)	16 (5,39)	9 (4,02)	78 (5,94)
14	2 (0,55)	45 (10,51)	15 (5,05)	2 (0,89)	64 (4,87)
11	15 (4,12)	16 (3,74)	14 (4,71)	12 (5,36)	57 (4,34)
32	22 (6,04)	6 (1,40)	10 (3,37)	12 (5,36)	50 (3,81)
5	4 (1,10)	36 (8,41)	4 (1,35)	3 (1,34)	47 (3,58)
21	14 (3,85)	8 (1,87)	9 (3,03)	8 (3,57)	39 (2,97)
22	14 (3,85)	4 (0,93)	11 (3,70)	5 (2,23)	34 (2,59)
4	11 (3,02)	9 (2,10)	5 (1,68)	2 (0,89)	27 (2,06)
10	5 (1,37)	6 (1,40)	9 (3,03)	6 (2,68)	26 (1,98)
18	3 (0,82)	3 (0,70)	7 (2,36)	1 (0,45)	14 (1,07)
15	4 (1,10)	1 (0,23)	6 (2,02)	1 (0,45)	12 (0,91)
3	2 (0,55)	1 (0,23)	3 (1,01)	3 (1,34)	9 (0,69)
29	2 (0,55)	2 (0,47)	3 (1,01)	1 (0,45)	8 (0,61)
33	0 (0,00)	2 (0,47)	3 (1,01)	0 (0,00)	5 (0,38)
23	0 (0,00)	5 (1,17)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (0,38)
19	0 (0,00)	4 (0,93)	0 (0,00)	1 (0,45)	5 (0,38)
30	2 (0,55)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,45)	3 (0,23)
9	1 (0,27)	0 (0,00)	1 (0,34)	1 (0,45)	3 (0,23)
34	1 (0,27)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,08)
Otros	1 (0,27)	2 (0,47)	2 (0,67)	1 (0,45)	6 (0,46)
PNR	46 (12,64)	12 (2,80)	9 (3,03)	2 (0,89)	69 (5,26)
NT	3 (0,82)	4 (0,93)	6 (2,02)	4 (1,79)	17 (1,29)
Total	364 (100,00)	428 (100,00)	297 (100,00)	224 (100,00)	1.313 (100,00)

PNR: patrón no reconocido; NT: no tipificable.

TABLA 5. Distribución por años de los principales fagotipos del serotipo Virchow

Fagotipo	1997 (%)	1998 (%)	1999 (%)	2000 (%)	2001 (%)	Total (%)
8	31 (43,06)	68 (44,74)	63 (39,87)	55 (5,03)	42 (50,60)	259 (41,64)
31	16 (22,22)	15 (9,87)	17 (10,76)	23 (14,65)	13 (15,66)	84 (13,50)
17	2 (2,78)	11 (7,24)	42 (26,58)	18 (11,46)	0 (0,00)	75 (12,06)
19	11 (15,28)	16 (10,53)	20 (12,66)	5 (3,18)	11 (13,25)	63 (10,13)
4A	1 (1,39)	3 (1,97)	2 (1,27)	18 (11,46)	1 (1,20)	25 (4,02)
2	1 (1,39)	4 (2,63)	1 (0,63)	14 (8,92)	3 (3,61)	23 (3,70)
26	0 (0,00)	17 (11,18)	4 (2,53)	1 (0,64)	0 (0,00)	22 (3,54)
20	0 (0,00)	6 (3,95)	0 (0,00)	1 (0,64)	0 (0,00)	7 (1,13)
34	0 (0,00)	1 (0,66)	1 (0,63)	2 (1,27)	2 (2,41)	6 (0,96)
33	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (2,55)	1 (1,20)	5 (0,80)
18	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,27)	3 (1,91)	0 (0,00)	5 (0,80)
25	1 (1,39)	2 (1,32)	1 (0,63)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (0,64)
37	0 (0,00)	1 (0,66)	1 (0,63)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (0,32)
21	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,27)	0 (0,00)	2 (0,32)
Otros	1 (1,39)	2 (1,32)	2 (1,27)	1 (0,64)	4 (4,82)	8 (1,29)
PNR	5 (6,94)	1 (0,66)	1 (0,63)	7 (4,46)	1 (1,20)	15 (2,41)
NT	3 (4,17)	5 (3,29)	1 (0,63)	3 (1,91)	5 (6,02)	17 (2,73)
Total	72 (100,00)	152 (100,00)	158 (100,00)	157 (100,00)	83 (100,00)	622 (100,00)

PNR: patrón no reconocido; NT: no tipificable.

AMX, CRB, STR, SSS, TMP, TCY) del fagotipo E1a, aislada en 1999 del coprocultivo de una mujer que viajó a la India y una cepa resistente a cloranfenicol del fagotipo D1, uno de los antibióticos tradicionalmente utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea.

La certeza de que diferentes cepas tengan un origen común nunca puede asegurarse totalmente, pero se incrementa con la realización de más y mejores técnicas de tipificación. La utilización jerárquica de la serotipificación, y posteriormente de la fagotipificación de los serotipos más frecuentes, aumentó enormemente el poder de discriminación de este esquema combinado. La distribución de los serotipos/fagotipos más frecuentes durante el período 1997-2001 se muestra en la figura 1.

El estudio de los serotipos/fagotipos de las cepas circulantes de *Salmonella* puede ofrecer, en aquellos casos en los que se caracterizan tipos poco frecuentes, la suficiente evidencia de la transmisión epidemiológica entre enfermos y fuentes de infección. Sin embargo, para poder establecer relaciones clonales entre las cepas pertenecientes a un mismo serotipo y fagotipo será siempre necesario la posterior utilización de marcadores moleculares.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a todos los laboratorios de salud que a lo largo de los años nos envían sus cepas de *Salmonella* para su tipificación.

TABLA 6. Distribución por año de los principales fagotipos del serotipo Typhi

Fagotipo	1997 (%)	1998 (%)	1999 (%)	2000 (%)	2001 (%)	Total (%)
E1A	8 (36,36)	7 (28,00)	15 (41,67)	1 (3,85)	3 (17,65)	34 (26,98)
A	2 (9,09)	4 (16,00)	5 (13,89)	4 (15,38)	4 (23,53)	19 (15,08)
C1	2 (9,09)	8 (32,00)	0 (0,00)	6 (23,08)	2 (11,76)	18 (14,29)
AD	4 (18,18)	2 (8,00)	3 (8,33)	1 (3,85)	2 (11,76)	12 (9,52)
B2	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (13,89)	3 (11,54)	2 (11,76)	10 (7,94)
D1	0 (0,00)	2 (8,00)	0 (0,00)	3 (11,54)	0 (0,00)	5 (3,97)
M1	0 (0,00)	1 (4,00)	0 (0,00)	1 (3,85)	2 (11,76)	4 (3,17)
C4	1 (4,55)	0 (0,00)	2 (5,56)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (2,38)
I + IV	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,78)	0 (0,00)	1 (5,88)	2 (1,59)
G1	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,78)	1 (3,85)	0 (0,00)	2 (1,59)
46	2 (9,09)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,59)
L2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,85)	0 (0,00)	1 (0,79)
J1	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,85)	0 (0,00)	1 (0,79)
H6	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,85)	0 (0,00)	1 (0,79)
F1	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,85)	0 (0,00)	1 (0,79)
E2	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (5,88)	1 (0,79)
D6	1 (4,55)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,79)
D10	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,85)	0 (0,00)	1 (0,79)
A1	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (2,78)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,79)
NT	2 (9,09)	1 (4,00)	3 (8,33)	1 (3,85)	0 (0,00)	7 (5,56)
Total	22 (100,00)	25 (100,00)	36 (100,00)	26 (100,00)	17 (100,00)	126 (100,00)

PNR: patrón no reconocido; NT: no tipificable; AD; adegradado.

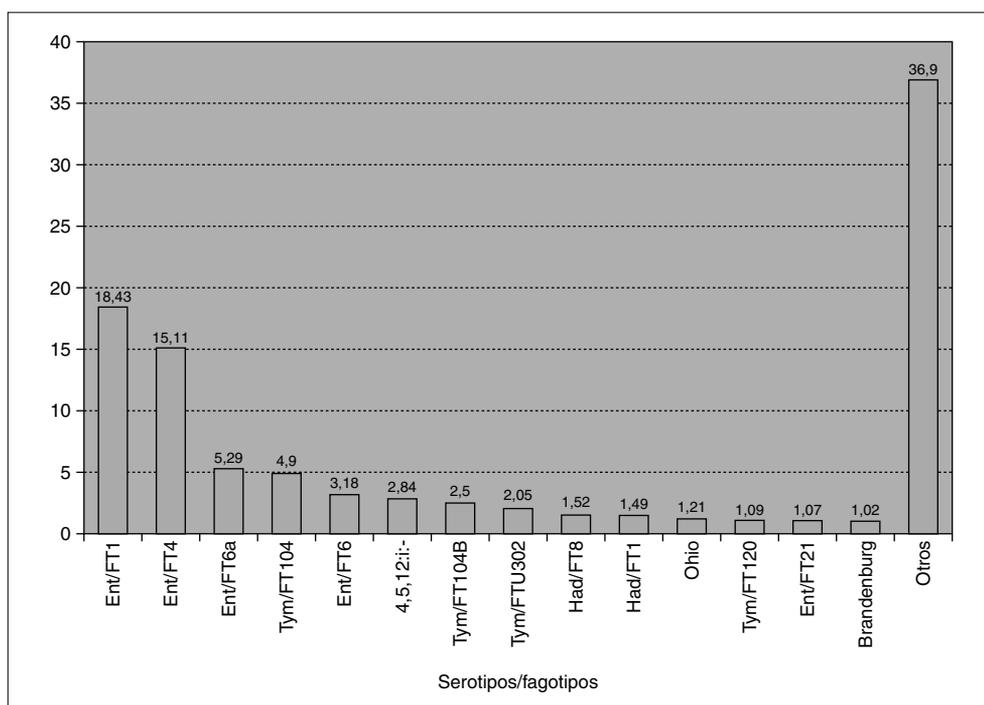


Figura 1. Distribución de los serotipos/fagotipos de *Salmonella* de origen humano más frecuentes en el periodo 1997-2001. Ent: serotipo Enteritidis; Tym: serotipo Typhimurium; Had: serotipo Hadar.

Bibliografía

- Boletín Epidemiológico Semanal. Comentario epidemiológico de las Enfermedades de Declaración Obligatoria y Sistema de Información Microbiológica. España, año 2002. Bol Epidemiol Sem 2003;11:157-62.
- Popoff MY. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Institut Pasteur, 2001.
- Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, et al. 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(Suppl 3):S149-56.
- Szekely E, Simon M. DNA sequence adjacent to flagellar genes and evolution of flagellar-phase variation. J Bacteriol 1983;155:74-81.
- Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol 2003;154:173-4.
- Ward LR, De Sa JDH, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. Epidemiol Infect 1987;99:291-4.
- Anderson ES, Ward LR, De Saxe MJ, De Sa JDH. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. J Hyg Camb 1977;78:297-300.
- De Sa JDH, Ward LR, Rowe B. A scheme for the phage typing of *Salmonella hadar*. FEMS Microbiol Lett 1980;9:175-7.
- Chambers RM, McAdam P, De Sa JDH, Ward LR, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella virchow*. FEMS Microbiol Lett 1987;40:155-7.

10. Guinne'e PAM, Van Neuween WJ. Phagotyping of *Salmonella*. *Methods Microbiol* 1978;11:157-91.
11. Boletín Epidemiológico Semanal. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Año 2001 (I y II). *Bol Epidemiol Sem* 2003;11:133-56.
12. Liébana E, Clouting C, García-Migura L, Clifton-Hadley FA, Lindsay E, Threlfall EJ, et al. Multiple genetic typing of *Salmonella enteritidis* phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. *Vet Microbiol* 2004;100:189-95.
13. Ewing WH. The genus *Salmonella*. In *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier, 1986; p. 181-245.
14. Popoff MY, Le Minor L. Guidelines for the preparation of *Salmonella* antisera. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Institut Pasteur, 1997.
15. 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.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS document M100-S12 [ISBN 1-56238-454-6]. NCCLS, 940 West Walley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2002.
17. Echeita MA, Díez R, Usera MA. Distribution of *Salmonella* spp. serotypes isolated in Spain during a 4-year period (1993-1996). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999;17:9-14.
18. Van Duijkeren E, Wannet WJ, Houwers DJ, Van Pelt W. Serotype and phage type distribution of salmonella strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol* 2002;40:3980-5.
19. World Health Organization. Who Global Salm-Surv South America Working Group, and Who Global Salm-Surv. A Who Global Salm-Surv Retrospective Study Examining *Salmonella* Serotypes in South America, 2000: Dominance of *Salmonella* Serotype Enteritidis. Disponible en: <http://www.who.int/emc/diseases/zoo/SALM-SURV/pdfs/SAICEID.pdf>.
20. Usera MA, Aladueña A, Díez R, Cerdán P, Gutiérrez R, Echeita A. Análisis de los serotipos de *Salmonella* sp. aisladas de muestras no humanas en 1996 en España. *Bol Epidemiol Sem* 1997;5(8):69-80.
21. Centers for Disease Control. *Salmonella* Surveillance Summary, 2002. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC, 2003.
22. Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA. Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J Clin Microbiol* 1999;37:3425.
23. Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, et al. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol* 2002;40:2074-8.
24. Patrick ME, Adcock PM, Gómez TM, Altekruise SF, Holland BH, Tauxe RV, et al. *Salmonella enteritidis* infections, United States, 1985-1999. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1-7.
25. Humphrey T. *Salmonella typhimurium* definitive type 104. A multi-resistant *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* 2001;67:173-86.
26. Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104—a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:7-10.
27. Usera MA, Aladueña A, González R, De la Fuente M, García-Pena J, Frías N, et al. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *J Food Prot* 2002;65:768-73.
28. Lawson AJ, Dassama MU, Ward LR, Threlfall EJ. Multiply resistant (MR) *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT 12 and DT 120: a case of MR DT 104 in disguise? *Emerg Infect Dis* 2002;8:434-6.
29. Walker RA, Lindsay E, Woodward MJ, Ward LR, Threlfall EJ. Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* phage-type U302 (MR U302) from humans, animals, and foods. *Microb Drug Resist* 2001;7:13-21.
30. Cruchaga S, Echeita A, Aladueña A, García-Pena J, Frías N, Usera MA. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:315-21.
31. Sullivan AM, Ward LR, Rowe B, Woolcock JB, Cox JM. Phage types of Australian isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Virchow*. *Lett Appl Microbiol* 1998;27:216-8.
32. Willocks LJ, Morgan D, Sufi F, Ward LR, Patrick HE. *Salmonella virchow* PT 26 infection in England and Wales: a case control study investigating an increase in cases during 1994. *Epidemiol Infect* 1996;117:35-41.
33. Usera MA. *Salmonella typhi* in Spain: Epidemiological markers and antimicrobial susceptibility (1979-1991). En: Cabello F, Hormaeche C, Mastroeni P, Bonina L, editors. *Biology of Salmonella*. New York and London: Plenum Press, 1993; p. 15-24.