

Caracterización de cepas clínicas y ambientales de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg aisladas en Chile

CARMEN ARAVENA^{1,6,a,b}, BÁRBARA VALENCIA^{2,d},
ANDREA VILLEGAS^{2,d}, MAURICIO ORTEGA^{1,e},
ALDA FERNÁNDEZ R.^{3,c}, PAMELA ARAYA R.^{3,a},
ANÍBAL SAAVEDRA^{2,4,c}, ROSA DEL CAMPO^{5,b}

Characterization of *Salmonella* Heidelberg strains isolated in Chile

Background: *Salmonella Heidelberg* (*S. Heidelberg*) causes gastroenteritis and sometimes bacteremia and endocarditis. In other countries, this serovar has multidrug resistance including extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and AmpC β -lactamases (AmpC), associated with the *bla*_{CMY-2} gene. In Chile, an outbreak by *S. Heidelberg* occurred in 2011, the phenotypic and genetic characteristics of Chilean strains are unknown. **Aim:** To determine the antimicrobial susceptibility, presence of plasmids and virulence factor genes in *S. Heidelberg* strains isolated in Chile over the period 2006-2011. **Material and Methods:** In sixty-one *S. Heidelberg* clinical and environmental strains collected by the Public Health Institute in Chile during 2006-2011, antimicrobial susceptibility, plasmids and virulence factor genes (*invA*, *sifA*, *pefA*, *agfA*, *lpfA* and *stkD*) were studied. **Results:** *S. Heidelberg* had a high susceptibility to sulfamethoxazole-trimethoprim, gentamicin, ceftriaxone, ceftiofur, chloramphenicol, amoxicillin-clavulanic acid and ampicillin. However, 52% had decreased susceptibility to ciprofloxacin and 33% resistance to tetracycline. ESBLs were detected in three strains isolated from blood cultures, environment and human feces. The latter strain was positive for AmpC and *bla*_{CMY-2} gene. Fifty three of 61 strains showed one to seven plasmids of 0.8 to approximately 30 kb. Most plasmids were small with sizes between 0.8 and 2 kb. All isolates were positive for all genes except *pefA*. **Conclusions:** *S. Heidelberg* isolated from Chilean samples was susceptible to first-line antimicrobials, except tetracycline and ciprofloxacin. The emergence of strains with ESBLs and AmpC should be a warning. The strains were homogeneous for virulence genes, but heterogeneous in their plasmids.

(Rev Med Chile 2019; 147: 24-33)

Key words: Drug Resistance; Gastroenteritis; Plasmids; *Salmonella enterica*.

¹Escuela de Medicina, Campus San Felipe, Universidad de Valparaíso. San Felipe, Chile.

²Escuela de Tecnología Médica, Campus San Felipe, Universidad de Valparaíso. San Felipe, Chile.

³Laboratorio de Bacteriología, Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago, Chile.

⁴Laboratorio de Microbiología Clínica Río Blanco. Los Andes, Chile.

⁵Laboratorio de Bacteriología, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria. Madrid, España.

⁶Centro Interdisciplinario de Investigación en Salud Territorial del Valle de Aconcagua, Universidad de Valparaíso. San Felipe, Chile.

^aBioquímico.
^bPhD.

^cTecnólogo Médico.

^dEstudiante de Tecnología Médica.

^eEstudiante de Medicina.

Apoyo financiero: Dirección de Investigación Universidad de Valparaíso. Proyecto DIUV N° 71/2011.

La ayuda recibida para la ejecución del proyecto a través de la dirección de Investigación Universidad de Valparaíso y la colaboración del ISP Chile al donar las cepas bacterianas para el estudio, no influyó en el diseño del estudio, en la recolección, análisis o interpretación de los datos, ni en la preparación, revisión o aprobación del manuscrito. Por tanto, no existe conflicto de interés con ninguna de las instituciones que apoyaron este proyecto.

Recibido el 6 de septiembre de 2018, aceptado el 18 de diciembre de 2018.

Correspondencia a:
Carmen Aravena Molló
Avda. Miraflores 2085 A. Anexo HOSCA. Casilla 296. San Felipe – V Región.
carmen.aravena@uv.cl

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Heidelberg, que por convención y simplicidad nombraremos como *S. Heidelberg*, es uno de los serovares de *Salmonella* más frecuentemente aislados en casos de gastroenteritis

en Canadá y Estados Unidos de Norteamérica^{1,2}. Carnes de aves de corral y huevos la principal fuente de transmisión a humanos^{3,4}. *S. Heidelberg* ha mostrado ser muy invasiva causando septicemia y endocarditis⁵⁻⁷. En Brasil, África y en Norteamérica

se han descrito cepas de *S. Heidelberg* multirresistentes a los antimicrobianos provenientes de carnes de ave, cerdos y huevos^{1,4,8,9}, lo que se atribuye al uso de ceftiofur y también de florfenicol en la producción animal^{4,5,10}. Particularmente, la resistencia a ceftiofur, una cefalosporina de tercera generación, se asocia a la resistencia múltiple a drogas y a la presencia del gen *bla*_{CMY-2} que codificaría para una β -lactamasa plasmidial tipo AmpC, presente en enterobacterias y muy prevalente en *Escherichia coli* y *Salmonella*^{4,9,11-14}.

En *S. Heidelberg*, variaciones en la capacidad de invasión y colonización de las cepas se han asociado a diferencias en la presencia de genes de virulencia (*invA*, *agfA* y *lpfA*) y en el patrón de electroforesis en gel de campo pulsado^{6,15}.

En Chile, *Salmonella* Enteritidis es el serovar causante de gastroenteritis más frecuente en los últimos 20 años^{16,17}; sin embargo, se observó un incremento de *S. Heidelberg* en 2011 respecto a los años 2006-2010 (Fernández A et al. 2011, X Jornadas Científicas, Instituto de Salud Pública de Chile). Esto se puede atribuir al surgimiento de nuevas variantes genéticas con mayor capacidad patógena, aunque actualmente se desconocen las características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. Heidelberg* que circulan en nuestro país. Por ello, el objetivo de este estudio fue caracterizar la susceptibilidad antimicrobiana, la presencia de plásmidos, genes de resistencia y de virulencia de cepas de *S. Heidelberg* aisladas en Chile en el período mencionado.

Material y Métodos

Cepas bacterianas

Seisenta y un aislamientos (32 clínicos y 29 ambientales o no humanos) de *S. Heidelberg* de diferentes partes de Chile y remitidos al Instituto de Salud Pública de Chile (ISP Chile) entre los años 2006 y 2011, se seleccionaron aleatoriamente entre 9 y 10 aislamientos por año, considerando ambos orígenes (Tabla 1). *S. Heidelberg* se identificó por técnicas microbiológicas convencionales y por serología según métodos estándar en ISP Chile¹⁸. Para diferentes pruebas se usaron cepas controles: *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella* Typhimurium LT2.

Susceptibilidad antimicrobiana

Se realizó por método de difusión en agar con sensidiscos¹⁹. Se utilizó agar Mueller Hinton (Val-

tek Diagnostics, Chile) y sensidiscos de: ceftiofur (30 μ g), sulfametoxazol-trimetoprim (25 μ g) y cloranfenicol (30 μ g) (Oxoid, Reino Unido). Para amoxicilina-ácido clavulánico, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacino, ampicilina y ceftriaxona se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) usando M.I.C. EvaluatorTM (Oxoid, Reino Unido). Ambos métodos se realizaron en condiciones estándar y por duplicado para cada aislamiento, la interpretación fue según los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute*²⁰. BLEE y AmpC se determinaron mediante test de inhibición con sensidiscos utilizando ceftazidima (30 μ g), ceftazidima-clavulanato (30/10 μ g) y cefotaxima (30 μ g) y cefotaxima-clavulanato (30/10 μ g) utilizando los criterios para *K. pneumoniae*¹⁹.

Extracción de plásmidos

Una o 2 colonias de *S. Heidelberg* crecidas en agar *Salmonella-Shigella* (HiMedia, India) se cultivaron en 10 ml de caldo Luria Bertani (Omega Bio-Tek, USA) a 37 °C por 18 h, para obtener luego el ADN plasmídico con *kit* de extracción E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II (Omega Bio-Tek, USA). El ADN se cuantificó por fotometría y 0,5 μ g de ADN plasmidial se mezclaron con tampón de carga ADN 6X (Thermo Scientific) incubando a 100 °C por 3 min para evitar la formación concatámeros. Los plásmidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, según Takahashi y Nagano, 1984²¹. El ADN teñido con Gel Red (Biotium, USA) fue visualizado en transiluminador UV. El tamaño de cada plásmido se determinó por comparación con fragmentos patrones de fago Lambda DNA/*Hind*III y 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Extracción de ADN bacteriano

Se realizó según Fadl et al., 1995²². El ADN bacteriano se cuantificó y visualizó en las mismas condiciones que los plásmidos.

Detección de genes

Los genes *agfA*, *lpfA*, *sifA*, *stkD*, *pefA*, *invA* y el gen *bla*_{CMY-2} fueron detectados por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de punto final, según condiciones indicadas en la Tabla 2. La secuencia nucleotídica parcial de los genes se obtuvo desde el producto de RCP usando como templado ADN de la cepa SH06. La secuenciación se realizó en secuenciador automático ABI PRISM

Tabla 1. Cepas de *S. Heidelberg* estudiadas, código de identificación de cada cepa, año de recolección y origen (n = 61)

Cepa	Año	Origen	Cepa	Año	Origen
SH01	2006	Clínico	SH32	2009	Pavo
SH02	2006	Clínico	SH33	2009	Clínico
SH03	2006	Animal n/e	SH34	2009	Superficie n/e
SH04	2006	Clínico	SH35	2010	Pollo
SH05	2006	No humano n/e	SH36	2010	Cerdo
SH06	2006	Clínico	SH37	2010	Clínico
SH07	2006	Pavo crudo	SH38	2010	Aves n/e
SH08	2006	Clínico	SH39	2010	Aves n/e
SH09	2006	Agua cloacas	SH40	2010	Aves n/e
SH10	2007	Clínico	SH41	2010	Pollo
SH11	2007	Clínico	SH42	2010	Pollo
SH12	2007	Clínico	SH43	2010	Clínico
SH13	2007	Pavo crudo	SH44	2010	Carne de pavo
SH14	2007	Ensalada surtida	SH45	2010	Clínico
SH15	2007	Clínico	SH46	2010	Clínico
SH16	2007	No humano n/e	SH47	2010	Clínico
SH17	2007	Clínico	SH48	2010	Pollo
SH18	2008	Clínico	SH49	2010	Ave
SH19	2008	Clínico	SH50	2010	Pavo
SH20	2008	Clínico	SH51	2010	Clínico
SH21	2008	Carne pollo	SH52	2011	Clínico
SH22	2008	Jamón de cerdo	SH53	2011	No humano n/e
SH23	2008	Pollo	SH54	2011	Clínico
SH24	2008	Alimento n/e	SH55	2011	Clínico
SH25	2008	Clínico	SH56	2011	Clínico
SH26	2009	Pavo cocido	SH57	2011	Clínico
SH27	2009	Clínico	SH58	2011	Clínico
SH28	2009	Clínico	SH59	2011	Clínico
SH29	2009	Clínico	SH60	2011	Pollo
SH30	2009	Ciegos de rata	SH61	2011	Ave
SH 31	2009	Clínico			

n/e= no especificado; clínico= cepas obtenidas desde pacientes humanos.

310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) según Sanger et al., 1977²⁸. Las secuencias fueron ingresadas en GenBank®: *bla*_{CMY-2} (KP340125), *invA* (KX267824), *agfA* (KY564364), *sifA* (KY564365) y *stkD* (KY564366).

Conjugación bacteriana

Para la conjugación se usaron como dadoras las cepas de *S. Heidelberg* resistentes a ceftriaxona y a ceftiofur y como cepa receptora una *E. coli* K-12 (Bio-Rad, USA) resistente a rifampicina

Tabla 2. Partidores utilizados para la detección de genes de virulencia en *S. Heidelberg*. Se indica el tamaño de la región amplificada, la temperatura utilizada en la etapa de annealing y la publicación de donde se obtuvo la secuencia de los partidores

Gen	Partidores	Tamaño pb	T° annealing	Referencia
<i>agfA</i>	F: tccacaatggggcgggcg R: cctgacgcaccattacgctg	350	54 °C	(23)
<i>bla_{CMY-2}</i>	F: gacagccttttccaca R: tggaaacgaaggctacgta	1.000	50 °C	(24)
<i>lpfA</i>	F: ctttcgctgctgaatctggt R: cagtgttaacagaaccagt	250	54 °C	(25)
<i>pefA</i>	F: ttccattattgcactgggtg R: aagccactgcaaaagatgcc	496	62 °C	(26)
<i>sifA</i>	F: ttgcccgaacgcggccacacg R: gttgcctttcttgcctttccaccatct	449	66,5 °C	(27)
<i>invA</i>	F: cgatagcctggcgtgggttt R: gcgggatctggcgacaag	411	62 °C	Diseño propio
<i>stkD</i>	F: cccctgtgtagccgaattt R: gcttgcgctaactcacta	467	60 °C	Diseño propio

F = forward; R = reverse; *agfA* = gen de operón fimbria tipo 1; *bla_{CMY-2}* = gen de β-lactamasa tipo AmpC; *lpfA* = gen de fimbria largo polar; *pefA* = gen adhesina de fimbria codificado en plásmido; *sifA* = gen de factor que favorece la multiplicación bacteriana en macrófago; *invA* = gen de factor de invasión epitelial; *stkD* = gen fimbrial putativo; pb = pares de bases; T° = temperatura; °C = grados Celsius.

(100 µg/mL), según protocolo de Phornphisuthimas et al. 2007²⁹.

Análisis estadístico

Se agruparon las cepas de *S. Heidelberg* según la presencia de plásmidos de tamaño similar por análisis de clúster de tipo jerárquico, con *software* estadístico STATA 11 (StataCorp) para Windows (Microsoft Corporation).

Electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP)

Se realizó EGCP a las cepas de *S. Heidelberg* BLEE positivas, según el protocolo de CDC Pulse Net (<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/index.html>, último acceso el 9 de julio de 2018) usando la enzima *XbaI*.

Resultados

Susceptibilidad a los antimicrobianos

Los aislamientos de *S. Heidelberg* clínicos y ambientales mostraron una susceptibilidad mayor al 90% en los antimicrobianos probados excepto

para tetraciclina y ciprofloxacino (Tabla 3). Cepas de todos los años mostraron resistencia a tetraciclina con mayor proporción en cepas clínicas que en ambientales. Con ciprofloxacino, *S. Heidelberg* no mostró resistencia, pero 52,5% de las cepas tuvo susceptibilidad intermedia (CIM entre 0,12-0,5 µg/ml), disminuyendo la susceptibilidad a este antimicrobiano. De todos los aislamientos estudiados, 11 (18%) fueron susceptibles a todos los antimicrobianos probados y 18 (29,5%) mostraron resistencia a 1 o más antimicrobianos (12 clínicas y 6 ambientales), el resto fueron cepas con susceptibilidad intermedia a ciprofloxacino (resultados no se muestran). Dos cepas de *S. Heidelberg* del año 2006, una ambiental (SH05) y otra de deposiciones (SH06), más un aislado de hemocultivo (SH 52) año 2011, mostraron resistencia simultánea a ceftiofur, ampicilina, ceftriaxona y a amoxicilina-ácido clavulánico. Todas ellas fueron positivas para BLEE, aunque solo la cepa SH06 fue positiva para AmpC y para el gen *bla_{CMY-2}*, además, esta cepa transfirió la resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico a *E. coli* K-12 por conjugación de un plásmido de cerca de 30 kb,

Tabla 3. Susceptibilidad antimicrobiana de *S. Heidelberg*. Se muestra el porcentaje de la susceptibilidad total de todas las cepas (n = 61) y la susceptibilidad según el origen de las cepas, aislamientos clínicos (n = 32) y ambientales (n = 29)

Antimicrobiano	Origen	% S	% I	% R	% S total
Ampicilina	Clínico	90,6	0	9,4	91,8
	Ambiental	93,1	0	6,9	
Amoxicilina/ácido clavulánico	Clínico	93,8	0	6,3	93,4
	Ambiental	93,1	0	6,9	
Ceftriaxona	Clínico	93,8	0	6,3	95,1
	Ambiental	96,6	0	3,4	
Ceftiofur	Clínico	93,8	0	6,3	95,1
	Ambiental	96,6	0	3,4	
Gentamicina	Clínico	100	0	0	100
	Ambiental	100	0	0	
Tetraciclina	Clínico	50,0	18,8	31,3	50,8
	Ambiental	51,7	34,5	13,8	
Cloranfenicol	Clínico	96,9	3,1	0	95,1
	Ambiental	93,1	6,9	0	
Ciprofloxacino	Clínico	71,9	28,1	0	47,5
	Ambiental	20,7	79,3	0	
Sulfametoxazol-Trimetoprim	Clínico	100	0	0	100
	Ambiental	100	0	0	

% = porcentaje; S = susceptibilidad; I = Susceptibilidad intermedia; R = resistencia y S total = como susceptibilidad de todas las cepas.

como el detectado en la cepa dadora. El análisis por campo pulsado de las cepas BLEE positivas mostró que son clones estrechamente relacionados (los resultados no se muestran).

Plásmidos en *S. Heidelberg*

Cincuenta y tres cepas (87%) mostraron desde uno a siete plásmidos, con tamaños desde 0,8 hasta cerca de 30 kb, el resto, 7 aislamientos, no mostraron plásmidos. El análisis de clúster de los plásmidos de *S. Heidelberg* mostró que hay perfiles que se repiten en más de un aislado (grupos comunes), pero, además, hay una gran variabilidad respecto a los plásmidos presentes en cada cepa. Se obtuvieron once grupos comunes (C1-C11) y 16 únicos (S1-S16) (Tabla 4). El grupo C1, con cepas mayoritariamente clínicas que mostraron dos pequeños plásmidos, y C2 correspondería a cepas en donde no se detectaron plásmidos. En C3, las cepas tenían tres plásmidos, un plásmido adicional de 1,4

kb respecto al grupo C1 compuesto por cepas de años anteriores. Similar observación al comparar C3 y C5 donde el plásmido adicional es de 1 kb. En general, el número de plásmidos aumentó a medida que el año de recolección era más reciente, de cero a 2 plásmidos por cepa entre 2006-2007 y de 2-5 plásmidos entre el 2010-2011 (Tabla 4). La cepa SH35, con susceptibilidad intermedia a tetraciclina y a ciprofloxacino, mostró 7 plásmidos entre 0,8 y 4 kb (Tabla 4, S16). Este estudio evidenció que plásmidos de menos de 2 kb son frecuentes en *S. Heidelberg* y solo ocho cepas mostraron un plásmido de 30 kb que estaría como único plásmido o junto a otros pequeños plásmidos.

Presencia de genes de virulencia

Todas las cepas *S. Heidelberg* fueron positivas para los genes *invA*, *sifA*, *stkD*, *agfA* y *lpfA*, mientras que *pefA* no fue detectado en ningún aislamiento.

Tabla 4. Agrupamiento de cepas de *S. Heidelberg* según presencia de plásmidos. Para cada grupo se indica el tamaño de los plásmidos presentes o ausencia de ellos, el número de cepas que muestran la característica, el año y su origen (n = 61)

Grupo	Tamaño plásmidos (kb)	n de cepas	Año y origen de las cepas
C1	0,8 y 1,3	9	2006 (1 clin.), 2007 (3 clin.), 2008 (2 amb. y 1 clin.), 2009 (1 clin.), 2010 (1 clin.)
C2	Sin plásmidos	7	2006-2008 (2 ambientales y 5 clínicas)
C3	0,8, 1,3 y 1,4,	6	2010 (4 amb. y 1 clin.), 2011 (1 clin.)
C4	1,7	5	Todas ambientales: 2006 (1), 2007 (2), 2009 (1), 2010 (1).
C5	0,8, 1, 1,3 y 1,4	4	2010 (1 ambiental) y 2011 (2 clin. y 1 amb.)
C6	1,7 y ≈30	4	Todas ambientales 2007 (1), 2009 (3)
C7	0,8, 1,3 y 2,3	2	2008 y 2009 origen clínico
C8	0,8, 1 y 1,3	2	2010 clínica
C9	0,8	2	2007 y 2009 clínicas
C10	0,8, 1,3 y 2	2	2009 clínica
C11	0,8, 1,3, 1,4, 1,7 y 2	2	2010 (ambiental) y 2011 (clínica)
S1	0,8 y 1,4	1	2010 clínica
S2	0,8, 1,3, 1,7 y 2	1	2010 ambiental
S3	0,8, 1,0, 1,3 y 2	1	2008 ambiental
S4	1,3, 1,4 y 2,0	1	2010 clínica
S5	0,8, 0,9, 1,3, 1,4 y 1,7	1	2010 ambiental
S6	≈30	1	2006 clínica
S7	1,4 y ≈30	1	2006 ambiental
S8	4 y 1,4	1	2010 ambiental
S9	2,3 y 3,3	1	2008 clínica
S10	1,3 y 2,2	1	2006 ambiental
S11	1,3, 1,7, 2,5 y 30	1	2011 clínica
S12	1,2, 1,7, 3,3, y 30	1	2011 ambiental
S13	0,8, 1 y 2	1	2011 clínica
S14	1 y 2	1	2011 ambiental
S15	0,8 y 1,7	1	2011 clínica
S16	0,8, 1, 1,3, 1,4, 1,7, 2,5 y 4	1	2010 ambiental

C = grupo común con más de una cepa que comparten una característica; S = single o único que indica que solo una cepa tuvo la característica; kb = unidad de tamaño de los plásmidos en kilo pares de bases; clin. = clínica y amb. = ambiental, refiriéndose a cepas de procedencia no humano cuyo origen se especificó en la Tabla 1.

Discusión

Es importante estudiar las bacterias patógenas a nivel local para monitorear la aparición de clones virulentos y caracterizar las cepas circulantes³⁰, además, es conocido que la susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* varía según su serovar, lugar geográfico, año de colección y

origen⁴. En *S. Heidelberg* se ha reportado alta resistencia antimicrobiana en aislados de carnes de pavo, pollo y cerdo en Estados Unidos de Norteamérica, 66% de los aislados fue resistente a un antimicrobiano y 16% resistente hasta a cinco antimicrobianos, y en Turquía, 41% fue resistente a uno o más antimicrobianos^{4,31}. Comparado con nuestro estudio en cepas ambientales (75% de

procedencia animal), la resistencia a uno o más antimicrobianos fue baja (20,7%) e inclusive menor que la reportada en países vecinos como Argentina (27%) y Brasil (29%)^{6,32}. Sin embargo, cepas clínicas mostraron un porcentaje superior (37,5%), atribuible principalmente a la resistencia a tetraciclina. En las cepas chilenas de *S. Heidelberg*, la baja susceptibilidad a tetraciclina se debió a la resistencia y susceptibilidad intermedia, lo que concuerda con otros estudios en *S. enterica* de diferentes orígenes aisladas en Chile (33, Prat S, et al., 2011, X Jornadas Científicas, ISP Chile). Estudios en Argentina de aislamientos animales de *S. enterica* y *S. Heidelberg* de origen animal y clínico mostraron resultados similares para tetraciclina^{4,32,34}.

Más de la mitad de las cepas de *S. Heidelberg* del presente estudio mostraron susceptibilidad disminuida o intermedia a ciprofloxacino, lo que se ha descrito previamente en *S. enterica*³⁵. El fenotipo resistente a ciprofloxacino se atribuye a mutaciones en el gen *gyrA* en los codones 83 u 87, sumado a la sobreexpresión de los genes *marA* y *soxS*, reguladores de bombas de eflujo^{35,36}. Los resultados sugieren que las cepas chilenas aún no presentan estas características, sin embargo, el uso indiscriminado de estos antimicrobianos podría favorecer la aparición de resistencia a las fluoroquinolonas.

La resistencia bacteriana se atribuye al uso y abuso de los antimicrobianos en humanos y animales en forma terapéutica, subterapéutica, profilaxis y como promotor del crecimiento^{37,38}. Estudios de brote por *S. Heidelberg* atribuidos al consumo de carnes de aves de corral en Estados Unidos de Norteamérica, muestran multirresistencia, con un patrón de resistencia a gentamicina, ampicilina, tetraciclina y estreptomycin² y otro patrón con combinaciones de resistencia a gentamicina, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, kanamicina, estreptomycin y sulfametoxazol-trimetropin en 35% de los aislamientos clínicos³⁹. En *S. Heidelberg* de origen chileno, solo una cepa de deposiciones (SH06) mostró multirresistencia a ampicilina, ceftriaxona, amoxicilina-ácido clavulánico, ceftiofur y tetraciclina, además, todas las cepas estudiadas por nosotros fueron susceptibles a gentamicina y a sulfametoxazol-trimetropin y no resistentes a cloranfenicol.

En *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Thyphimurium y en los serovares Heidelberg y

Newport la resistencia a ceftiofur se relaciona con la resistencia a ceftriaxona, que puede deberse a una β -lactamasa del tipo AmpC plasmidial que presenta el gen *bla*_{CMY-2} y que se puede transferir por conjugación^{13,38}. En nuestro estudio, cepas resistentes a ceftriaxona y a ceftiofur fueron BLEE positivas, pero solo la cepa SH06 (2006) fue positiva para AmpC y *bla*_{CMY-2}. *S. Heidelberg* con estas características se han reportado en distintas partes del mundo^{4,11,14,33,40}. En nuestro estudio, el análisis por EGCP de las cepas BLEE positivas mostró que existe entre ellas una estrecha relación clonal, es decir, provienen de un mismo clon de *S. Heidelberg* y, además, este clon está circulando en el ambiente (cepa SH05), causando infecciones intestinales (cepa SH06) e infecciones invasivas (cepa SH52), al menos el período de este estudio. Aunque cabe mencionar que a través del análisis de plásmidos y el antibiograma fue posible establecer diferencias entre estas cepas.

Los resultados obtenidos por nosotros coinciden con reportes de plásmidos en *S. Heidelberg* de tamaños menores a 2 y hasta 7 kb y de 34 kb^{31,34,40}. También, un plásmido de 3,3 kb en *S. Heidelberg* de origen clínico (2008) y otro ambiental (2011) concuerdan con el tamaño de un plásmido que codificaría para funciones de movilidad plasmidica en *S. Heidelberg*^{2,30,40}. En nuestro estudio, ocho aislados mostraron plásmidos de 30 kb y uno de estos fue positivo para AmpC y el gen *bla*_{CMY-2}, coincidente con plásmidos de tamaño similar descritos en *S. Heidelberg*^{37,40}. Aunque debemos considerar que los plásmidos, a pesar de coincidir en tamaño, no significa que sean idénticos. También en *S. Heidelberg* se han descrito plásmidos de 40 y hasta 150 kb^{31,34,40}, incluyendo algunos que codifican para β -lactamasas tipo AmpC³⁷, sin embargo, en nuestro estudio no descartamos la presencia de plásmidos de tamaños mayores en *S. Heidelberg*, debido a las limitantes de las técnicas utilizadas. Todo esto concuerda con antecedentes que indicarían que *S. Heidelberg* contiene un genoma variable, de diferentes tamaños, por la presencia de fagos y plásmidos^{2,12,30}.

Un estudio de cepas de *S. Heidelberg* aisladas entre 1985 y 2011 en Estados Unidos de Norteamérica mostró que los genes de factores de virulencia en este serovar estaban altamente conservados², coincidiendo con nuestros resultados, donde los genes de fimbrias (*agfA*, *lpfA*, *stkD*), el gen de invasión celular (*invA*) y *sifA*, gen que codifica

para un factor de multiplicación bacteriana en macrófago, se detectaron en todos los aislados. Contrariamente, cepas de *S. Heidelberg* en Brasil mostraron variabilidad en la presencia de *agfA*⁶ y otro estudio en Reino Unido mostró variación en *stkD*¹⁵. Además, corroboramos que el gen fimbrial *pefA* descrito en algunos serovares de *Salmonella*⁴¹ no está en *S. Heidelberg*, coincidiendo con otro estudio anterior².

El antibiograma y las características genéticas de *S. Heidelberg* aisladas en Chile entre 2006 y 2011, mostró que este serovar presenta alta susceptibilidad a antimicrobianos usados de primera línea en el tratamiento de salmonelosis, con excepción de tetraciclina y ciprofloxacino, donde encontramos resistencia y susceptibilidad disminuida. Además, este estudio nos alerta sobre la circulación de clones que presentan β -lactamasas tipo BLEE y AmpC plasmídicas en nuestro país, lo que puede generar falla de tratamiento en pacientes con infecciones por este serovar y, también, da cuenta de la posibilidad que tienen estas cepas de diseminar la resistencia a cefalosporinas de tercera generación a otras enterobacterias. *S. Heidelberg* aisladas en Chile tendrían características similares a cepas de otras partes del mundo, codificando para genes de virulencia y con plásmidos de tamaño y número variable. En base a este estudio, proponemos que la presencia de plásmidos en *S. Heidelberg* podría utilizarse junto a otras herramientas de subtipificación bacteriana. Por otra parte, las características estudiadas no explicarían el aumento de casos ocurridos en Chile por *S. Heidelberg* el año 2011 respecto a años anteriores.

Agradecimientos: Al Instituto de Salud Pública de Chile por la donación de las cepas de *S. Heidelberg* utilizadas en este estudio. Ana Zepeda Ortega, Tecnólogo Médico y PhD. Escuela de Tecnología Médica Universidad de Valparaíso por su colaboración en el análisis estadístico.

Referencias

1. Andrysiak AK, Olson AB, Tracz D, Dore K, Irwin R, Ng LK, et al. Genetic characterization of clinical and agrifood isolates of multi drug resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Canada. *BMC Microbiol* 2008; 8: 89.
2. Hoffmann M, Zhao S, Pettengill J, Luo Y, Monday SR, Abbott J, et al. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. *Genome Biol Evol* 2014; 6 (5): 1046-68.
3. Green A, Defibaugh-Chavez S, Douris A, Vetter D, Atkinson R, Kissler B, et al. Intensified Sampling in Response to a *Salmonella Heidelberg* outbreak associated with multiple establishments within a single Poultry corporation. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 15 (3): 153-60.
4. Zhao S, White DG, Friedman SL, Glenn A, Blickenstaff K, Ayers SL, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74 (21): 6656-62.
5. Otto S J, Carson CA, Finley RL, Thomas MK, Reid-Smith RJ, McEwen SA. Estimating the number of human cases of ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in Quebec and Ontario, Canada. *Clin Infect Dis* 2014; 59 (9): 1281-90.
6. Borsoi A, Santin E, Santos LR, Salle CT, Moraes HL, Nascimento VP. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella Heidelberg* strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poult Sci* 2009; 88 (4): 750-8.
7. Chittick P, Sulka A, Tauxe V, Fry AM. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella Heidelberg* infections in the United States: clues for disease prevention. *J Food Prot* 2006; 69 (5): 1150-3.
8. Folster JP, Pecic G, Rickert R, Taylor J, Zhao S, Fedorka-Cray PJ, et al. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar heidelberg from a ground turkey-associated outbreak in the United States in 2011. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56 (6): 3465-6.
9. Folster JP, Pecic G, Singh A, Duval B, Rickert R, Ayers S, et al. Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from food animals, retail meat, and humans in the United States 2009. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9 (7): 638-45.
10. Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Doublet B, Kobisch M, Cloeckaert A, et al. Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the *floR* and *blaCMY-2* genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. *J Med Microbiol* 2010; 59: 467-71.
11. Aarestrup FM, Hasman H, Olsen I, Sorensen G. International spread of *bla*(CMY-2)-mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella enterica* serovar

- Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (5): 1916-7.
12. Zhang Y, LeJeune JT. Transduction of bla(CMY-2), tet(A), and tet(B) from *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Heidelberg to *S. Typhimurium*. *Vet Microbiol* 2008; 129 (3-4): 418-25.
 13. Lindsey RL, Fedorka-Cray PJ, Frye JG, Meinersmann R J. Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Appl Environ Microbiol* 2009; N75 (7): 1908-15.
 14. Cejas D, Vignoli R, Quinteros M, Marino R, Callejo R, Betancor L, et al. First detection of CMY-2 plasmid mediated beta-lactamase in *Salmonella* Heidelberg in South America. *Rev Argent Microbiol* 2014; 46 (1): 30-3.
 15. Bronowski C, Winstanley C. Identification and distribution of accessory genome DNA sequences from an invasive African isolate of *Salmonella* Heidelberg. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 298 (1): 29-36.
 16. Fica A, Acosta G, Dabanch J, Perret C, Torres M, López J, et al. [Salmonellosis outbreaks and the size and role of the Chilean State]. *Rev Chilena Infectol* 2012; 29: 207-14.
 17. Silva J, Aravena C, Araya J, Colque-Navarro P, Kühne I, Mollby R. [Biochemical phenotypes and phage types of *Salmonella enteritidis* strains isolated in Antofagasta during the period 1997-2000]. *Rev Med Chile* 2003; 131: 837-45.
 18. Grimont P, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 7th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris. France. 2007; p. 166.
 19. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45 (4): 493-6.
 20. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Information Supplement M10-S23*; Twenty-third edition. 2013. Wayne PA, USA.
 21. Takahashi S, Nagano Y. Rapid Procedure for Isolation of Plasmid DNA and Application to Epidemiological Analysis. *J Clin Microbiol* 1984; 4: 608-13.
 22. Fadl AA, Nguyen AV, Khan MI. Analysis of *Salmonella enteritidis* Isolates by Arbitrarily Primed PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (4): 987-9.
 23. Collinson SK, Emody L, Trust TJ, Kay WW. Thin Aggregative fimbriae from diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1992; 174 (13): 4490-5.
 24. Zhao S, White DG, McDermott JL, Friedman SL, English L, Ayers S, et al. Identification and Expression of Cephamycinase blaCMY genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Food Animals and Ground Meat. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (12): 3647-50.
 25. Bäumlér AJ, Heffron F. Identification and sequence analyses of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 1995; 177 (8): 2087-97.
 26. Haneda T, Okada N, Nagazawa N, Kawakami T, Danbara H. Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Infect Immun* 2001; 69 (4): 2612-20.
 27. Skyberg JA, Logue CM, Nolan LK. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Dis* 2006; 50 (1): 77-81.
 28. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-7.
 29. Phornphisutthimas S, Thamchaipenet A, Panijpan B. Conjugation in *Escherichia coli*. *Biochem Mol Biol Educ* 2007; 35 (6): 440-5.
 30. Fricke WF, Mammel MK, Dermott PF, Tartera C, White DG, Leclerc JE, et al. Comparative genomics of 28 *Salmonella enterica* isolates: evidence for CRISPR-mediated adaptive sublineage evolution. *J Bacteriol* 2011; 193 (14): 3556-68.
 31. Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, David DE, McDermott PF, Logue CM, et al. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74 (16): 5038-46.
 32. Ibar MP, Vigo G, Piñeyro P, Caffer MI, Quiroga P, Perfumo C, et al. Serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie enterica en porcinos de faena y su resistencia a los antimicrobianos. *Rev Argen Microbiol* 2009; 41 (3): 156-62.
 33. Junod T, López-Martin J, Gädicke P. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario. *Rev Med Chile* 2013; 141 (3): 298-4.
 34. Han J, David DE, Deck J, Lynne AM, Kaldhone P, Nayak, et al. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from human patients with those from animal and food sources. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (3): 1130-3.
 35. Kim SY, Lee SK, Park MS, Na HT. Analysis of the Fluoroquinolone Antibiotic Resistance Mechanism of *Salmonella enterica* Isolates. *J Microbiol Biotechnol* 2016; 26 (9): 1605-12.
 36. El-Tayeb MA, Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, Almaary KS, Elbadawi YB. Prevalence, serotyping and anti-

- crobiales resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. *Braz J Microbiol* 2017; 48: 499-508.
37. Dorr PM, Tadesse DA, Zewde BP, Fry P, Thakur S, Gebreyes WA. Longitudinal Study of Salmonella Dispersion and the Role of Environmental Contamination in Commercial Swine Production Systems. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75 (6): 1478-86.
 38. Keelara S, Thakur S. Dissemination of plasmid-encoded AmpC beta-lactamases in antimicrobial resistant Salmonella serotypes originating from humans, pigs and the swine environment. *Vet Microbiol* 2014; 173 (1-2): 76-83.
 39. Gieraltowski L, Higa J, Peralta V, Green A, Schwensohn C, et al. National Outbreak of Multidrug Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Company. *PLoS One* 2016; 11 (9): e0162369.
 40. Han J, Lynne AM, David DE, Tang H, Xu J, Nayak R, et al. DNA sequence analysis of plasmids from multidrug resistant *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates. *PLoS One* 2012; 7 (12): e51160.
 41. van Asten AJ, van Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44 (3): 251-9.