

Búsqueda del plásmido de virulencia de *Salmonella* en aislamientos clínicos colombianos

Search of the *Salmonella* virulence plasmid in Colombian clinical isolates

DANIEL FELIPE PATIÑO-GARCÍA¹, NORA MARÍA CARDONA-CASTRO², MIRYAM MARGOT SÁNCHEZ- JIMÉNEZ³
Forma de citar: Patiño-García DF, Cardona-Castro NM, Sánchez- Jiménez MM. Búsqueda del plásmido de virulencia de *Salmonella* en aislamientos clínicos colombianos. Rev CES Med 2011; 25(1):54-64

RESUMEN

Introducción: *Salmonella* es un bacilo Gram negativo, patógeno intracelular que invade células intestinales no fagocíticas y macrófagos en un proceso complejo que requiere múltiples genes. El plásmido de virulencia de *Salmonella* "spv" contiene el gen spvR cuya función es aumentar su virulencia produciendo invasión sistémica en ratones.

Métodos: Se buscó el gen spvR de *Salmonella* spp en aislamientos clínicos humanos provenientes de pacientes con sintomatología sistémica (fiebre tifoidea) y no sistémica (diarrea), con el fin de comparar la presencia del gen con la clínica del paciente. El gen spvR se buscó en 55 aislamientos de *S. Typhi* de pacientes con fiebre tifoidea, 20 de *S. Enteritidis* y 20 de *S. Typhimurium*, aislados de pacientes con diarrea. Se realizó PCR a partir de ADN genómico y plasmídico. Los productos se secuenciaron y las secuencias obtenidas de material genómico y plasmídico se compararon utilizando análisis bioinformáticos.

1 Técnico profesional en Histocitotecnología. Estudiante Biología Universidad CES.

2 MD. MSc. Investigadora Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES. Grupo de investigación en Medicina Tropical, ICMT-CES. Correo electrónico: ncardona@ces.edu.co

3 Investigadora Instituto Colombiano de Medicina Tropical – Universidad CES. Grupo de Investigación en Medicina Tropical, ICMT-CES

Recibido: marzo 2 de 2011. Revisado: mayo 18 de 2011. Aceptado: mayo 26 de 2011

Resultados: El 100 % de los aislamientos de *S. Typhi* fueron negativos para *spvR*, mientras que 75 % de los aislamientos de *S. Enteritidis* y 40 % de *S. Typhimurium*, presentaron amplificación del gen *spvR*, tanto en material genómico como plasmídico. Se evidenció también la presencia de secuencias plasmídicas homólogas al gen *spvR* en regiones cromosomales de los serotipos estudiados.

Conclusiones: Los resultados muestran que la ausencia del plásmido de virulencia de *Salmonella* no está relacionada con la infección sistémica, pues no fue encontrado en *S. Typhi* productora de fiebre tifoidea. Se confirmó también que existe material cromosomal homólogo al gen *spvR* del plásmido de virulencia en el cromosoma de los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, pero no se encontró material similar en el cromosoma de *S. Typhi*.

PALABRAS CLAVE

Salmonella

Virulencia

Plásmido

Colombia

ABSTRACT

Introduction: *Salmonella* is a Gram negative bacillus, intracellular pathogen that invades non-phagocytic intestinal cells and macrophages in a complex process that requires multiple genes. The salmonella virulence plasmid "spv" contains the *spvR* gene whose function is to increase its virulence producing systemic invasion in mice.

Methods: We search for *spvR* gene in human clinical isolates of *Salmonella* spp from patients with systemic infection (typhoid fever) and with non-systemic infection (diarrheal), in order to compare the presence of the gene to clinical outcome. *spvR* was searched in 55 clinical isolates of *S. Typhi* from typhoid fever patients, 20 of *S. En-*

teritidis and 20 of *S. Typhimurium* isolates from patients with diarrheal. PCR from chromosomal and plasmid DNA was performed. The PCR products were sequenced and the sequences obtained from genomic and plasmid materials were compared using bioinformatics analysis.

Results: 55 (100 %) isolates of *S. Typhi* were negative for *spvR*. 15 (75 %) isolates of *S. Enteritidis* and 8 (40 %) of *S. Typhimurium* were positive for *spvR* both from genomic and plasmid material. These results show that clinical isolates of *S. Typhi* considered more virulent not showed *spvR*, and that diarrhea-producing serotypes *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in 75 and 40 % respectively were positive for the gene, questioning the role of virulence of the gene in strains producing human infections. It also showed the presence of plasmid gene sequences homologous to chromosomal regions in the studied serotypes.

Conclusion: Results show that the absence of the plasmid of *Salmonella's* virulence is not related with the systemic outcome in the clinical isolates of *Salmonella Typhi* that were studied. There was also confirmed that exists chromosomal material homologous to the gene *spvR* virulence plasmid in the chromosome of serotypes *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* but similar material wasn't found in *S. Typhi* chromosome.

KEY WORDS

Salmonella

Virulence

Plasmid

Colombia

INTRODUCCIÓN

Salmonella es un bacilo Gram negativo, patógeno intracelular que invade células intestinales no fagocíticas y macrófagos en un proceso complejo

que requiere múltiples genes (1). *Salmonella* spp puede infectar animales o humanos y es considerada una zoonosis (2). Dependiendo del serotipo de *Salmonella* se pueden producir diferentes manifestaciones clínicas como gastroenteritis (la cual puede ser producida por más de 2 000 serotipos), o fiebre tifoidea si el serotipo que infecta es *S. Typhi*, o fiebre paratifoidea producida por *S. Paratyphi A*, *Paratyphi B* o *Paratyphi C* (2,3).

El serotipo de *Salmonella* más estudiado ha sido el Typhimurium, debido a su fácil manipulación en el laboratorio y a la reproducción de un cuadro clínico que semeja la fiebre tifoidea de los humanos en un modelo murino (4). De los otros serotipos se posee menos información a nivel genómico (5).

El material genético de *S. Typhimurium* está compuesto por 4 600 genes organizados en un cromosoma único y por un plásmido específico de serotipo el cual varía en tamaño (6). Algunos serotipos presentan plásmidos de virulencia que son importantes para la producción de infección sistémica. Se conoce que ocho serotipos presentan el plásmido de virulencia de *Salmonella* (SPV): *S. Paratyphi C*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* y *S. Abortusovis* (7).

El SPV varía en tamaño dependiendo del serotipo: 95 kb para *S. Typhimurium*, 60 kb para *S. Enteritidis*, 80 kb para *S. Dublin* y entre 50 y 100 kb para *S. Choleraesuis* (5,7), y tiene una región altamente conservada de 7,8 kb, la cual es un operón compuesto por cinco genes, denominado región *spvRABCD* (8).

Estos genes *spv* se han definido sobre la base de su habilidad para aumentar la virulencia de serotipos de *Salmonella enterica* capaces de producir enfermedad letal en ratones (8). En estudios utilizando un modelo murino se demostró que los genes *spv* no afectan la colonización ni la invasión a través de la mucosa intestinal y que no son requeridos para infectar tejido extraintestinal como el hígado y el bazo; sin embargo,

aumentan significativamente la tasa de crecimiento de la bacteria dentro de este tejido, probablemente en un compartimiento intracelular de la bacteria de estos órganos (9).

Esta región *spv* pudo haber sido adquirida horizontalmente, ya que está ubicada adyacente a un elemento insercional y el contenido de guanina - citosina es más bajo (46 %) que en el resto del cromosoma de *S. Typhimurium* (8). Los genes *spv* son expresados durante la fase estacionaria del crecimiento y durante estadios intracelulares de infección; los serotipos que no poseen el plásmido de virulencia o que tienen la región *spv* cortada, son avirulentos en modelos animales (10). El gen *spvR* cumple una función importante en la virulencia, ya que regula a los otros cuatro genes que conforman el operón *spv* (11).

Hay reportes que mencionan que *S. Typhi* no tiene el plásmido de virulencia y que no todos los aislamientos de los serotipos lo poseen (8,12). Estas divergencias en la presencia o no de *spv* en distintos serotipos y la diversidad clínica que producen, confunden acerca del papel del plásmido de virulencia en la patogénesis de *Salmonella*, el cual continúa aún siendo un enigma. Siendo el *spv* importante en la producción de infección sistémica, llama la atención que no esté presente en el serotipo que produce fiebre tifoidea (5).

La mayoría de los estudios han sido realizados en cepas de laboratorio y en modelos murinos; hay pocos estudios de este tipo realizados en aislamientos clínicos de pacientes (12). En este trabajo se buscó *spv* en aislamientos clínicos de *S. enterica* provenientes de pacientes con diarrea y fiebre tifoidea, para comparar la presencia del plásmido con el serotipo y con el cuadro clínico producido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos estudiados

Se evaluaron 95 aislamientos: 55 de *S. Typhi* aisladas de pacientes con fiebre tifoidea, 20 de *S. Typhimurium* y 20 de *S. Enteritidis* aisladas

de pacientes con diarrea. Todas las cepas estudiadas son aislamientos de muestras clínicas humanas. Las cepas de *S. Typhi* se aislaron de pacientes afectados por un brote epidémico de fiebre tifoidea (infección sistémica), ocurrido en el año 2005 en Apartadó, Antioquia y de otros pacientes esporádicos con fiebre tifoidea. Las cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* fueron aisladas de pacientes con diarrea y quienes eran provenientes de Antioquia, Valle y Cundinamarca. Las cepas pertenecen al cepario del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) y se encontraban almacenados en agar blando más glicerol a -70°C . Para recuperarlos y confirmar características morfológicas, se replicaron en agar Mueller Hinton y en agar M^cConkey. Para confirmar características propias de género se les realizaron pruebas bioquímicas y para confirmar serovar se realizó PCR múltiple.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Extracción de ADN genómico: cada aislamiento almacenado se sembró en caldo BHI y se incubó a 37°C durante 18 horas para verificar su viabilidad. Posteriormente, al verificar turbidez en el medio, se procedió a sembrar una asada en agar Mueller Hinton y se incubó nuevamente a 37°C durante 18 horas; a partir del cultivo puro se tomaron dos colonias y se inocularon en $200\ \mu\text{L}$ de agua destilada estéril, se mezcló en vórtex y se realizó la extracción por el método de ebullición ("*boiling prep*") (13).

Brevemente, las muestras se sometieron a ebullición por 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 12 000 rpm, por cinco minutos y se transfirieron $100\ \mu\text{L}$ del sobrenadante a un tubo nuevo. El ADN genómico se conservó a -20°C hasta ser usado para la amplificación. Este proceso se realizó por duplicado para cada muestra. Se midió la concentración de ADN por espectrofotometría y se utilizó como muestra para PCR una concentración de $100\ \mu\text{M}$.

Extracción de ADN plasmídico: la extracción de ADN plasmídico se realizó solo en aquellos aislamien-

tos en los cuales se obtuvo amplificación del gen *spvR* a partir de ADN genómico. Se utilizó el protocolo *MiniPrep* (14), se tomaron varias colonias del agar Mueller Hinton y se sembraron en $1,5\ \text{ml}$ de agua destilada, se centrifugó a 11 000 rpm a 4°C por dos minutos, se aspiró el sobrenadante y posteriormente se adicionaron $100\ \mu\text{L}$ de solución 1 (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris); se resuspendió el sedimento con vórtex y se colocó en hielo por 5 m. Se adicionaron $200\ \mu\text{L}$ de solución 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS), se mezcló por inversión, se agitó y colocó en hielo por cinco minutos. Luego se adicionaron $150\ \mu\text{L}$ de solución 3 (3M NaOAC, pH= 4,80), se mezcló por inversión hasta que se formó un precipitado blanco y se colocó en hielo durante 5 m. Posteriormente se centrifugó a 11 000 rpm a 4°C durante 5 m, se transfirió el sobrenadante a tubos limpios, se adicionaron $450\ \mu\text{L}$ de fenol cloroformo isoamílico y se mezcló por inversión suavemente.

Luego se centrifugó a 11 000 rpm a 4°C por 5 m, se transfirió la capa superior acuosa a tubos limpios y se adicionó 1 mL de etanol absoluto frío, posteriormente se colocó en hielo 5 m, se centrifugó a 11 000 rpm a 4°C durante 5 m, se aspiró el sobrenadante, se adicionaron $500\ \mu\text{L}$ de etanol al 70 % al sedimento y se centrifugó nuevamente por otros 5 m, se aspiró el sobrenadante, se dejó secar y por último se resuspendió el sedimento en $50\ \mu\text{L}$ de TE y se guardó a -20°C hasta realizar la PCR.

Amplificación de ADN: Para la realización de las pruebas de PCR, tanto de material genómico como de material plasmídico, para buscar el gen *spvR* se utilizaron los reactivos y condiciones de amplificación que se pueden observar en los cuadros 1 y 2.

Iniciadores: Los iniciadores (*primers*) utilizados para detectar el gen *spvR* por PCR, fueron diseñados por investigadores de la sección de Microbiología Clínica y Experimental de la Universidad de Sassari - Italia (datos no publicados). Estos cebadores se diseñaron utilizando la secuencia del genoma de *S. Typhimurium* LT2 encontrado en el GenBank (número de acceso NC_003197). En el cuadro 3 se pueden observar las secuencias de estos cebadores.

Cuadro 1. REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE PCR

| Reactivo y concentración | Volumen |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Super mix (Invitrogen) | 15 μ L |
| Iniciador forward 10 μ M | 0,5 μ L |
| Iniciador reverse 10 μ M | 0,5 μ L |
| ADN | 4 μ L |
| Volumen final de la reacción | 20 μL |

Cuadro 2. CONDICIONES DE LA PRUEBA DE PCR

| Paso | Temperatura ($^{\circ}$ C) | Tiempo (min) | No. de Ciclos |
|-------------------|-----------------------------|--------------|---------------|
| Desnaturalización | 94 | 5 | 1 |
| Desnaturalización | 94 | 1 | |
| Alineamiento | 47 | 1 | 35 |
| Extensión | 72 | 1 | |
| Extensión final | 72 | 10 | 1 |
| | 4 | Indefinido | 1 |

Cuadro 3. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES PARA EL GEN SPVR Y TAMAÑO DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN

| Iniciador | Secuencia | Producto de amplificación |
|----------------|---|---------------------------|
| <i>spvR</i> Fw | 5'- CCCCAGGAATTCGCTGCATAAGGTCAGAAGG -3' | 890 pb |
| <i>spvR</i> Rv | 5'- CCCCAGGATCCATGGATTCTTGATTAATAAA -3' | |

Para todas las PCR realizadas se utilizó como control positivo la cepa ATCC 14028 de *S. Typhimurium*, en la cual están presentes la secuencia que se buscó en el presente trabajo y como control negativo se utilizó agua destilada estéril.

Confirmación de serotipo: Se realizaron dos PCR múltiples para confirmar los serotipos de los aislamientos incluidos en el estudio, con cebadores específicos desarrollados previamente (15,16). En la primera PCR se realizó la confirmación de serogrupo (15) y en la segunda PCR múltiple se realizó la confirmación de serotipo (16).

Detección de productos de amplificación: Para el gen *spvR* 10 μ L del producto de amplificación se fraccionaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR® SAFE, a 100 voltios por una hora. En cada gel se corrieron adicionalmente un control positivo y un control negativo, además de un marcador de peso molecular GeneRuler 100pb DNA ladder (Fermentas, Toronto, Canadá). Para la PCR de serogrupo y la de serotipo se utilizó un gel con las mismas condiciones pero con una concentración de agarosa del 2,5 %.

Secuenciación de los productos de amplificación: Para conocer la secuencia del producto amplificado, fue enviado a Macrogen (Corea).

Análisis de los fragmentos amplificados: Los fragmentos secuenciados se analizaron en el software en línea BLAST y el software BioEdit, para determinar sus similitudes. Se realizó el análisis *in silico* de los cebadores que se utilizaron en el estudio, con la base de datos BLAST, para verificar nuevamente su especificidad, pues estas bases de datos genómicas son actualizadas constantemente.

Control de errores y sesgos: Cada ensayo de laboratorio se realizó por triplicado para evitar falsos positivos o falsos negativos, se usaron también controles negativos y positivos para la realización de las pruebas.

Aspectos éticos: Las cepas estudiadas provienen de cepario, por lo tanto no hubo contacto con el paciente en este estudio.

Procesamiento y análisis de los resultados

Se elaboró una base de datos en el programa Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp., Redmond, WA) y el procesamiento de la información se realizó en el programa Epi Info versión 6,0. El análisis estadístico de las variables cualitativas se realizó mediante el cálculo de frecuencias absolutas y relativas. Se realizó una PCR electrónica *in silico* (<http://insilico.es>) para comprobar la especificidad de los *primers* usados. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar y se compararon las secuencias obtenidas utilizando el software BioEdit y la base de datos BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para búsqueda de información genómica de *Salmonella*.

RESULTADOS

El 100 % de los aislamientos de *S. Typhi* fueron negativos para *spvR*, mientras que 75 % de los aislamientos de *S. Enteritidis* y 40 % de *S. Typhimurium*, presentaron amplificación del gen *spvR*, tanto en material genómico como plasmídico. Se evidenció también la presencia de secuencias plasmídicas homólogas al gen *spvR* en regiones cromosomales de los serotipos estudiados. Al realizar el BLAST a los cebadores para el gen *spvR*, se evidenció que estos amplifican no solo este gen, sino también otros ubicados en otros plásmidos de serotipos de *Salmonella* como los genes *mba1*, *mkfC*, *mkfD* y *vsdA-F*. También amplifican *in silico* los genes *mkaC*, *virR* y *katF* que se encuentran en el cromosoma de *S. Typhimurium*, factor que se solucionó con la secuenciación de los productos la cual permitió definir si *spvR* fue amplificado. En ninguna de las 55 muestras de *S. Typhi* se encontró el gen *spvR* (Figura 1).

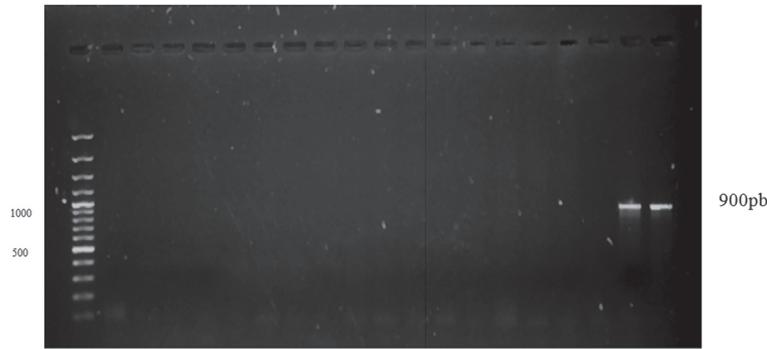


Figura 1. PCR PARA DETECTAR SPVR EN AISLAMIENTOS DE S. TYPHI ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1 % DE PCR PARA EL GEN SPVR .

Línea 1: Marcador de peso molecular 100 pb, Línea 2: Control negativo, Línea 3: Muestra STyphi101, Línea 4: Muestra STyphi104, Línea 5: Muestra STyphi106, Línea 6: Muestra STyphi110, Línea 7: Muestra STyphi114, Línea 8: Muestra STyphi121, Línea 9: Muestra STyphi132, Línea 10: Muestra STyphi140, Línea 11: Muestra STyphi143, Línea 12: Muestra STyphi147, Línea 13: Muestra STyphi148, Línea 14: Muestra STyphi149, Línea 15: Muestra STyphi150A, Línea 16: Muestra STyphi152, Línea 17: Muestra STyphi153A, Línea 18: Muestra STyphi156A, Línea 19: Control positivo; Línea 20: Control positivo.

De los otros 20 aislamientos del serotipo S. Enteritidis, 15 (75 %) presentaron amplificación del gen spvR y de los 20 aislamientos de S. Typhimurium, 8 (40 %) presentaron el gen spvR tanto a nivel genómico como plasmídico (Figura 2).

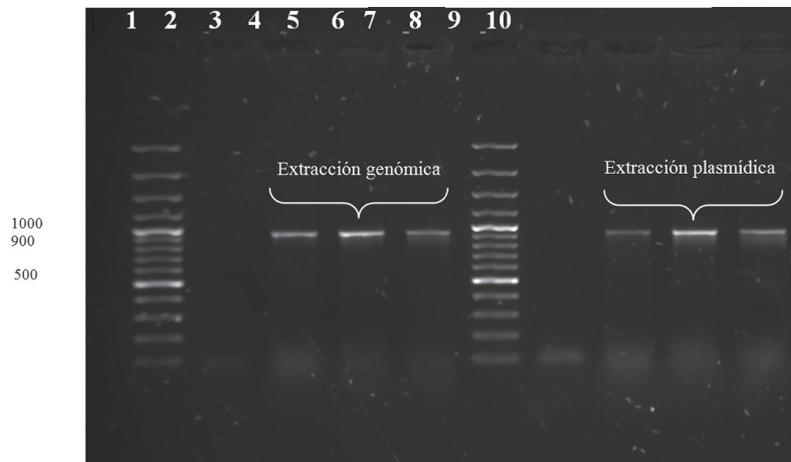


Figura 2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1 % DE PCR PARA LA DETECCIÓN DEL GEN SPVR DEL PLÁSMIDO DE VIRULENCIA DE SALMONELLA ENTERITIDIS

Línea 1: marcador de peso molecular fermentas de 100 pb, Línea 2: control negativo S. Typhi, Línea 3: cepa 16 (S. Enteritidis), Línea 4: cepa 18 (S. Enteritidis), Línea 5: cepa 105 (S. Enteritidis), Línea 6: marcador de peso molecular fermentas de 50 pb Línea 7: control negativo S. Typhi. Línea 8: cepa 16 (S. Enteritidis), Línea 9: cepa 18 (S. Enteritidis), Línea 10: cepa 105 (S. Enteritidis).

La comparación de las secuencias obtenidas utilizando el software BioEdit y la base de datos BLAST del NCBI concluyen que tanto los productos de ADN genómico como de ADN plasmídico, presentaron secuencias altamente similares en todos los aislamientos analizados. No se encontró *in silico* ninguna secuencia similar en el cromosoma ni en plásmidos de *S. Typhi*.

DISCUSIÓN

Los resultados confirmaron la ausencia del plásmido de virulencia de *Salmonella* en los aislamientos clínicos colombianos de *S. Typhi* estudiados. Se confirmó también que existe material cromosomal homólogo al gen *spvR* del plásmido de virulencia en el cromosoma de los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, pero no se encontró material similar en el cromosoma de *S. Typhi*.

Los resultados de este trabajo concuerdan con lo expuesto por Rotger y colaboradores (7) quienes reportan la presencia del plásmido de virulencia solo en algunos serotipos de *Salmonella* (*S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi C*, *S. Dublin*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* y *S. Abortusovis*) y no en todos los aislamientos del mismo serotipo. Esto es también similar a lo reportado por Bacci y colaboradores (17), quienes analizaron aislamientos de diferentes serotipos de *Salmonella* provenientes de cerdos y ganado vacuno y encontraron el gen *spvR* en uno de diez aislamientos de *S. Enteritidis* y en cuatro de 13 aislamientos de *S. Typhimurium*.

Es poco lo reportado en la literatura sobre la presencia del plásmido de virulencia de *Salmonella* en *S. Typhi*. En este trabajo se descartó esta posibilidad por lo menos en los 55 aislamientos colombianos analizados, pero en una investigación de Huang y colaboradores (18) se reporta la presencia del gen *spvR* en el plásmido pR_{st98}, que es un plásmido que confiere resistencia a antibióticos en aislamientos de *S. Typhi*. Esta podría ser una posibilidad a tener en cuenta en

futuros análisis en más aislamientos colombianos de *S. Typhi*, pues en el presente trabajo solo se investigó la presencia de *spvR* y no la presencia de otros plásmidos en los cuales podría estar incluido este gen y que están involucrados en procesos de virulencia de los serotipos que los portan, igual función que la atribuida al plásmido de virulencia (19-21).

S. Typhi produce en humanos fiebre tifoidea, siendo éstos los únicos hospederos identificados para este serotipo (19,20). *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son aisladas con frecuencia de pacientes con diarrea y por su transmisión se conoce como zoonosis, pues las cepas que infectan al humano provienen de hospederos animales y se adquieren por contaminación hídrica y alimentaria (20).

La presencia de genes de virulencia como *spv* se ha asociado a la capacidad invasora de las cepas, la cual estaría relacionada con el tipo de sintomatología que producen en el hospedero (21). Se conoce por experimentos previos que los genes *spv* son expresados durante la fase estacionaria del crecimiento y durante estadios intracelulares de infección; los serotipos que no poseen el plásmido de virulencia o que tienen la región *spv* cortada, son avirulentos en modelos animales (10). Sin embargo, estos estudios son realizados con modelos animales de infección y difieren con lo encontrado en aislamientos clínicos de pacientes (7,17).

En nuestro estudio encontramos que el 100 % de los aislamientos de *S. Typhi* fueron negativos para *spvR*, tampoco encontramos material cromosomal homólogo al gen *spvR* del plásmido de virulencia en el cromosoma de *S. Typhi*, pero sí en el cromosoma y en otros plásmidos de otros serotipos de *S. enterica*.

Estos hallazgos en aislamientos de *S. Typhi* de muestras clínicas de pacientes colombianos concuerdan con lo encontrado por otros investigadores (7,17), y pudieran ayudar a esclarecer

que este gen no tiene función de invasividad en *S. Typhi* si se tiene en cuenta el carácter invasivo de la bacteria para producir fiebre tifoidea (22-24).

El 75 % de los aislamientos estudiados de *S. Enteritidis* y 40 % de *S. Typhimurium*, fueron positivos para el gen *spvR*, tanto en material genómico como plasmídico, cepas aisladas de pacientes con diarrea sin enfermedad sistémica, corroborando que el papel de este plásmido de invasividad pudiera haber sido sobreestimado en los resultados obtenidos con los modelos animales (10).

El número de cepas estudiadas corresponde a una muestra limitada, por lo tanto con estos resultados no podemos afirmar que todos los aislamientos de *Salmonella* en pacientes colombianos tengan las mismas características encontradas en este trabajo.

Se conoce que el gen *spvR* cumple una función importante en la virulencia ya que regula a los otros cuatro genes que conforman el operón *spv* (11). Siendo el *spv* importante en la producción de infección sistémica, llama la atención que no esté presente en el serotipo que produce fiebre tifoidea y que se encuentre en serotipos que producen diarrea sin invasión sistémica (25,26).

Estas divergencias en la presencia o no de *spv* en distintos serotipos y la diversidad clínica que producen, confunden acerca del papel del plásmido de virulencia en la patogénesis de *Salmonella* (27,28).

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés con los resultados obtenidos en este trabajo.

FINANCIACIÓN

Este proyecto fue financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad CES (Código 200709 C112), por Colciencias (Código 3256-

408-20564) y por el Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES.

REFERENCIAS

1. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Mol Microbiol Rev* 1999;12:405-28.
2. Miller S, Hohmann E, Pegues DA. *Salmonella* (including *Salmonella Typhi*) in: Mandell J, Bennett A, Dolin E (eds). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th Ed. Philadelphia, Churchill Livingstone 2004; 2013-33.
3. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Salmonella*. In: Michael Braun Ed. *Medical Microbiology*. 3a ed. St Louis: Mosby Inc; 1998. p. 237-39.
4. Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella Typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 1995; 15: 749-59.
4. Chu CS, Hong SF, Tsai CJ, Lin WS, Liu TP, Ou JT. Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Choleraesuis*, and *Dublin*. *Infect Immun* 1999; 67:2611-2614
4. McClelland M, Florea L, Sanderson K, Clifton SW, Parkhill J, Churcher C et al. Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with samples genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, *Typhimurium*, *Typhi* and *Paratyphi*. *Nucleic Acid Res* 2000; 24: 4974-86.
5. Rotger R, Casadesús J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Internatl Microbiol* 1999; 2:177-84

6. Lax AJ, Pullinger GD, Spink JM, Qureshi F, Wood MW, Jones PW., Plasmid genes involved in virulence in Salmonella, In: Biology of Salmonella, 1993, Edited by F. Cabello et al. Plenum Press, New York.
7. Libby SJ, Adams LG, Ficht TA, Allen C, Whittford HA, Buchmeier NA, Bossie S, Guiney DJ. The spv genes on the Salmonella Dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. Infect Immun 1997; 65: 1786-92.
8. Gulig PA, Doyle TJ. The Salmonella Typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. Infect Immun 1993; 61:504-511.
9. Boyd EF, Hartl DL. Salmonella Virulence Plasmid: Modular Acquisition of the spv Virulence Region by an F-Plasmid in Salmonella enterica Subspecies I and Insertion Into the Chromosome of Subspecies II, IIIa, IV and VII Isolates. Genetics 1998; 149: 1183-90.
10. Geimba MP, Tondo EC, De Oliveria FA, Canal CW, Brandelli A. Serological characterization and prevalence of spvR gene in Salmonella isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. J Food Prot 2004; 67: 1229 – 33.
11. Fantasia M, Paglietti B, Filetici E, Anastasio MP, Rubino S. Conventional and molecular approaches to isolates of Salmonella hadar from sporadic and epidemic cases. J Appl Micro 1997; 82: 494-8
12. Chowdhury K. One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. Nuc Acid Res 1991; 19: 2792.
13. Lavalett L, Sánchez M, Muñoz N, Moreno J, Cardona-Castro N. Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de Salmonella enterica. Biomédica 2009;29:244-52.
14. Cardona-Castro N, Sánchez-Jiménez M, Lavalett L, Muñoz N, Moreno J. Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay to identify Salmonella serogroups and serotypes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 65 (2009) 327-330.
15. Bacci C, Paris A, Salsi A, Bonardi S, Brindani F. Relation between the presence of extra-chromosomal DNA and virulence features in Salmonella enterica strains. Ann Fac Medic Vet di Parma 2005; XXV: 175-180.
16. Huang R, Wu S, Zhang X, Zhang Y. Molecular analysis and identification of virulence gene on pRST98 from multi-drug resistant Salmonella Typhi. Cell Mol Immun 2005; 2: 136-140.
17. Hornick RB. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XX Typhoid fever. Rev Infect Dis 1985; 7: 536-46.
18. Hendriksen SWM, Orsel K, Wagenaar JA, Miko A, van Duijkeren E. Animal-to-Human Transmission of Salmonella Typhimurium DT104A Variant. Emer Infect Dis 2004; 10: 2225-7.
19. Concha- Valdez FG, Flores-Abuxapqui JJ, Puc-Franco MA, Heredia-Navarrete MR. Frecuencia del gen spv en cepas de Salmonella spp. aisladas de niños con y sin diarrea. Rev Biomed 2004; 15: 201-6.
20. Ramos-Morales F, Prieto AI, Beuzón CR, Holden DW, Casadesús J. Role for *Salmonella enterica* enterobacterial common antigen in bile resistance and virulence. J Bacteriol 2003; 185: 5328-32.
21. Figueroa-Bossi N, Bossi L. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. Mol Microbiol 1999; 33: 167- 76.
22. Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. Variable assortment of prophages provi-

des a transferable repertoire of pathogenic determinants in lysogenic conversion is a major mechanism driving the evolution of *Salmonella* bacteria. Mol Microbiol 2001; 39: 260-71.

23. Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B. Genotypic Characterization of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. J Clinical Microbiol 1998; 36:2314-21.

24. Refsum TH, Heir E, Kapperud G, Vardund T, Holstad G. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates determined by Pulsed-Field gel electropho-

resis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway. Appl Envir Microbiol 2002; 68: 5600-6.

25. Parvathi A, Vijayan J, Murali G, Chandran P Comparative virulence genotyping and antimicrobial susceptibility profiling of environmental and clinical *Salmonella enterica* from Cochin, India. Curr Microbiol 2011; 62:21-6.

26. Ammari S, Laglaoui A, En-nanei L, Bertrand S, Wildemauwe C, Barrijal S, Abid M Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from foods and patients in northern Morocco. J Infect Dev Ctries 2009; 9:695-703.

