



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN
BIOTECNOLOGIA
POSGRADO INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Aislamiento y caracterización de cepas de *Salmonella enterica* subsp.
enterica de productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A:
BIOL. IVAN DAVID REGALADO PINEDA

Tutor: D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo

Agosto 2011



EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE CONSERVACIÓN Y BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA DEL CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UMSNH EN COLABORACIÓN CON EL LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA DE MICHOACÁN, BAJO LA DIRECCIÓN DEL D. EN C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO Y SE CONTÓ CON EL APOYO DEL FONDO SECTORIAL EN SALUD-2009 AL PROYECTO “MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE AISLADOS DE *SALMONELLA* ENTERICA OBTENIDOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS Y LÁCTEOS”, CLAVE SALUD-2009-01-115172. LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO FUE TAMBIÉN POSIBLE GRACIAS A LA BECA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO OTORGADA POR CONACYT CON NÚMERO DE EXPEDIENTE 226670.

INDICE

	Página
Indice de figuras	4
Indice de tablas	5
Abreviaturas empleadas	6
RESUMEN	7
I. INTRODUCCION	8
II. ANTECEDENTES	10
2.1 Clasificación del género <i>Salmonella</i>	10
2.2 Salmonelosis	11
2.2.1 Proceso de infección, cuadro clínico y tratamiento	11
2.2.2 Salmonelosis e incidencia de <i>Salmonella</i> en Europa	12
2.2.3 Salmonelosis e incidencia de <i>Salmonella</i> en USA	13
2.2.4 Salmonelosis e incidencia de <i>Salmonella</i> en América Latina	14
2.2.5 Salmonelosis e incidencia de <i>Salmonella</i> en México	14
2.3 Marcadores genético - moleculares en el estudio de <i>S. enterica</i>	17
2.3.1 Técnicas independientes de PCR	17
2.3.2 Técnicas basadas en PCR	18
2.3.3 Estudios genético – moleculares de <i>Salmonella</i> en México	22
III. JUSTIFICACION	24
IV. HIPOTESIS	25
V. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25
VI. ESTRATEGIA	26
VII. MATERIAL Y METODOS	27
7.1 Origen de las muestras	27
7.2 Muestreo	29
7.3 Manejo de muestras	29
7.4 Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.	29
7.4.1 Caracterización bioquímica de <i>Salmonella</i> spp	30
7.5 Serotipificación de <i>Salmonella enterica</i>	34
7.6 Ensayo RAPD	35
7.6.1 Extracción de ADN	35
7.6.2 PCR	36
7.6.3 Análisis de agrupamiento	37
7.7 Análisis de coordenadas principales	38
VIII. RESULTADOS	39
8.1 Obtención de las cepas e incidencia de <i>S. enterica</i>	39
8.2 Serotipos identificados	42
8.3 Análisis RAPD	42
8.4 Análisis de agrupamiento	44
8.5 Análisis de coordenadas principales	48

IX. DISCUSION	50
X. CONCLUSIONES	56
XI. BIBLIOGRAFIA	58
XII. ANEXOS	67
12.1 Tabla matriz binaria del oligo 1254	67
12.2 Tabla matriz binaria del oligo 1290	68
12.3 Tabla matriz binaria del oligo 1252	69

Índice de figuras

	Página
Figura 1.....	27
Mapa del estado de Michoacán que muestra la división en 8 jurisdicciones sanitarias empleada por el LESP-SSEM.	
Figura 2.....	33
Resultados típicos de las pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Salmonella</i> .	
Figura 3.....	40
Número de aislados de <i>Salmonellaenterica</i> obtenidos en los distintos tipos de alimentos muestreados en el estado de Michoacán, en los años 2008 y 2009	
Figura 4.....	41
Porcentajes de incidencia de <i>Salmonella enterica</i> del total de alimentos analizados en cada una de las 8 jurisdicciones sanitarias en que se divide el estado de Michoacán (A) y particularmente con alimentos cárnicos crudos (B), chorizos (C) y quesos (D).	
Figura 5.....	44
Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra patrones representativos de amplificación RAPD de las cepas de <i>S. enterica</i> aisladas	
Figura 6.....	46
Dendograma generado a partir de los ensayos de amplificación RAPD de las cepas de <i>S. enterica</i> aisladas.	
Figura 7.....	48
Dendograma generado para cada uno de los serotipos mayoritarios de <i>S. enterica</i> encontrados. Paneles (A)Typhimurium,(B) Anatum,(C) Agona.	
Figura 8.....	49
Análisis de coordenadas principales de los genotipos determinados respecto a la jurisdicción sanitaria de su aislamiento.	

Indice de tablas

	Página
Tabla 1..... Jurisdicciones sanitarias y municipios que abarcan en el estado de Michoacán.	28
Tabla 2..... Medios de agar selectivos para el aislamiento de <i>Salmonella</i> .	30
Tabla 3..... Pruebas bioquímicas características de <i>Salmonella</i> empleadas en este trabajo.	31
Tabla 4..... Oligonucleótidos utilizados para el análisis RAPD	36
Tabla 5..... Muestras de alimentos analizados por producto y por jurisdicción sanitaria del estado de Michoacán para el aislamiento de <i>Salmonella enterica</i> en el periodo 2008-2009.	39
Tabla 6..... Serotipos de <i>S. enterica</i> identificados en muestras de alimentos crudos, cocidos y procesados en el estado de Michoacán durante el periodo 2008 - 2009.	43

Abreviaturas empleadas

LESP: Laboratorio Estatal de Salud Pública
SSEM: Secretaría de Salud del Estado de Michoacán
RAPD: Amplificación al azar de patrones polimórficos de ADN
ADN: Acido Desoxiribonucleico
PFGE: Electroforesis en gel de campos pulsados
ERIC: Secuencias consenso intergénicas de enterobacterias
PB: Pares de bases
M: Marcador de tamaño molecular
FSIS: Food Safety and Inspection Service
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
FDA: Food and Drug Administration
GFN: Global Foodborne Infections Network
EFSA: Autoridad de Seguridad Alimentaria en Europa
InDRE: Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica
CL: Caldo lactosado
CTT: Caldo tetratoato
CRP: Caldo Rapapport
XLD: Agar xilosa lisina desoxicolato
SB: Sulfito de bismuto
H: Agar hektoen
SS: Agar *Salmonella – Shigella*
TSA: Soya Trypticaseína
TSI: Agar hierro triple azúcar
LIA: Agar hierro lisina
MIO: Semiagar para evaluar movilidad, indol y ornitina
SDS: Dodecilsulfato de sodio
°C: Grado Celcius
µl: Microlitro
ml: Mililitro
g: Gramos
v/v: Relación volumen / volumen
%: Porcentaje

PCoA: Análisis de coordenadas principales

RESUMEN

Salmonella enterica subsp.*enterica* es uno de los principales patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. La identificación y la diferenciación de cepas de *S. enterica* es un paso fundamental en investigaciones epidemiológicas para el establecimiento de estrategias de prevención y control. El objetivo del presente trabajo fue obtener cepas de *S. enterica* en alimentos del estado de Michoacán y realizar una caracterización bioquímica, serológica y genético-molecular de éstos. Se analizaron 8,414 muestras de alimentos en el Estado de Michoacán para el aislamiento de *S. enterica* mediante la norma oficial mexicana la NOM-114-SSA1-1994 durante el periodo 2008-2009. A los aislados obtenidos se les determinó el serotipo por el esquema Kauffman-White. Se realizó un ensayo RAPD con tres oligonucleótidos y con los patrones de amplificación obtenidos se determinaron las distancias genéticas entre los aislados de estudio mediante el cálculo de las distancias euclidianas, a partir de las cuales se generó un dendograma empleando el criterio de Ward. Se obtuvieron 120 aislados de *Salmonella enterica*, la mayoría de los cuales (53 %) provenían de la región centro del estado de Michoacán, correspondiente a la jurisdicción sanitaria 1. El 46% de los aislados se obtuvieron de carnes crudas, 34% de chorizos, 14% de quesos y el resto de otros productos, reflejando incidencias en dichas muestras de 13 %, 10.5 % y 2.2 %, respectivamente. Los serotipos más abundantes fueron Typhimurium (13%), Anatum (12%), serogrupo B (11%) y Agona (9%) encontrándose en menor proporción otros 30 serotipos. El dendograma generado mostró cuatro grupos principales a un 85% de similitud genética y 27 genotipos a un 95% de similitud. El dendograma generado no mostró agrupamiento de los aislados por tipo de muestra, por localidad de origen o por serotipo. Cuando se realizaron patrones de agrupamiento para los tres serotipos más frecuentes se encontró que algunos genotipos se encuentran restringidos geográficamente dentro del estado mientras que otros presentan una distribución amplia. Los resultados obtenidos muestran una alta diversidad fenotípica y genotípica de *S. enterica* en las muestras aisladas, aunque los valores de incidencia en las muestras analizadas fueron relativamente bajos para el periodo de estudio.

I. INTRODUCCIÓN

Distintos serotipos de la bacterias *Salmonella enterica* subsp. *enterica* son patógenos zoonóticos de distribución mundial, causantes de diversas enfermedades como diarrea, gastritis, fiebre tifoidea, bacteremias y septicemias, entre otras (FDA, 2009). El ciclo de contaminación por *Salmonella* tiene orígenes múltiples a partir de materia fecal. Las heces de animales son capaces de contaminar el alimento de otros animales así como el agua con la que se riegan distintos cultivos (Toledo, 2008). También existe contaminación en los mataderos, en donde a causa de las heces se contamina la carne que consumimos (Creus et al., 2007). Las personas portadoras de este patógeno y que no tienen buenas prácticas de higiene pueden contaminar alimentos, así como el material para la elaboración de los mismos (Arbuzoba, 1960; Weissfeld et al., 1994).

Salmonella tiene un impacto importante tanto en la economía como en el sector salud. En países en desarrollo, provoca aproximadamente 22 millones de casos de fiebre tifoidea anualmente, con 220 000 muertes (Crump et al., 2004; Parry, 2004). La mayoría de los pacientes que se recuperan de la infección son capaces de eliminar la bacteria completamente de sus cuerpos. Sin embargo, algunos de estos permanecen como portadores sanos, pudiendo contagiar a otras personas, debido a que continuamente están eliminando *S. enterica* en sus heces (Tauxe et al., 1988).

Debido a la amplia distribución de éste patógeno y a su capacidad para infectar es necesario contar con estrategias de vigilancia sanitaria para evitar brotes e implementar acciones para disminuir la incidencia de éste patógeno. En este sentido, las herramientas moleculares como los RAPD's han sido muy útiles para la tipificación genética de cepas de *Salmonella* (Lim et al., 2005; Shabarinath et al., 2007).

Los estudios genéticos como el realizado en el presente trabajo permiten determinar las relaciones que existen entre distintas cepas, brindando información valiosa sobre su posible origen en caso de brotes. Los estudios de genotipificación en aislados de *S. enterica* a partir de muestras de alimentos permiten establecer relaciones

con aislados clínicos provenientes de pacientes con procesos de infección y manifestaciones clínicas de enfermedades ocasionadas por éste patógeno. Dichas relaciones son muy útiles en salud pública, ya que posibilitan el diseño de estrategias de prevención de enfermedades infecto-contagiosas, mediante la detección rápida y específica de posibles fuentes de contaminación.

II.- ANTECEDENTES

2.1 Clasificación taxonómica

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, y comparte características generales de las enterobacterias. Las especies pertenecientes a este género son bacilos Gram negativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos y anaerobios facultativos. En relación a las características bioquímicas, estas bacterias son capaces de fermentar glucosa, son catalasa positivos y oxidasa negativos (Popoff et al., 2004).

Estudios de hibridación de ADN han demostrado que el género *Salmonella* está constituido por dos especies: *Salmonella enterica* y *S. bongori*. A su vez, la especie *S. enterica* está compuesta por seis subespecies que son: *S. enterica* (I), *S. arizonae* (IIIa), *S. diarizonae* (IIIb), *S. houtenae* (IV), *S. salamae* (II) y *S. indica* (VI). La especie *S. bongori* sólo posee la subespecie V (Garrity et al., 2004).

Las especies de *Salmonella* se dividen en serotipos, identificados con base en sus características antigénicas de acuerdo al esquema de Kauffmann-White. Dicho esquema se basa en la reactividad de antisueros a antígenos de superficie O, H y en algunos casos Vi. El antígeno somático O detecta diferencias de carbohidratos en la capa de lipopolisacáridos (LPS), el antígeno H detecta proteínas en flagelo y el antígeno capsular Vi tiene que ver con la detección de proteínas específicas de virulencia. La combinación de estos antígenos ha llevado a la identificación de más de 30 serogrupos y 2523 serotipos o serovares de *Salmonella* (Popoff et al., 2004); la mayoría de estos dentro de la subespecie *enterica*. Es también en esta subespecie en la que se encuentran el mayor número de serotipos patógenos para el hombre (Brenner et al., 2000).

2.2 Salmonelosis

2.2.1 Proceso de infección, cuadro clínico y tratamiento

La salmonelosis es una enfermedad infectocontagiosa que se caracteriza por presentar síndromes febriles asociados a manifestaciones gastrointestinales o sistémicas. La infección se localiza principalmente en la membrana interna del íleo terminal o en el intestino grueso. Solo los serotipos Typhi y Paratyphi invaden la circulación sanguínea, mientras que las otras se limitan generalmente a la mucosa intestinal (Bhutta, 2008). El cuadro más común es la diarrea, en la que la respuesta inflamatoria debido a la internalización de *Salmonella* produce la liberación de prostaglandinas que a su vez estimula la producción de AMP cíclico y como consecuencia secreción activa de líquidos. La bacteria se ingiere por alimentos o agua contaminados y tiene que pasar la barrera gástrica para provocar enfermedad. El agente que consigue sobrevivir las primeras 24 a 72 h penetra el intestino ocasionando alteraciones histopatológicas (Bhutta, 2008). En el caso de la fiebre tifoidea, los bacilos buscan un hábitat intracelular, lo que corresponde a la fase mesentérica en la cual las bacterias penetran los ganglios para multiplicarse y posteriormente pasar a circulación sanguínea y a las placas de Peyer, órganos linfoides del intestino. Muchas de las manifestaciones de la fiebre tifoidea son causadas por el ácido araquidónico, los radicales libres y otros metabolitos secundarios secretados por la bacteria (Bhutta, 2008).

Dentro de las manifestaciones clínicas comunes de las infecciones asociadas a *Salmonella* está la fiebre acompañada de dolor abdominal, evacuaciones intestinales frecuentes, líquidas, de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre. Estos cuadros clínicos son más severos en los niños y en las personas de edad avanzada. En niños desnutridos puede observarse la diseminación hematógena dando lugar a bacteremias con compromiso de otros órganos tales como las meninges, el oído, los pulmones, los riñones y el hueso (Kaye y Kaye, 2007).

Las complicaciones pueden presentarse en cualquier órgano, sin embargo las más severas y más temidas son la hemorragia digestiva y la perforación intestinal.

Otras complicaciones de las salmonelosis son los aneurismas micóticos, los cuales han sido descritos a nivel de la aorta abdominal, las arterias poplítea, ilíaca y carótida (Kaye y Kaye, 2007). Esta condición requiere un diagnóstico temprano y de tratamiento médico y quirúrgico debido al riesgo de hemorragias cataclísmicas. El diagnóstico puede ser a través de un hemocultivo, urocultivo, coprocultivo, cultivo de bilis duodenal y mielocultivo. Para el tratamiento de la salmonelosis se emplean distintos antibióticos, o combinación de ellos, entre los que se encuentran la ampicilina, la amoxicilina, el sulfametoxazol - trimetoprim, las cefalosporinas de tercera generación, como la cefotaxina, la cefoperazona, la ceftriaxona; y las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina y la ofloxacina (Kaye y Kaye, 2007).

2.2.2 Salmonelosis e incidencia de *Salmonella* en Europa

Debido a que en México no existen estadísticas basadas en muestreos específicos para conocer la importancia en salud pública de la salmonelosis, es necesario recurrir a datos de países desarrollados que nos permitan generar una idea sobre la relación de *S. enterica* con procesos infecciosos y la incidencia de ésta en la contaminación de alimentos.

Según datos de la Autoridad de Seguridad Alimentaria en Europa (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf>), en el 2008 la Salmonelosis fue la segunda enfermedad zoonótica más frecuente en humanos, causando aproximadamente 131 468 casos confirmados. Los casos más frecuentes por salmonelosis se han detectado en niños entre 0 y 4 años. La causa principal de esta enfermedad es por infección alimentaria, siendo *Salmonella*, después de *Campylobacter*, el patógeno con mayor frecuencia relacionado con enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Los alimentos con mayor incidencia por este patógeno son los huevos, con un 23.1 % en huevos crudos y alimentos preparados con huevo, seguido de carnes crudas de pollo, pavo, cerdo y res con una incidencia de 5.1 %, 5.6 %, 0.7 % y 0.2 %, respectivamente. En el caso de los quesos, para ese año la incidencia de *Salmonella* fue menor al 1 %. En frutas, vegetales y yerbas el dato correspondiente fue 0.7 %, mientras que en mariscos se detectó menos del 1 %. En

relación a la época del año, los meses con mayor incidencia de salmonelosis fueron de Junio a Octubre.

De los países de la Unión Europea, España reporta los mayores porcentajes de incidencia por *S. enterica* en alimentos, con valores en carne de cerdo del 12.7 %, en carne de res de 5% y en quesos de 3.1 %. Los serotipos más frecuentemente relacionados con estas intoxicaciones son Typhimurium y Enteritidis, presentes en el 79.9% de los casos. Estos datos son el resultado de distintas acciones preventivas que se han tomado a través de normas estrictas de sanitización que incluyen un seguimiento continuo de estudios microbiológicos en distintos puntos de la manufactura alimentaria, desde las granjas de animales hasta el punto de venta. Estas medidas se han estado tomando desde hace 6 años en los países parte de la Unión Europea (UE), mostrando como resultado una disminución considerable de casos por salmonelosis.

2.2.3 Salmonelosis e incidencia de *Salmonella* en Estados Unidos

En Estados Unidos *Salmonella enterica* es la principal bacteria causante de ETAs (FDA, 2009). Datos proporcionados por el Food Safety and Inspection Service (FSIS) muestran en un total de 29 116 productos cárnicos crudos analizados en el 2009 una incidencia de *Salmonella* en pollo del 7.2 % de 6 439 muestras, en carne de cerdo el 2.3 % de 4 747 muestras, en carne de res de 0.6 % de 2 036, en carne molida de res de 1.9 % de 8 541, en carne molida de pollo de 18.2 % de 374, en carne molida de pavo 10.7 % de 608 y en carne de pavo el 3.8 % de 1 432 muestras. Estos porcentajes documentan una disminución para todos los tipos de muestras respecto a los obtenidos en años anteriores. Los serotipos más frecuentes en alimentos de los Estados Unidos son Enteritidis, Typhimurium, Newport, Javiana, Agona, Heilderbeg, Montevideo, Saintpaul, Anatum, Muenchen, Braenderup y Derby, entre otros (FSIS, 2009b). Estimaciones de la FDA reportan que en los Estados Unidos los casos por salmonelosis van de 2 a 4 millones por año, de los cuales según datos del Centers for Disease Control and Prevention (CDC), el mayor número de casos se presenta en niños de 0 a 4 años. Actualmente se está combatiendo un brote por *Salmonella* en millones de huevos de gallina contaminados en distintas productoras de Iowa. No se ha podido

identificar la fuente de la contaminación, aunque se ha aislado *Salmonella* del alimento que se les da a las gallinas, así como de las heces acumuladas en el lugar donde se encuentran. No se ha podido afirmar que el alimento de gallina sea el causante de la contaminación de las mismas, debido a que no se ha encontrado evidencia para concluir que el alimento ya venía contaminado de fábrica o se contaminó dentro de las instalaciones de los distintos proveedores. La portavoz del CDC, Lola Rusell, declaró que entre el 1 de mayo y el 31 de julio del 2010 se enfermaron de salmonelosis unas 1,953 personas, según cifras preliminares

(<http://www.jornada.unam.mx/2010/08/22/index.php?section=economia&article=024n1eco>).

2.2.4 Salmonelosis e incidencia de *Salmonella* en América Latina

Según datos del programa Global Salm-Surv, ahora “ Global Foodborne Infections Network ” (GFN) de la World Health Organization (WHO)(<http://www.who.int/gfn/en/>), en el periodo 2000 a 2008 en los 10 países sudamericanos (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela) que reportan en PulsNet, se ha encontrado que los serotipos Typhimurium y Anatum son los de mayor incidencia en bovinos, cerdos y aves domésticas. Particularmente el serotipo Enteritidis fue aislado específicamente en aves, siendo el serotipo más abundante en éstas. Uno de los últimos brotes reportados en Latino América fue el del 23 de marzo del 2008, cuando la FDA alertó a los mercados y consumidores por la presencia de *Salmonella* en melones Hondureños, al detectar 50 casos de infección en 16 estados de Estados Unidos, y 9 en Canadá, de los cuales 14 casos requirieron hospitalización.

2.2.5 Salmonelosis e incidencia de *Salmonella* en México

En México no se cuenta con estadísticas nacionales recientes publicadas sobre infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. La falta de un sistema de vigilancia eficiente con

una comunicación entre epidemiólogos, médicos, microbiólogos, veterinarios y sectores de agricultura y pesca, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar las serovariedades de *Salmonella* en distintos puntos de riesgo para la salud de los seres humanos. Esta información es necesaria para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*, así como los costos que estas representan en distintos sectores socioeconómicos (Zaidi, 2006a).

Para conocer los serotipos mas frecuentes en México se realizó un estudio en el que se analizaron 24 394 cepas de *Salmonella* obtenidas tanto en muestras humanas y no humanas colectadas desde 1972 a 1999(Gutiérrez et al., 2000). Los resultados mostraron a 199 distintos serotipos provenientes tanto de humanos como de muestras ambientales y de distintos alimentos. En particular, en humanos se identificaron a los serotipos Typhimurium, Enteritidis y Typhi como los más frecuentes (Gutiérrez et al., 2000). Los primeros 2 serotipos también se obtuvieron como los mayoritarios en muestras no humanas. En las cepas de *S. enterica* aisladas tanto de humanos como de muestras no humanas se identificaron además a los serotipos Derby, Agona, Anatum, Newport, Heidelberg, Infantis, Hadar, Muenchen, Give, entre otros (Gutiérrez et al., 2000).

Según datos del Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA), en el periodo de 1993 al 2002 se registraron 2409 personas enfermas por salmonelosis en México a consecuencia de infección alimentaria, de las cuales hubo 2 muertes. En el 2005 se reportaron 139,742 casos de infecciones por *Salmonella* en los sistemas de Salud Pública, la cual debe de ser considerada como una cifra baja, ya que la mayor parte de los casos no son reportados debido a que no se realizan los estudios clínico-microbiológicos correspondientes y por tanto los datos estadísticos obtenidos poseen valores subestimados.

Algunos estudios realizados en México, muestran la incidencia de *S. enterica* en diversos alimentos. Figueroa y colaboradores (2005) realizaron un estudio en melón cantaloupe, en donde se detectó la presencia de éste patógeno y se rastreó la fuente de contaminación. Se aislaron cepas de *S. enterica* en el agua de riego y en heces de iguanas, siendo estos la fuente de contaminación del melón. Los serotipos identificados en esta contaminación fueron Poona, Infantis y Anatum.

En el mes de abril de 2008, se inició un brote de infección por *Salmonella Saintpaul* en los Estados Unidos, asociada con el consumo de tomate mexicano, las autoridades norteamericanas tiempo después señalaron públicamente que no era posible asegurar la participación del tomate en este brote (El Universal, 2008). El 21 de junio al 3 de julio, los técnicos de la FDA y funcionarios de la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), visitaron áreas de producción en México. Las muestras de agua, suelo y tomate, resultaron negativas a *Salmonella*, lo cual fue confirmado por la Secretaría de Salud y la FDA (El Universal, 2008).

Los estudios realizados en México muestran una alta incidencia de *Salmonella enterica* en carnes crudas y chorizo del estado de Guerrero (Bello et al., 1990; Bello y Abarca, 1991). En otros estudios más recientes, se observó una relación entre cepas de *S. enterica* aisladas de distintas muestras humanas y no humanas en distintos estados de la República Mexicana, en donde se pudo confirmar la gran dispersión de *S. enterica*, así como su importancia como agente zoonótico causante de enfermedades transmitidas por alimentos los alimentos (Zaidi et al., 2008; Wiesner et al., 2009).

Debido a la alta prevalencia de este patógeno en alimentos y a su capacidad para infectar y causar enfermedades, se requieren actividades para prevenir brotes e infecciones, por lo que los estudios epidemiológicos de *S. enterica* son de gran importancia para el control de la infección. En ese sentido, la identificación y la

diferenciación de cepas de dicha bacteria patógena es un paso fundamental en investigaciones epidemiológicas y las técnicas de genética molecular son herramientas útiles para tales fines.

2.3 Marcadores genético - moleculares en el estudio de *S. enterica*

Durante décadas, la diversidad de *S. enterica* se caracterizó basándose en los serotipos basados en el esquema de Kauffman-White, a los cuáles se añadieron posteriormente el análisis de isoenzimas y la tipificación de fagos. En las últimas dos décadas se han adicionado diversos métodos genético-moleculares. Entre las características deseables de un método de tipificación genético-molecular para su empleo en estudios epidemiológicos se encuentran la rapidez, la reproducibilidad, la facilidad de desarrollo, la especificidad y la sensibilidad (Buch y Nitschko, 1999). Todas las técnicas genético-moleculares presentan ventajas y desventajas para su empleo en estudios epidemiológicos y se pueden dividir, en principio, en dos grandes grupos, aquellas no dependientes de la amplificación mediante PCR y aquellas basadas en PCR.

2.3.1 Técnicas independientes de PCR

En el primer grupo se utilizó inicialmente la técnica de ribotipificación, en la cual se hacía uso de una sonda del gen de RNA ribosomal de la subunidad 16S para detectar diferencias en los patrones de hibridación Southern de distintos aislados cuyo ADN genómico había sido cortado con una enzima de restricción. La ribotipificación se basa en la localización y el número de secuencias del gen que codifica para el RNA ribosomal (rRNA) en todo el genoma bacteriano. Este método de tipificación es actualmente realizado mediante PCR, visualizando los productos de amplificación obtenidos del gen de la subunidad 16S ribosomal en geles de agarosa mediante electroforesis (Bouchet et al., 2008). Se han utilizado sistemas automatizados de ribotipificación para *Salmonella* spp. en los que se ha demostrado su alta reproducibilidad (Bailey et al., 2002).

Otra metodología similar consiste en el análisis de las secuencias de inserción (IS), en donde en vez de utilizar sondas que se unen a secuencias del gen rRNA, se une a secuencias de inserción en el genoma bacteriano. En particular se han utilizado las secuencias IS200 en distintos serotipos de *S. enterica*. Estas secuencias son de aproximadamente 700 pb y se encuentran distribuidas aleatoriamente a lo largo del genoma en distintas cepas. No todas las cepas de *Salmonella* presentan las secuencias del IS200, por lo que el poder discriminatorio de esta metodología para estas cepas es ineficiente (Millemann et al., 2000).

La otra técnica de tipificación no basada en PCR es la electroforesis en geles de campo pulsante (PFGE, por sus siglas en inglés), la cual es considerada como el “estándar de oro” para la diferenciación entre aislados de *Salmonella* (Fakhr et al., 2005; Bessa et al., 2007). En esta técnica se generan fragmentos de megabases mediante la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción de corte poco frecuente y los fragmentos generados son separados en geles de agarosa sometidos a un campo eléctrico en el que se cambia el ángulo de incidencia sobre la muestra (Ribot et al., 2006). Las enzimas comúnmente utilizadas en patógenos como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* son *Xba*I, *Bln*I o *Spe*I (Ribot et al., 2006). Se pueden obtener entre 10 y 20 bandas de alrededor de 20 a 800 kb (Lukinmaa et al., 2004; van Belkum et al., 2007). Este método es laborioso, el número de muestras a analizar por corrida es reducido y requiere alrededor de 4 días para su realización y análisis (Foley et al., 2007). El PFGE ha sido utilizado para tipificar cepas de *Salmonella* en alimentos y humanos (Aktas et al., 2007; Kam et al., 2007; Nayak et al., 2004) y ha mostrado tener un alto poder discriminatorio, así como una gran reproducibilidad (Foley et al., 2006; Nayak y Stewart-King, 2008).

2.3.2 Técnicas basadas en PCR

Existe una gran diversidad de técnicas de tipificación de *S. enterica* basadas en el ensayo de PCR, entre las que se pueden mencionar, la identificación de serotipos mediante ensayos de PCR con primers dirigidos a los genes de los antígenos O y H

(Hong et al., 2008), la amplificación de fragmentos de ADN polimórficos (AFLP) (Giammanco et al., 2007), el análisis de secuencias consenso repetitivas intergenicas de enterobacterias (ERIC) (Versalovic et al., 1991), la generación de huellas genéticas empleando el elemento móvil *IS200* (Threlfall et al., 1994; Bessa et al., 2007) y de particular interés para el presente trabajo, la amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD) (Millemann et al., 2000; Jin et al., 2006), de los cuales se presentará con mayor amplitud sus aplicaciones en el estudio de *S. enterica*. Los AFLP combinan las ventajas de las enzimas de restricción con el análisis por PCR. Utilizan varios sitios de restricción a lo largo del genoma para poder definir diversidad genética entre aislados (Mueller y Wolfenbarger, 1999). En comparación con el método PFGE, los AFLP han mostrado resultados similares para distinguir genotipos de *Salmonella* (Lindstedt et al., 2000; Tamada et al., 2001). En el análisis de regiones ERIC se utilizan dos primers para la reacción PCR. Estos primers flanquean secuencias repetitivas extragenómicas y que se encuentran principalmente en enterobacterias (Versalovic et al., 1991). En diversos estudios realizados con distintas cepas de *Salmonella* se ha obtenido un excelente índice de discriminación (Lim et al., 2005; Shabarinath et al., 2007; Albufera et al., 2009) y se ha reportado una reproducibilidad del 100% (Gopal et al., 2010).

Una técnica para el análisis de poblaciones de *S. enterica* y otras bacterias patógenas que combina el ensayo de PCR con el análisis de secuencias, es el de tipificación mediante el análisis de secuencias de locus múltiples (*Multi-locus sequence typing*, MLST). El método de MLST se basa en la amplificación por PCR de secuencias de fragmentos internos de 7 genes de metabolismo primario (*house-keeping*) aproximadamente de 450 a 500 pb. Las secuencias obtenidas a partir de dichos productos de amplificación se analizan para determinar las relaciones filogenéticas entre los aislados de estudio. Una ventaja de esta técnica es que los datos pueden ser comparados con secuencias de cepas de todo el mundo mediante la consulta de un banco de genes disponible en la red (mlst.net) (Maiden et al., 1998; Spratt, 1999; Torpdahl, et al., 2005; Lan et al., 2009).

Los RAPD's son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN. Dicha técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios en el genoma a los de primers de una longitud de 10 nucleótidos empleados en esta metodología (Williams et al., 1990). El polimorfismo de las bandas en los individuos se debe a que en la PCR el primer se hibrida a lo largo del genoma en secuencias homólogas tanto en sentido 5' como 3', permitiendo amplificar fragmentos de distintos tamaños. Los fragmentos sólo amplifican si la región en la que se une el oligo en sentido 5' no se encuentra muy alejada del oligo que se une en sentido 3'. Como resultado se obtienen múltiples amplicones de distinto peso molecular y esto nos permite distinguir un patrón típico para cada cepa (Busch y Nischko, 1999). Los productos de amplificación son separados por electroforesis en geles de agarosa y los patrones de bandeado son utilizados para identificar la relación entre distintas cepas bacterianas (Franciosa et al., 2001; Abdelhalim et al., 2009).

Los marcadores RAPD son dominantes, es decir, no pueden discriminar entre homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento en particular (Backeljau et al., 1995), lo cual no es significativo en el análisis genético de bacterias, debido a que éstas poseen genomas simples en una sola copia. Entre las principales ventajas de esta técnica está el hecho de que reconocen tanto regiones codificantes como las no codificantes del ADN, y revelan niveles de variación más altos que los RFLP y de las isoenzimas (Williams et al., 1990; Linch y Milligan 1994; Otero et al., 1997; Russell et al., 1997; Parker, 1998). Es una técnica relativamente fácil de implementar que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN que se va a analizar. Los productos de amplificación obtenidos son el resultado de un "mapeo" realizado a lo largo de todo el genoma. Además, es una técnica de bajo costo, se requiere poca cantidad de ADN en comparación con otras metodologías, y es capaz de identificar altos niveles de polimorfismo que nos ayudan a encontrar diferencias intraespecífica en bacterias (Ruiz et al., 2008; Abdelhalim et al., 2009).

Sin embargo, una de las principales críticas realizadas al ensayo RAPD ha sido su falta de reproducibilidad, debido a que pequeños cambios en los reactivos utilizados o a la variación en las condiciones de amplificación pueden alterar el patrón de amplificación obtenidos (Meunier y Grimont, 1993; Micheli et al., 1994).

No obstante, esta desventaja pierde sentido cuando se analizan poblaciones bacterianas locales sin intención de comparación con poblaciones de otras regiones geográficas, realizadas por distintos grupos de trabajo (Lim et al., 2005; Albufera et al., 2009). Por otro lado, Hilton et al. (1997), realizaron la optimización de la metodología RAPD en *Salmonella*, en donde determinaron las condiciones óptimas para tener un mejor resultado en cuanto a la reproducibilidad y el poder discriminatorio de la metodología. Dichos autores encontraron que el primer 1254 (CCGCAGCCAA) es altamente reproducible entre laboratorios para definir diferencias genéticas entre distintos serotipos de *Salmonella*. En estudios realizados para determinar la diversidad genética y la relación que guardan distintas cepas de *S. Enteritidis*, se han comparado distintas metodologías como RAPD's, PFGE, fagotipificación, ribotipificación y RFLP's, encontrándose que los RAPD's fueron la herramienta con mejor poder discriminatorio (Skibsted et al., 1998; Lopes et al., 2004).

En otro estudio, al intentar resolver las relaciones genéticas entre 5 cepas de *Salmonella* Niakhar resistentes a ciprofloxacina empleando RAPD's, PFGE y ribotipificación, se obtuvo el mismo nivel de resolución mediante las tres metodologías (Tankson et al., 2006). Los iniciadores utilizados para la técnica RAPD en dicho trabajo fueron el 1254 (CCGCAGCCAA) y el 1290 (GTGGATGCGA). Adicionalmente, se ha reportado que los RAPD's son capaces de diferenciar no solamente entre serotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, sino que también en algunos casos son capaces de discriminar de manera efectiva a nivel intra serotipos (Hilton et al., 1997; Chansiripornchai et al., 2000).

Según Hunter y Gaston (1988), una metodología con un buen poder discriminatorio es aquella que presenta un índice de diversidad de Simpson (D) mayor a

0.9. Para algunos ensayos RAPD aplicados a la diferenciación de cepas de *S. enterica* se ha reportado valores de $D = 0.996$ (Lim et al., 2005). En varios trabajos recientes se ha concluido que los RAPD's son una herramienta efectiva para tipificar cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* con un buen poder de discriminación, y que éste aumenta si se combina con alguna otra metodología de tipificación molecular como ERIC's o PFGE (Lim et al., 2005; Delgado et al., 2006; Shabarinath et al., 2007; Albufera et al., 2009).

2.3.3 Estudios genético – moleculares de *Salmonella enterica* en México

En el 2006 un estudio realizado en Yucatán (Zaidi et al., 2006b), se analizaron cepas de *Salmonella* provenientes de pacientes con cuadros diarreicos, niños asintomáticos y carnes de pollo, res y puerco. En estas muestras se encontró a *S. Typhimurium*, *S. Agona* y *S. Anatum* como los serotipos más abundantes en pacientes diarreicos. *S. Agona* se encontró presente como uno de los serotipos mayoritario en todos los aislados de las distintas fuentes. El estudio genético realizado por PFGE mostró un agrupamiento por serotipo, en el que se encuentran generalmente el genotipo de cepas aisladas de pacientes con cuadros diarreicos relacionadas con genotipos de cepas aisladas en alimentos.

En otro estudio realizado por Zaidi et al. (2008), se comparan cepas de *S. Thypimurium* aisladas de pacientes con cuadros diarreicos, carne de res, cerdo y pollo en distintos estados de México. Se realizó un análisis por PFGE a las 102 cepas obtenidas, en el que se obtuvieron 14 patrones de bandeo distintos, de los cuales 4 de ellos se presentaban en más de un estado, mostrando evidencia sobre la amplia capacidad de dispersión de éste patógeno en México. En este trabajo también se concluye, con base en la relación genética que existe entre cepas de pacientes y alimentos, que estos últimos son la principal causa de salmonelosis en México.

En otro estudio realizado con cepas de *S. Typhimurium*, se observó que tanto en genes *housekeeping* como en genes accesorios una muy baja diversidad genética en estas cepas, mostrando un patrón clonal(Weisner et al., 2009). El análisis realizado por MLST y PFGE en este trabajo, reveló la amplia distribución de clonas de Typhimurium obtenidas de distintas fuentes en distintos estados del país y en distintos tiempos. También observaron que los aislados obtenidos en alimentos y en personas están relacionados, aportando evidencia sobre la transmisión de *Salmonella* a través de los alimentos (Weisner et al., 2009).

III.- JUSTIFICACIÓN

Es necesario contar con información sobre los serotipos, genotipos y la distribución geográfica de cepas de *Salmonellaenterica* que se encuentran contaminando alimentos en todo el país debido a su relación con los casos clínicos de salmonelosis. De esta manera se obtienen datos epidemiológicos que nos pueden orientar sobre las distintas actividades preventivas y correctivas que se tienen que poner en práctica para mermar la incidencia de éste patógeno tanto en alimentos como en personas. En Europa, se instaló un programa intensivo de seguridad sanitaria para detectar los puntos críticos de contaminación por *Salmonella*. Los datos arrojados por el programa permitieron ubicar los puntos críticos y tomar acciones tanto preventivas como correctivas, incluso adoptando nuevas leyes para poderlas llevar a cabo con mayor rigor. A lo largo de 8 años se ha observado en Europa una disminución considerable de la presencia de este patógeno a causa de las medidas tomadas con anterioridad.

En México existen programas de vigilancia sanitaria y clínica a lo largo del territorio, en donde la búsqueda de *Salmonella* en muestras humanas y no humanas se da a diario. A pesar de la basta información, no existe un análisis estadístico publicado recientemente sobre la incidencia de *S. enterica* en el país. Esta información podría generar al igual que en Europa, lineamientos legales y de prevención para evitar la incidencia de éste patógeno en el ambiente.

Particularmente en el estado de Michoacán, el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP Michoacán) realiza constantemente vigilancia sanitaria y epidemiológica en búsqueda de patógenos que se encuentran contaminando alimentos y personas. El análisis de los aislados obtenidos se realiza hasta obtener el serotipo. Una herramienta genético – molecular que sea rápida, de buen poder discriminatorio y económica como los RAPD's, puede ayudar a ampliar el conocimiento sobre las cepas y su distribución en el estado, permitiendo así un trabajo epidemiológico más completo. A si mismo la rapidez de esta metodología permitiría poder tomar acciones en caso de brotes en el estado.

IV.- HIPÓTESIS

Los productos cárnicos y derivados lácteos para consumo humano del estado de Michoacán presentan una alta incidencia de contaminación por *S. enterica* y dichas cepas pertenecen a diversos serotipos que pueden ser agrupados con base en sus distancias genéticas y geográficas.

V.- OBJETIVOS

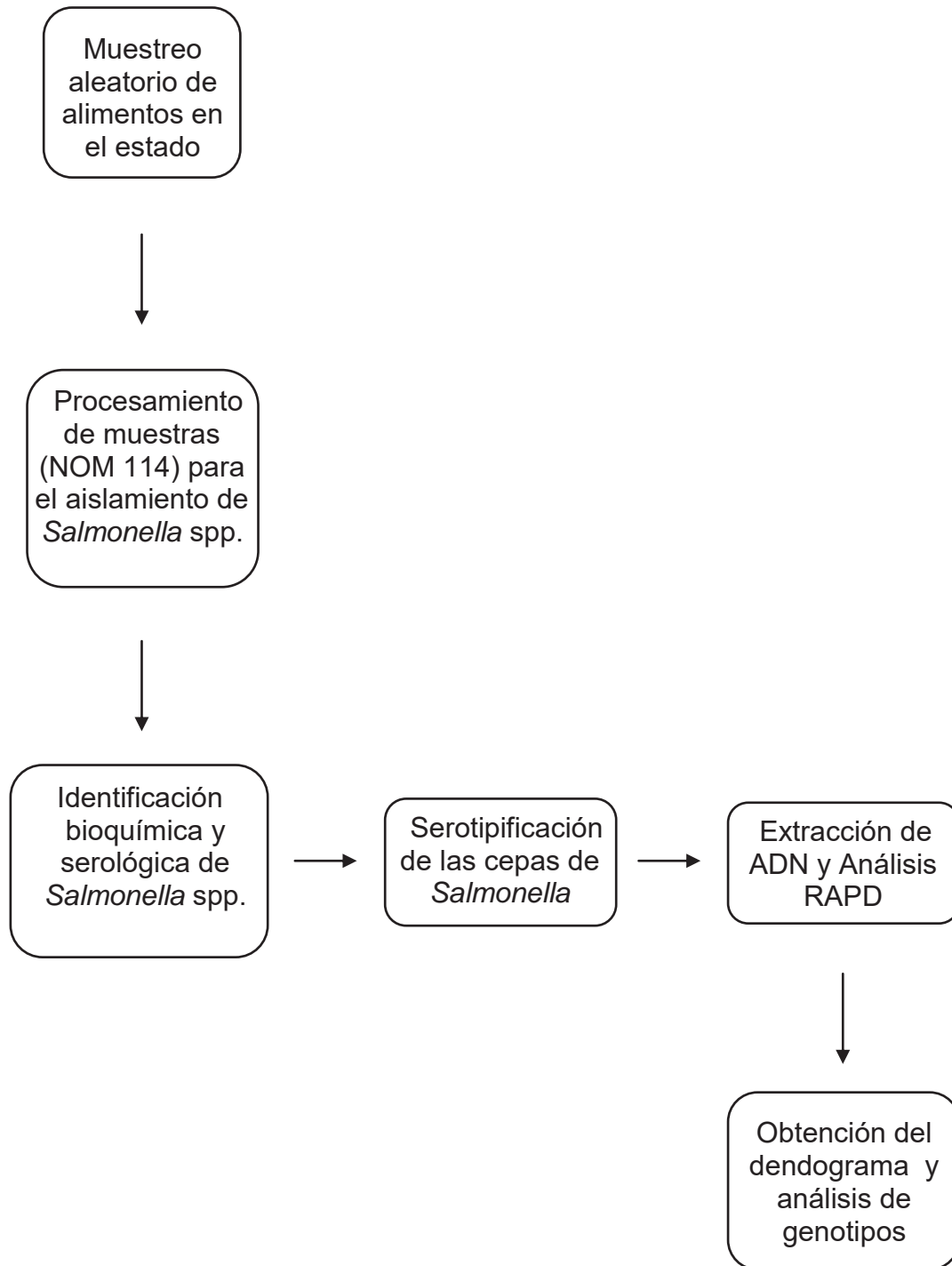
V.1 Objetivo general

Caracterizar bioquímica, serológica y genéticamente las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* obtenidas de alimentos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán.

V.2 Objetivos específicos

1. Obtener cepas de *S. enterica* de diversos productos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán.
2. Identificar los serotipos de las cepas de *S. enterica*.
3. Determinar las relaciones genéticas entre las cepas de *S. enterica*.
4. Establecer la relación entre la distancia geográfica, serotipo y la distancia genética de las cepas de *S. enterica*.

VI. ESTRATEGIA GENERAL



VII.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Origen de las muestras

Las muestras incluidas en el presente trabajo se obtuvieron del estado de Michoacán durante los años 2008 y 2009 a través de un sistema calendarizado de muestreo en las 8 jurisdicciones sanitarias que utiliza el sistema de salud en el estado con fines operativos (Fig. 1).

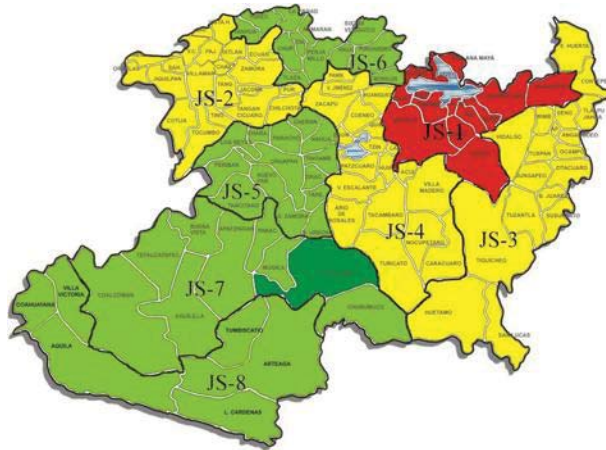


Figura 1. Mapa del estado de Michoacán que muestra la división en 8 jurisdicciones sanitarias utilizadas con fines operativos por la Secretaría de Salud.

Cada una de las jurisdicciones sanitarias del estado de Michoacán esta compuesta por varios municipios y tiene como sede administrativa y operativa la cabecera municipal más importante por su tamaño y número de habitantes (Tabla 1).

Tabla 1. Jurisdicciones Sanitarias y municipios que las componen en el estado de Michoacán.

Jurisdicción sanitaria	Municipios	Cabecera municipal
1	Alvaro Obregón, Copándaro, Cuitzeo, Charo, Chucándiro, Huandacareo, Indaparapeo, Maravatio, Morelia, Queréndaro, Santa Ana Maya, Tarimbaro, Tzitzio y Zinapécuaro.	Morelia
2	Briseñas, Cotija, Chavinda, Chilchota, Ecuandureo, Ixtlan, Jacona, Jiquilpan, Marcos Castellanos, Pajacuaran, Purépero, Cojumatlán de Régules, Sahuayo, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tinguindín, Tocumbo, Venustiano Carranza, Villamar, Vista Herrmosa y Zamora.	Zamora
3	Anganguero, Aporo, Contepec, Epitacio Huerta, Hidalgo, Huetamo, Irimbo, Juárez, Jungapeo, Ocampo, San Lucas, Senguio, Susupuato, Tiquicheo de Nicolás, Tlalpujahuá, Tuxpan, Tuzantla y Zitácuaro.	Zitácuaro
4	Acuitzio, Ario, Carácuaro, Coeneo, Erongaricuaró, Huaniqueo, Huiramba, Jiménez, Lagunillas, Madero, Nocupetaro, Panindícuaro, Pátzcuaro, Quiroga, Salvador Escalante, Tacámbaro, Turicato, Tzintzuntzan y Zacapu.	Pátzcuaro
5	Charapan, Cheran, Gabriel Zamora, Nahuatzen, Nuevo Parangaricutiro, Nuevo Urecho, Paracho, Peribán, Los Reyes, Tancitaro, Taretan, Tingambato, Uruapan y Ziracuaretiro.	Uruapan
6	Angamacutiro, Churintzio, Morelos, Numaran, Penjamillo, La Piedad, Puruándiro, Tanhuato, Tlazazalca, Yurécuaro, Zinaparo y Jose Sixtos Verduzco.	La Piedad
7	Aguililla, Apatzingán, Buenavista, Coalcomán, Churumuco, La Huacana, Múgica, Parácuaro y Tepalcatepec.	Apatzingán
8	Aquila, Arteaga, Coahuayana, Chinicuila, Lázaro Cárdenas y Tumbiscatio.	Lázaro Cárdenas

7.2 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo mediante un calendario preestablecido, el cual se describe brevemente. Las muestras se colectaron durante todas las semanas de los dos años anteriormente especificados. Los lunes secolectaron 18 muestras de la jurisdicción 1. El resto de la semana se colectaron 9 muestras de la jurisdicción 1 más otras 9 muestras correspondientes al resto de jurisdicciones. La colecta de muestras en las jurisdicciones 2 a 8 se llevó a cabo de tal forma que en la misma semana se tuvieran muestras de estas siete jurisdicciones y una misma jurisdicción no fuera muestreada dos veces antes de haber muestreado el resto.

Se tomaron muestras de acuerdo al esquema de muestreo de la secretaría de salud que escarne de res y puerco cruda y cocida, carne de pollo cocida, mariscos cocidos, ostiones crudos, quesos, cremas y embutidos. Las muestras se tomaron de manera aleatoria de tiendas, establecimientos comerciales, carnicerías, fondas, cocinas económicas y restaurantes.

7.3 Manejo de muestras

Las muestras se colectaron en condiciones asépticas utilizando para ello guantes, cubrebocas y material estéril. Se almacenaron en bolsas de polipapel estériles y se conservaron en una hielera a una temperatura entre 2 y 8°C para su posterior análisis en el laboratorio en un lapso no mayor de 24 h a partir de la colecta.

7.4 Aislamiento de *Salmonella* spp.

La obtención de aislados de *Salmonella enterica* se realizó mediante la metodología estipulada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-114-SSA1-1994) para el aislamiento de dicha especie en muestras de alimentos, la cual se describe a continuación. Se colocaron 25 g de la muestra en 225 ml de caldo lactosado (CL, Difco,

USA), incubándose a 35 °C por 24 h. Posteriormente se transfirió 1 ml de dicho cultivo a 10 ml de caldo tetrionato (CTT, DIFCO, USA) suplementado con 0.1 ml de verde brillante y 0.2 ml de yodo-yoduro, como inhibidores de bacterias Gram positivas, y se incubó a 35 °C por 24 h. Del cultivo inicial en caldo lactosado también se tomaron 0.1 ml para inocular en 10 ml de caldo Rappaport (CRP, DIFCO, USA), incubándose a 42 °C por 24 h. Una vez terminado el periodo de incubación en CTT y CRP, con la ayuda de un hisopo se transfirió una pequeña alícuota de cada uno de éstos a cajas de Petri con agares selectivos (Tabla 2). La alícuota transferida se distribuyó en cada agar estriando con un asa bacteriológica para obtener colonias aisladas después de incubar a 35 °C por 24 h.

Tabla 2. Medios de agar selectivos para el aislamiento de *Salmonella*.

Medios	Siglas	Marca
Xilosa-Lisina-Desoxicolato	XLD	BIOXON
Sulfito de Bismuto	SB	BIOXON
Hektoen	H	BIOXON
<i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i>	SS	BIOXON

Al término de la incubación en los medios de agar selectivos se analizaron las placas en busca de colonias con la morfología típica de *Salmonella* spp., caracterizada por la presencia de un halo transparente y la producción de ácido sulfhídrico al centro.

7.4.1 Caracterización bioquímica de *Salmonella* spp.

Para la caracterización bioquímica se utilizó una colonia típica de *Salmonella* spp. de cada aislado sospechoso en los agares selectivos mencionados anteriormente. Los medios inoculados para la caracterización bioquímica se incubaron nuevamente a 35 °C por 24 h. Se identificó el patrón metabólico típico de *Salmonella* spp. (Tabla 3), el cual se describe de manera breve a continuación.

Tabla 3. Medios utilizados para las pruebas bioquímicas características de *Salmonella* empleadas en este trabajo.

Bioquímica*	Patrón típico
TSI	K/A H ₂ S (+)
LIA	K/K H ₂ S (+)
Citrato	(+)
MIO	Movilidad (+)
	Ornitina (+)
Indol	(-)
Urea	(-)

* TSI, agar triple hierro azúcar; LIA, agar hierro lisina; MIO, movilidad indol ornitina. Ver NOM-114 para detalles.

Tanto el agar TSI como el LIA se prepararon en forma de flauta, esto permite tener 2 cámaras de reacción en un mismo tubo. Con el asa bacteriológica se tomó una colonia del aislado a analizar, se picó el fondo del agar sin perforar para generar un ambiente limitado en oxígeno, y posteriormente se estrió la flauta del agar. Para el citrato, que también se preparó en forma de flauta, únicamente se estrió la flauta. El MIO se inoculó picando con el asa bacteriológica al centro sin llegar al fondo del tubo. En el caldo urea se dispersó el inóculo en el caldo (Figura 2).

En el TSI se observa en la flauta (región aerobia) la utilización de la glucosa, de manera que se genera una pequeña cantidad de ácido, que posteriormente se neutraliza por las aminas derivadas de la descarboxilación oxidativa de las proteínas (medio alcalino, "K"). Como resultado el medio conserva la coloración roja en la superficie. En el fondo del agar se lleva a cabo la fermentación de la glucosa, lo cual genera ácido, y por consiguiente el colorante indicador rojo de fenol vira a color amarillo (medio ácido, "A"). En medio ácido, el tiosulfato de sodio es utilizado como el aceptor final en la cadena transportadora de electrones y como consecuencia éste compuesto se reduce a ácido sulfhídrico, que a su vez reacciona con el hierro presente en el medio formando un precipitado negro de sulfuro de hierro.

En el caso de LIA se observa en el pico de la flauta al igual que en el TSI la utilización aerobia de la glucosa y su neutralización por las aminas generadas por la descarboxilación oxidativa (medio alcalino, "K"). En el fondo del agar, se fermenta la glucosa generando un medio ácido. Es en éste ambiente ácido es donde se lleva a cabo la descarboxilación de la lisina que posteriormente neutraliza el medio por lo que el indicador de púrpura de bromocresol regresa su coloración a un tono violeta (medio alcalino, "K"). Al igual que en el agar TSI se genera precipitado de sulfuro de hierro.

El agar citrato contiene como única fuente de carbón el citrato, por lo que solamente las bacterias que contengan la enzima citrato permeasa podrán multiplicarse y utilizar los fosfatos de amonio que son la única fuente de nitrógeno del medio. Estos formarán junto con la eliminación del citrato amoniaco, generando una basificación muy fuerte lo que ocasiona el cambio de color azulado en el colorante azul de bromotimol del medio.

En el semiagar MIO se observa la movilidad de *Salmonella* spp. por la turbidez del medio. El indol es el resultado de la degradación del triptófano por acción de la enzima triptofanasa, al agregar reactivo de Kovacs (p NN dimetil aminobenzaldehído), este reacciona con el indol y se produce un compuesto de color rojo. *Salmonella* spp. carece de triptofanasa, por lo que la prueba de indol es negativa. La descarboxilación de la ornitina se lleva a cabo por la acción de la enzima ornitina descarboxilasa. Esto resulta en la formación de amina putrescina y liberación bióxido de carbono, lo que genera un incremento del pH tornándose el indicador púrpura de bromocresol a una coloración violeta – púrpura.

En el caldo urea se busca la acción de la ureasa, enzima que es capaz de hidrolizar la urea produciendo amoníaco, que al reaccionar con el caldo, forma carbonato de amonio produciéndose alcalinización del medio y un cambio en la coloración por acción del indicador rojo de fenol presente en el medio. Esta enzima no está presente en *Salmonella* spp. por lo que no hay cambio de coloración en el medio.

En aquellos aislados en los que se observó el metabolismo típico de *Salmonella*, se tomó una alícuota del tubo LIA y se hizo un pase en agar base sangre (BAB) incubándose por 24 h a 35 °C. Después del periodo de incubación, se tomó una alícuota para realizar la prueba de oxidasa en disco (BIO-RAD, USA) así como una prueba serológica (antisuero polivalente de *Salmonella* O: A-I + Vi, InDRE) para observar aglutinación. La prueba de la oxidasa se realiza para comprobar la existencia de citocromo c, proteína que forma parte de la cadena transportadora de electrones en el metabolismo respirador, la cual no está presente en la familia Enterobacteriaceae, por lo que ésta prueba es negativa para *Salmonella* spp. Aquellos aislados que aglutinaron y presentaron prueba de oxidasa negativa se sembraron en agar Mac Conkey y se incubaron a 35 °C por 24 h. Se seleccionó una de las colonias crecidas en dichas placas y se le realizaron las pruebas bioquímicas utilizando kit CRYSTAL E/NF ID SYSTEM (BBL, USA) para confirmación de la identificación. La placa del kit inoculada con la cepa se incubó durante 24 h a 35 °C y se tomó lectura del resultado con ayuda del software del kit, de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

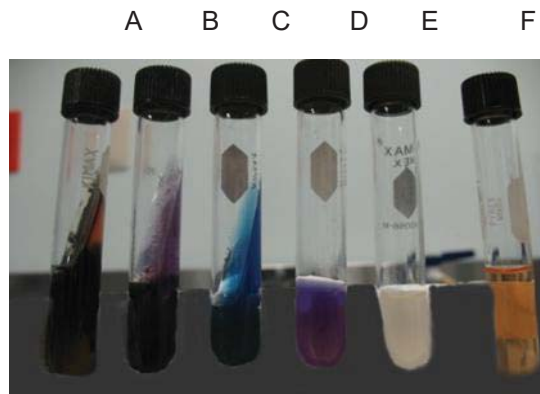


Figura 2. Resultados típicos de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella*. TSI (K/A, básico sobre ácido) presencia de ácido sulfídrico y acidificación del medio en región hipóxica por metabolismo de glucosa (A), LIA (K/K básico/básico) presencia de ácido sulfídrico y descarboxilación de la Lisina (B), Citrato se observa una basificación del medio (color azul) por la utilización del citrato como fuente de carbono (C), MIO presencia de movilidad (turbidez) y descarboxilación de la ornitina (fondo del tubo violeta-púrpura) (D), Caldo Peptonado ausencia de indol, no reacciona con el reactivo de Kovacs (E) y Urea negativa (F).

7.5 Serotipificación de *Salmonella* spp.

La serotipificación se realizó mediante el esquema tradicional de Kauffmann-White (WHO, 2001) con distintas combinaciones de antisueros para los grupos somáticos, flagelares y capsular. Todos los antisueros utilizados para la serotipificación fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (InDRE) en donde se llevó a cabo éste procedimiento.

Las cepas de *Salmonella* obtenidas con las pruebas anteriormente descritas se sembraron en agar base sangre (BAB) y se incubaron a 35 °C por 24 h. A las colonias obtenidas se les hizo reaccionar con antisuero específico para la identificación del grupo somático “O” y poder definir el serogrupo. Este ensayo se realizó en un portaobjetos, colocando en un extremo de este una gota de solución salina en la que se homogeneizó una muestra de la colonia bacteriana, en el otro extremo del portaobjetos se colocó una gota del antisuero y se mezcló con el homegeneizado bacteriano agitando 1 min con la ayuda de un asa bacteriológica, evaluando posteriormente de manera visual la aglutinación.

Una vez definido el serogrupo se continuó con la búsqueda de las fases flagelares para determinar el serotipo. Del crecimiento colonial obtenido en BAB se inoculó medio de caldo soya tripticaseína (TSA) y se incubó a 35°C por 24 h. Al término de la incubación a cada tubo de TSA se le agregaron 10 ml de solución salina formalinizada (0.6%) y se dejaron reposar por 2 h. Una vez concluído el periodo de reposo se tomaron 0.9 ml y se agregaron a un tubo de ensaye con 0.1 ml de antisuero específico para las fases flagelares de cada serogrupo definido, los cuales se incubaron en baño maría a 50 °C por 1 h. La lectura de aglutinación en cada tubo con un antisuero específico se realizó con la ayuda de una lámpara de luz blanca.

Para el caso de las cepas que no presentaron fases flagelares, o sólo una fase, se tomó una asada del crecimiento obtenido anteriormente en BAB y se inoculó por toque al centro en caja Petri con semiagar GARD (Koehn 1970) para inducir la

movilidad y las fases flagelares. Se incubó a 35°C por 24 h y después del periodo de incubación se observó la movilidad de la bacteria. Para el caso de las cajas en donde no se observó movilidad pero sí crecimiento, se volvió a pasar de esa placa a otra de GARD para seguir el procedimiento mencionado anteriormente.

En el caso de algunos serogrupos, después de varios pases, no se pudo obtener ninguna o sólo una de las fases flagelares, por lo que se identificaron solo a nivel de serogrupo o con la leyenda de monofásicas a las que expresaron sólo una fase flagelar. Cuando se observó movilidad en GARD, se tomó una alícuota de la cepa, de la parte más alejada al centro, y se sembró en caldo TSA para repetir el procedimiento en busca de una o de las 2 fases flagelares.

7.6 Ensayo RAPD

7.6.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001), el cual se describe de manera breve. La extracción se realizó a partir de la colecta de 5 colonias de cultivos crecidos en Agar Hektoen (BIOXON, USA) por 24 h a 35 °C. Las colonias cosechadas se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se añadieron 400 µl de regulador de lisis [Tris-HCl 1.0M a pH=8.0, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, NaCl 5.0M y EDTA 0.5M a pH=8.0] y se agitaron por 5 min.

Posteriormente se añadieron 400 µl de fenol – cloroformo (1:1 v/v) y se homogenizó durante 5 min. Los tubos se centrifugaron por 5 min a 1,500xg y se rescató la fase acuosa. El ADN fue precipitado añadiendo a la fase acuosa recuperada el mismo volumen de isopropanol frío y manteniendo los tubos con muestra por 10 min a -20 °C. Nuevamente se centrifugó a 1 500xg por 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla recuperada se lavó con 250 µl de etanol al 70 %.

Finalmente la pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de agua desionizada esterilizada. El ARN presente en las muestras se digirió con RNasa (Bio–Rad, USA) incubando las muestras a 37 °C por 1 h. La calidad de ADN se visualizó en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio mediante técnicas convencionales (Sambrook y Russell, 2001). Las imágenes de los geles se adquirieron empleando un fotodocumentador CHEMI-DOC Molecular viewer (BIO-RAD, USA). Se obtuvo una única banda de alto peso molecular libre de ARN. El ADN obtenido se guardó a -20 °C hasta su posterior utilización.

7.6.2 PCR

La reacción de amplificación para los ensayos RAPD se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo: buffer Tris-HCl 10 mM pH 8.0, 1.5 mM de MgCl₂, 1.25 unidades de *Taq* polimerasa, 2 mM de de cada uno de los nucleótidos, 10 µM de cada primer (Tabla 4), y 25 ng de ADN. Todos los reactivos utilizados para la PCR fueron adquiridos de Invitrogen, USA. El programa de amplificación fue el mismo para los tres primers empleados y consistió de 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 36 °C y 2 min a 72 °C. Todos los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA).

Tabla 4. Oligos utilizados para el análisis RAPD

Primer	Secuencia 5→3	Referencia bibliográfica
1252	5'-GCGGAAATAG-3'	Pacheco et al., (1997)
1254	5'-CCGCAGCCAA-3'	Hilton et al., (1997)
1290	5'-GTGGATGCGA-3'	Tankson et al., (2006)

Los patrones de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% (Sambrook y Russel, 2001), utilizando la escalera de 1 kb (Invitrogen, USA) como marcador de peso molecular.

7.6.3 Análisis de agrupamiento

Los geles con los patrones de amplificación RAPD se analizaron mediante el software Quantity One 4.4.1 (Bio-Rad, USA), el cual permite eliminar el fondo de fluorescencia para definir mejor las bandas de amplificación. Una vez definidas las bandas de amplificación el software permite la generación de curvas densitométricas para cada uno de los carriles del gel. Las curvas densitométricas generadas para cada carril pueden ser sobrepuestas para comparar el patrón de amplificación entre estos como un patrón de picos.

El software también incluye la función MATCH, mediante la cual una vez que se ha completado el análisis densitométrico permite generar una matriz binaria de 1 y 0. Adicionalmente, el software permite ajustar el porcentaje de diferencia entre el tamaño de las bandas generadas entre carriles para considerar cuando dos bandas de diferentes carriles deben ser consideradas como la misma. En este trabajo dicho porcentaje de tolerancia se ajustó al 3%. Todo este proceso de análisis permite minimizar la subjetividad que puede introducirse mediante el análisis exclusivamente visual de los geles. Todas las bandas superiores a 200 pb e inferiores a 4 kb fueron incluidas en el proceso anteriormente descrito.

A partir de la matriz binaria generada se realizó un análisis de agrupamiento empleando el paquete PAST versión 1.4 (Hammer et al., 2001) utilizando distancias euclidianas para el cálculo de las distancias genéticas y realizando el dendrograma mediante el algoritmo de Ward. Con base en diversos trabajos de la literatura (Lim et al., 2005; Tankson et al., 2006; Shabarinath et al., 2007) se consideró una similitud genética mínima del 95% para asignar un aislado dentro de un genotipo.

Para conocer el poder de discriminación de los marcadores RAPD generados en los aislados de estudio se calculó el índice de diversidad de Simpson (D) de acuerdo a la fórmula $D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=0}^n (n * (n - 1))$ como se describe en Hunter y Gaston (1988). Donde N = No. total de individuos (cepas) y n = No. de cepas dentro de cada genotipo.

7.7 Análisis de coordenadas principales

Un método de análisis multivariado alternativo al análisis de agrupamiento de Ward lo constituye el análisis de coordenadas principales (PCoA). Dicha aproximación utiliza las distancias Euclidianas para generar un mapa de distribución de las distancias entre las cepas en un espacio de ordenación, intentando explicar la mayor varianza en el conjunto de datos originales. Este análisis se realizó con ayuda del paquete estadístico GenAlex ver 6.0 (Peakall and Smouse 2006), para observar la distribución de las cepas de estudio de acuerdo al tipo de muestra de procedencia.

VIII. RESULTADOS

8.1 Obtención de las cepas e incidencia de *S. enterica*.

Mediante el esquema de muestreo seguido en el presente trabajo se analizaron un total de 8 414 muestras de alimentos en el estado de Michoacán (Tabla 5). La jurisdicción 1, dentro de la cual se encuentra la capital del estado, fue de la que se analizaron un mayor número de muestras con 4461, mientras que la jurisdicción 5 (Uruapan) fue aquella de la que se analizó un menor número de muestras con 579. Como se observa, el número de muestras de la jurisdicción 1 es, en promedio, siete veces superior al del resto de las jurisdicciones.

Tabla 5. Muestras de alimentos analizados por producto y porjurisdicción sanitaria del estado de Michoacán para el aislamiento de *Salmonella enterica* en el periodo 2008-2009.

Jurisdicción	Cárnicos Crudos	Chorizo	Quesos	Coctelescr udos	Cremas	Cárnicosc ocidos	Total
1	76	79	180	12	78	4036	4461
2	52	51	100	6	52	353	614
3	52	51	100	9	52	396	660
4	52	51	100	15	52	322	592
5	52	51	100	13	52	311	579
6	52	51	100	5	52	348	608
7	52	51	100	8	52	388	651
8	52	51	100	34	52	402	691
Total	440	436	880	102	442	6556	8414

En cuanto al tipo de muestra, los productos cárnicos cocidos; que incluyen carne de res, cerdo, pollo, embutidos, pescado, camarón y pulpo, fueron aquellos que más se analizaron, con un total de 6 556, mientras que de los que menos muestras se procesaron fueron los cocteles de mariscos crudos (ostiones), con únicamente 102 muestras (Tabla 5). De hecho, los cárnicos cocidos representaron el 90.5 % de todas las muestras analizadas en la jurisdicción 1 y más del 50% de las muestras evaluadas en el resto de las jurisdicciones.

Del total de muestras analizadas se logró el aislamiento de 130 cepas de *S. enterica* (Fig. 3), lo cual refleja una incidencia en alimentos cárnicos y derivados lácteos de éste patógeno en el estado de Michoacán de 1.46 %. De carnes de res crudas; tanto fileteadas, en trozo ó molida, se obtuvieron la mayoría de las cepas con 58, seguida de muestras de chorizo con 46. De los quesos analizados, tanto de marca como artesanales, se aislaron un total de 19 cepas únicamente en los quesos de elaboración artesanal en el estado. De las muestras que menor cantidad de aislados se obtuvo fue de los productos cárnicos cocidos, de los que se logró recuperar únicamente 3 cepas, mientras que de los cocteles solo se pudieron recuperar cuatro cepas (Fig. 3) En alimentos cárnicos cocidos se analizaron 6 556 muestras, de las cuales sólo se obtuvieron 3 cepas en un chorizo cocido de La Goleta, un guisado de pollo en Zamora y unos tacos de jamón en Morelia. Se analizaron 442 cremas de las cuales no se obtuvo ningún aislado.

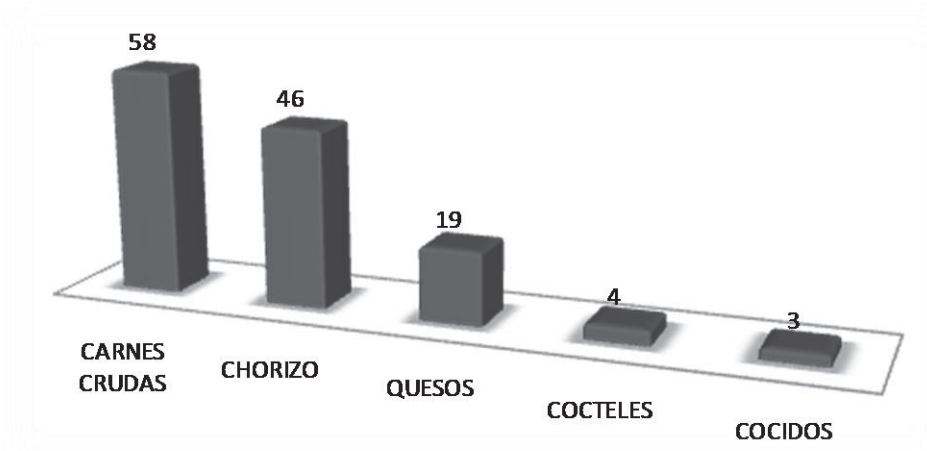


Figura 3. Número de cepas de *Salmonella enterica* obtenidos en los distintos tipos de alimentos muestreados en el estado de Michoacán, en los años 2008 y 2009.

La región con mayor incidencia por este agente zoonótico fue la jurisdicción 8, con presencia en el 4 % del total de muestras analizadas en esta zona (Fig. 4A). En las jurisdicciones 1, 4 y 7 se observó solo el 1% de incidencia de *S. enterica* para el total de muestras analizadas en cada una de éstas. La mayor incidencia de *S. enterica* en carne de res cruda, se presentó en la jurisdicción 8, con 31% de las muestras analizadas en esta región. (Fig. 4B). Por su parte, en las jurisdicciones 5, 7 y 8 se

presentó la mayor incidencia de *S. enterica* en muestras de chorizo crudo, con valores de, 18 %, 17 % y 20% del total de muestras analizadas para cada una de dichas regiones, respectivamente (Fig. 4C). En los quesos se obtuvieron 19 cepas, con mayor presencia de este patógeno en las jurisdicciones 1, 3 y 6 (Fig. 4D). Se analizaron 102 muestras de cocteles crudos, obteniendo 4 cepas de *S. entérica*, dos en coctel de ostión (en Morelia) y dos en coctel de callo de hacha (en Uruapan).

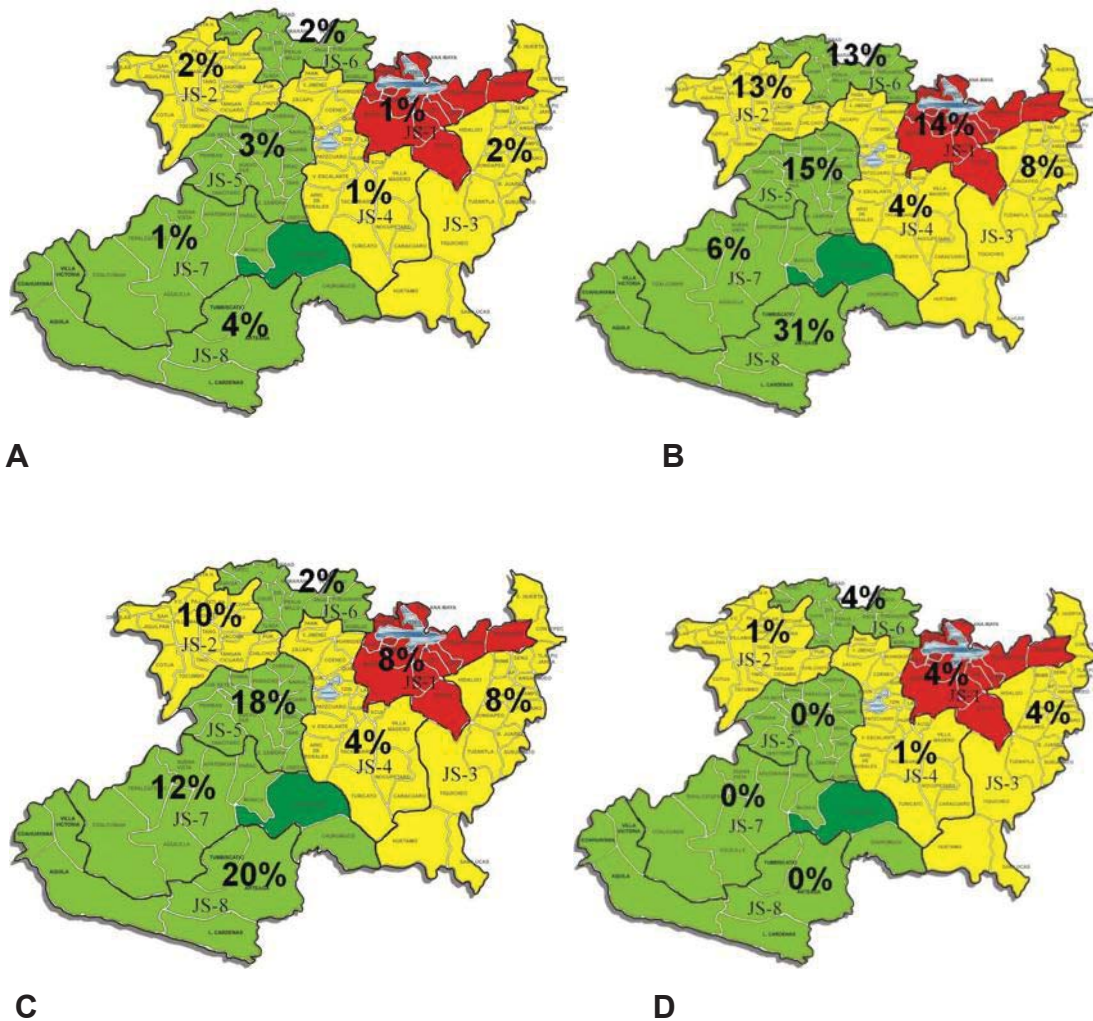


Figura 4. Porcentajes de incidencia de *Salmonella enterica* del total de alimentos analizados en cada jurisdicción sanitaria (A), sólo en muestras de carne de res cruda (B), en chorizos (C) y quesos (D). Valores obtenidos tomando en cuenta el total de muestras obtenidas en cada una de las 8 jurisdicciones sanitarias en que divide al estado de Michoacán la Secretaría de Salud.

8.2 Serotipos identificados

La mayoría de las cepas de *Salmonella enterica* se pudieron serotipificar. Sólo 20 cepas se definieron a nivel de serogrupo, debido a que no expresaron una o ninguna de las dos fases flagelares. De los 34 serotipos obtenidos el de mayor frecuencia fue Typhimurium con 16 cepas, seguido de Anatum con 15, posteriormente Agona con 11 (Tabla 6). No se encontró una relación entre el serotipo y el tipo de muestra o jurisdicción de donde se obtuvieron los aislados.

8.3 Análisis RAPD

Los patrones de amplificación RAPD generaron un mínimo de 4 y un máximo de 12 bandas, dependiendo del primer utilizado y el tipo de cepa analizada (Fig. 5). En el caso del primer 1252 se generaron bandas entre 400 pb y 3.83 kb de tamaño, proporcionando un total de 14 bandas para el análisis de agrupamiento. El primer 1254 generó bandas entre los 300 pb y 3.52 kb, con un total de 16 bandas. Por último, en el caso del primer 1290 se generaron bandas entre los 490 pb y los 2.074 kb de tamaño, con un total de 12 bandas (Fig. 5).

Tabla 6. Serotipos de *S. enterica* identificados en muestras de alimentos crudos, cocidos y procesados en el estado de Michoacán durante el periodo 2008 - 2009.

Serotipo	Porcentaje
Typhimurium	13
Anatum	12
Serogrupo B	11
Agona	9
Derby	7
Give	5
Vejle	5
Muenster	4
Serogrupo C1	3
Newport	3
Panama	3
Adelaide	2
Havana	2
Reading	2
Senftenberg	2
Serogrupo E1	2
London	2
Mbandaka	2
Montevideo	2
Sinstorf	2
Serogrupo O 35	1
Borismorbotficans	1
Serogrupo D monofasica	1
SerogrupoE1 monofasica	1
Enteritidis	1
Serogrupo I	1
Infantis	1
Lockleaze	1
Meleagridis	1
Oranienburg	1
Poona	1
Saintpaul	1
Sandiego	1
Weltevreden	1

El índice de discriminación de Simpson (D) calculado de acuerdo a los resultados del ensayo RAPD fue de 0.965, lo cual representa un valor que indica un buen poder de discriminación entre los aislados de la población estudiada.

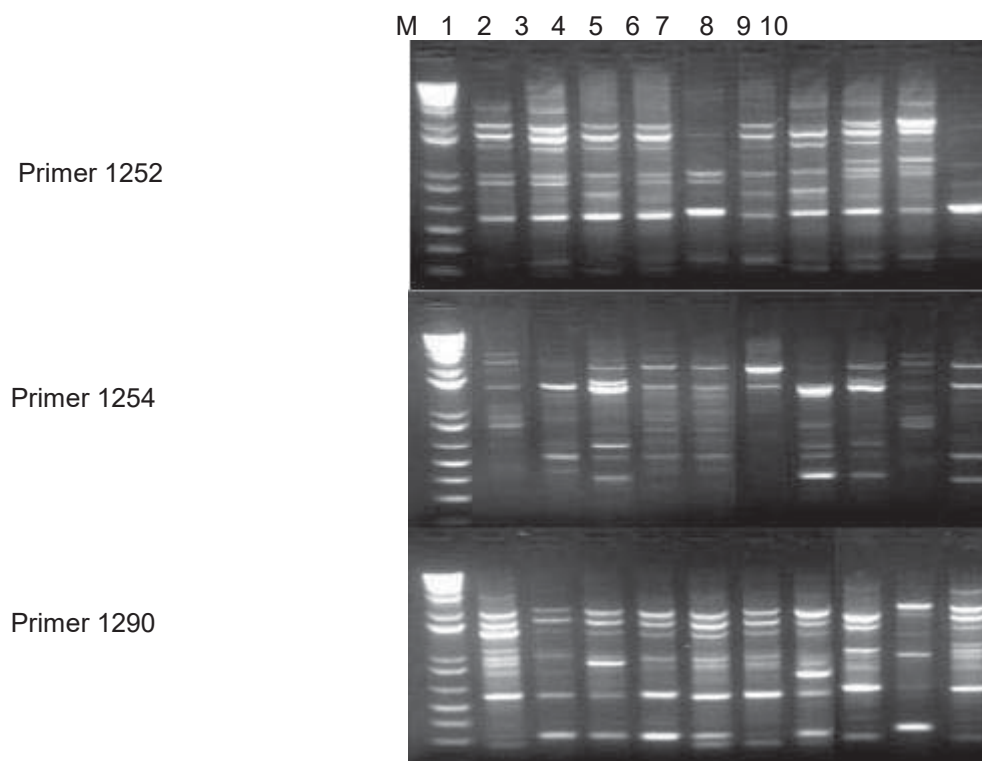


Figura 5. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra patrones representativos de amplificación RAPD de las cepas de *S. enterica* aisladas. En cada panel se señala el primer utilizado. M, marcador de tamaño molecular, escalera de 1Kb (Invitrogen, USA). Carriles 1-10, patrones de amplificación RAPD de distintos aislados de *S. enterica*.

8.4 Análisis de agrupamiento

En el dendograma obtenido, a un 85% de similitud se observaron cinco grupos principales y a un 95% se distinguen 28 genotipos (Fig. 6). El dendograma generado no mostró relación de los genotipos por tipo de muestra, localidad de origen o por serotipo (Fig. 6).

Se realizaron análisis de agrupamiento de los 3 serotipos mayoritarios, excluyendo a los demás serotipos, con la finalidad de encontrar patrones de distribución de sus genotipos en el estado (Fig. 7). El patrón de dispersión observado en los 4 genotipos identificados para *S. Typhimurium* fue heterogéneo. El genotipo G1, mostró una distribución restringida a la región norte del estado, abarcando las jurisdicciones 1, 2 y 6 (Fig. 7A). En el caso de los genotipos G2 y G4 se observó una dispersión norte-sur, aunque con diferencias en la presencia de algunas de las jurisdicciones. El genotipo G3 se presentó en las jurisdicciones 1, 3 y 8, las primeras dos adyacentes en la región noreste del estado, pero la tercera distante de éstas, ubicada en el sur del estado. Para el caso de *S. Anatum* se identificaron 5 genotipos distintos, prevaleciendo en la región centro y noreste del estado (Fig. 7B), salvo el caso de dos aislados que se presentaron en la región sur, específicamente en la jurisdicción 8. El serotipo Agona se dividió en 3 genotipos distintos, los cuales se ubicaron en general hacia el sur del estado, en las jurisdicciones 7 y 8. Sólo el genotipo G3 mostró una distribución a lo largo del eje norte-sur del estado (Fig. 7C).

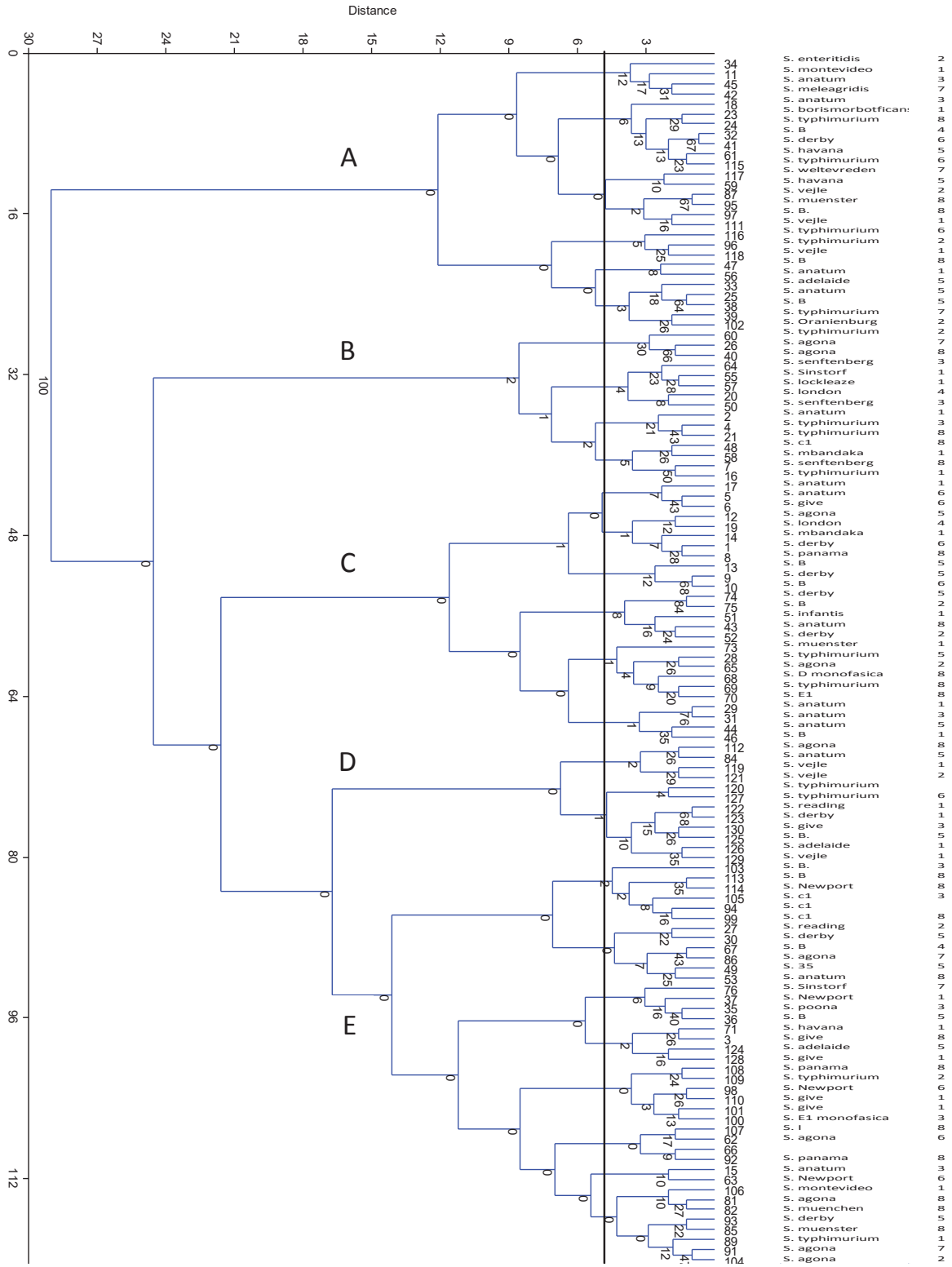


Figura 6. Dendrograma generado a partir de los ensayos de amplificación RAPD de las cepas de *S. enterica* aisladas. Se incluyeron los resultados obtenidos de los tres iniciadores empleados para calcular las distancias genéticas mediante la determinación de las distancias euclidianas. Los resultados obtenidos se emplearon para generar el patrón de agrupamiento mediante el algoritmo Ward.

Agona

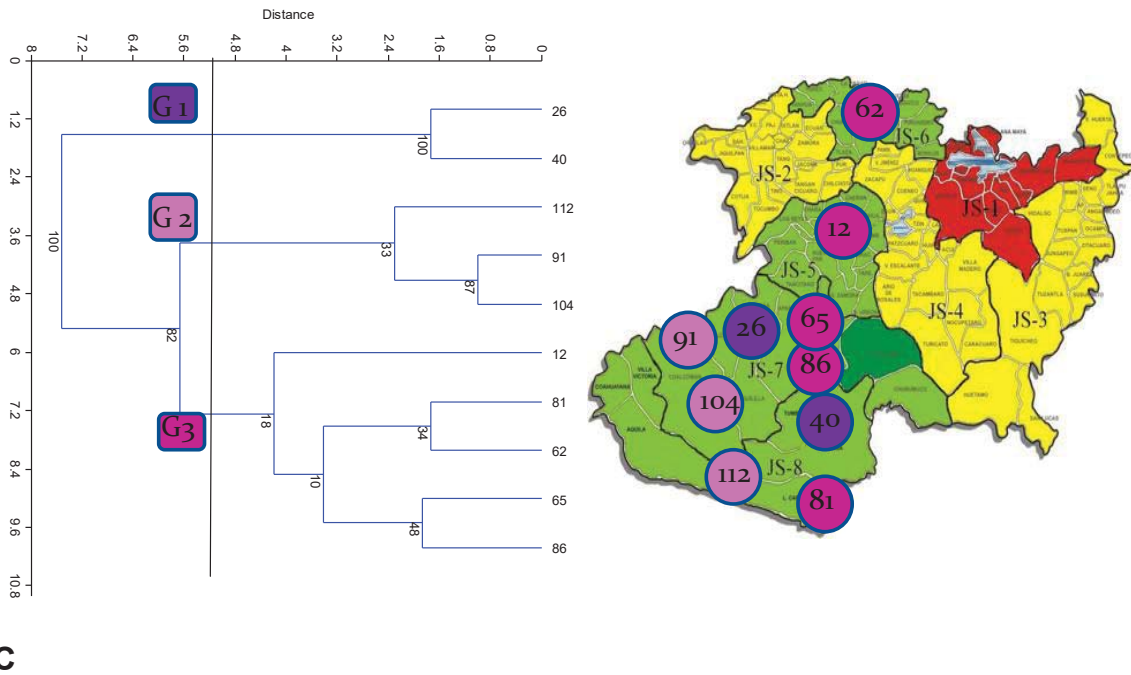


Figura 7. Dendrograma generado para cada uno de los serotipos mayoritarios de *S. enterica* encontrados. Paneles (A)Typhimurium,(B) Anatum,(C) Agona.Los patrones obtenidos se generaron calculando las distancias genéticas mediante el cálculo de distancias euclidianas y con los valores obtenidos se realizó el patrón de agrupamiento empleando el algoritmo de Ward.

8.5 Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales (PCoA) no mostró una correlación directa ($r = 0.0612$) entre los genotipos y el sitio de origen. Los primeros 3 cuadrantes explican el 68.05 % de la variación de los datos. Los grupos que se generan en los cuadrantes no están bien definidos por una sola jurisdicción, lo que indica que los genotipos se encuentran ampliamente distribuidos en las jurisdicciones.

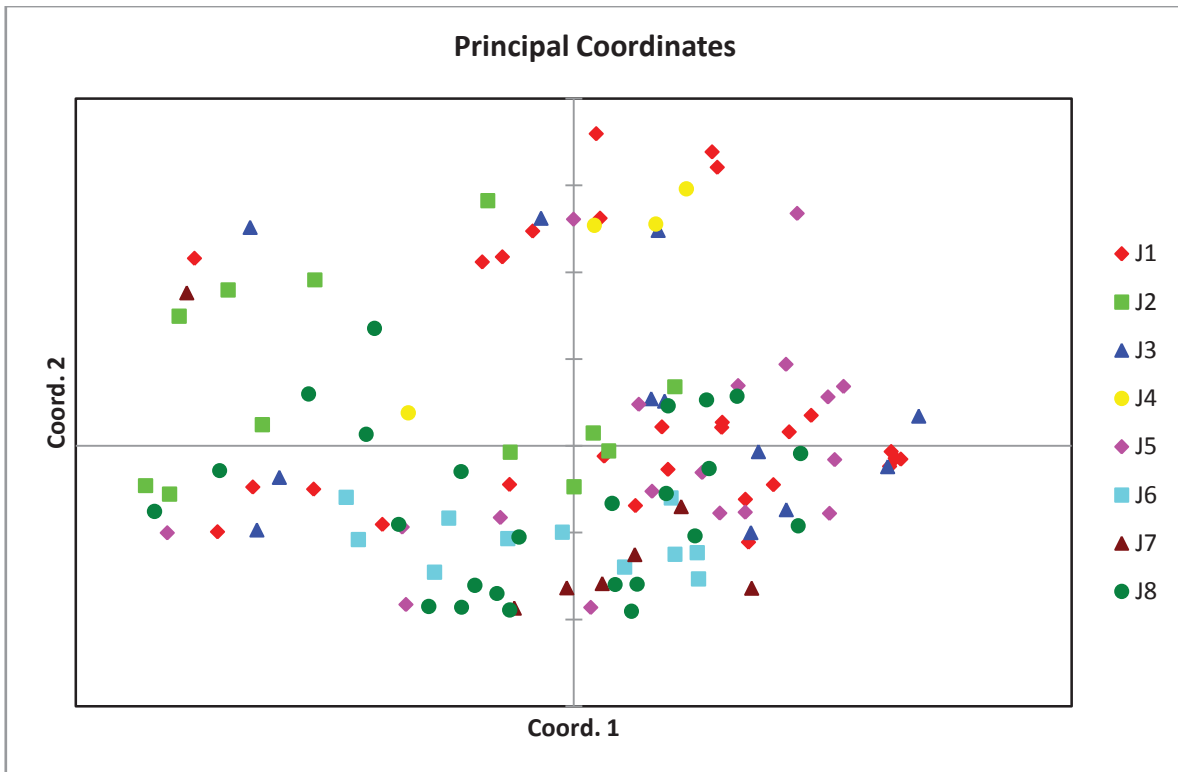


Figura 8.- Análisis de coordenadas principales de genotipos de *S. enterica* obtenidos en alimentos cárnicos y derivados lácteos de cada una de las 8 jurisdicciones sanitarias en que la Secretaría de Salud divide al estado de Michoacán.

IX. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron 130 cepas de *Salmonella enterica* de muestras de alimentos provenientes de todo el estado de Michoacán durante los años 2008 y 2009. Una de las primeras observaciones que es importante destacar es el hecho de que se determinó la presencia de *S. enterica* principalmente en alimentos crudos de origen animal del estado de Michoacán. Este dato indica la importancia del proceso de cocción en los alimentos, ya que en alimentos cocidos fue prácticamente nulo el aislamiento de este patógeno.

La presencia de esta bacteria en los 3 tipos de alimentos cocidos analizados pudo deberse a una contaminación cruzada por malas prácticas (ej. mala higiene del personal y del material de trabajo) en la elaboración del alimento. La contaminación de procesados de origen animal por mala higiene durante el procesamiento ha sido previamente reportada (Humphrey et al., 1994; Haysom y Sharp, 2005). El conocimiento del origen de estas muestras permite acciones de prevención para la contaminación que podrían incluir un adecuado lavado de material, cloración del agua, desinfección de la mesa de trabajo y equipo o maquinaria que se utilice en la preparación de los alimentos, buen hábito de limpieza del personal que maneja los alimentos.

La incidencia de *S. enterica* en carnes de res crudas para el estado fue de 13.2%. Este dato contrasta con datos obtenidos en un estudio realizado con carnes crudas en distintas localidades del estado de Guerrero (Bello et al., 1990), en el que se ha determinado una incidencia de este patógeno del 32.44 %. Para el caso de las muestras de chorizo, encontramos en Michoacán 10.5 % de incidencia, mientras que un trabajo realizado por Bello y Abarca (1991), determinaron un 40.7 % de incidencia en chorizos de distintas localidades del estado de Guerrero.

La discrepancia de los datos obtenidos en los trabajos de Bello et al. 1990 y Bello y Abarca, 1991 con respecto al presente trabajo pudiera deberse en parte a una amplia diferencia temporal en que se realizaron los estudios y a las medidas de prevención que se han tomado en los distintos estados del país para disminuir la incidencia de éste agente zoonótico, ya que existe una campaña para la prevención a nivel federal conforme a la ley general de salud, en la que la Secretaría de Salud ejerce atribuciones de regulación, control y fomento sanitario, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), que incluye acciones como la prevención y el control de los efectos nocivos de los factores ambientales en la salud del hombre y el control sanitario de productos, servicios y de su importación y exportación y de los establecimientos dedicados al proceso de los productos.

Por otro lado, en el presente trabajo encontramos un 31 % de incidencia en carnes crudas provenientes de la jurisdicción 8, que es la zona costera del estado de Michoacán. Esta coincidencia con el porcentaje de incidencia obtenido para el estado de Guerrero puede obedecer al hecho de que ambas son regiones calurosas y húmedas todo el año con temperaturas promedio de 27.8 °C con un rango de oscilación anual de 27 °C a 48 °C y una precipitación pluvial anual de 1 276.8 mm, lo que favorece las condiciones para la presencia de este patógeno. Se ha documentado plenamente que temperaturas promedio de 35 °C a 37 °C (Juneja et al., 2007) y una alta humedad relativa entre 0.94 y mayores a 0.99 son adecuadas para el desarrollo de *Salmonella* (<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm>).

Recientemente se reportó una incidencia de *Salmonella* del 36.4 % de un total de 1835 muestras de carne de puerco cruda y del 29.9 % de un total de 1733 muestras de carne de res cruda, en los estados de Michoacán, Sonora, San Luis Potosí y Yucatán (Zaidi et al., 2008). Estos porcentajes resultan mayores a los obtenidos para el estado de Michoacán en el presente trabajo, en donde también se encontró una mayor incidencia de *S. enterica* en carne de res cruda en comparación con la carne de cerdo cruda (chorizo). Las diferencias en dichos valores pueden deberse a que en Michoacán

durante varios años se ha llevado a cabo la vigilancia sanitaria de agua y alimentos con éxito, observando una disminución importante a lo largo del tiempo en la contaminación de alimentos de venta al público (G.A. Figueroa Aguilar, comunicación personal, Reporte Anual LESP Michoacán, 2009).

A pesar de que se obtuvo en Michoacán una menor incidencia de *S. enterica* en comparación con otros estados de la República Mexicana (Bello, et al., 1990; Bello y Abarca, 1991; Zaidi et al., 2008), esta incidencia es elevada en comparación con otros países. En Europa, los porcentajes de incidencia en alimentos según datos de la EFSA para el 2008 fueron de 0.7 % en carne cruda de cerdo, 0.2 % en carne cruda de res y menor al 1 % en quesos. Los mayores porcentajes se encontraron en España, en donde se obtuvo un 12.7 % en carne cruda de cerdo, 5 % en carne cruda de res y un 3.1 % en quesos. Por otra parte, los datos del FSIS en Estados Unidos para el 2009, muestran que la incidencia de ésta bacteria es de 2.3 % en carne cruda de cerdo y 2.5 en carne cruda de res. La comparación entre las incidencias por *Salmonella* en otros países de Europa y Estados Unidos reflejan el alto porcentaje de prevalencia de éste patógeno en México, y la necesidad de tomar medidas para disminuir su presencia en los alimentos, ya que son la principal vía de contaminación por salmonelosis en este país (Zaidi et al., 2008; Weisner et al., 2009).

En el presente trabajo se determinaron 34 serotipos invadiendo distintos tipos de alimentos en el estado de Michoacán, mientras que en otros estudios realizados en distintos estados del país se han encontrado 56 serotipos distintos obtenidos tanto de alimentos como de pacientes con cuadros diarreicos en un periodo de 4 años (Zaidi et al., 2008). En otro estudio realizado en México analizaron cepas de *S. enterica* obtenidas de distintas fuentes entre los años 1972 y 1999, en el que determinaron 199 distintos serotipos (Gutiérrez et al., 2000).

En el presente trabajo los serotipos mayoritarios fueron Typhimurium (12.3 % del total de cepas), Anatum (11.5 %) y Agona (8.5 %). Estos resultados coinciden con otros estudios realizados tanto en alimentos como en pacientes con cuadros diarreicos en

México, en donde se ha observado que el porcentaje de Typhimurium con respecto al total de aislados estudiados oscila entre 10.2 % y 22.2 %, de Anatum entre 4.8 % y 17.7% y Agona entre 4.5 % y 9.5 % (Bello et al., 1990; Bello et al., 1991; Gutiérrez et al., 2000; Zaidi et al., 2008; Weisner et al., 2009), esto en el caso de alimentos. En el caso de cuadros diarreicos se han obtenido porcentajes de aislamiento de Typhimurium entre 16% y 31 %, Anatum entre 0.6 % y 8 % y Agona entre 6.6 % y 8.3 % (Gutiérrez et al., 2000; Paniagua et al., 2007; Zaidi et al., 2008; Weisner et al., 2009).

Mediante el análisis RAPD se encontraron 28 genotipos a un nivel de 95% de similitud en la distancia genética calculada. Adicionalmente, el poder discriminatorio, medido como índice de Simpson (D), calculado con el empleo de este tipo de marcador fue de 0.965. Estos resultados son congruentes con lo reportado en la literatura cuando se analizan aislados de *Salmonella* con distintos marcadores genético-moleculares. Por ejemplo, Lim et al. (2005) analizaron 57 cepas encontrando 42 genotipos con marcadores RAPD, mientras que cuando emplean ERIC encuentran 50 tipos genéticos distintos. Al combinar el análisis ERIC y RAPD's, el número de genotipos identificado es de 57. Estos autores obtienen un alto poder discriminatorio mediante las dos metodologías, con un valor de D igual a 0.996 para RAPD's y 0.993 para ERIC's. En otro trabajo realizado con el empleo combinado de RAPD's y ERIC's, detectaron en 12 cepas analizadas 4 genotipos, con un poder de discriminación de ($D = 0.56$) para ambas herramientas de tipificación (Shabarinat et al., 2007).

En estudios adicionales realizados empleando PFGE para la diferenciación de cepas muestran la presencia de 73 genotipos a partir de 99 cepas (Torpdahl et al., 2005), 78 genotipos de 243 cepas (Kotetishvili et al., 2002) y 38 genotipos de 157 cepas (Delgado et al., 2006). Diversos trabajos en los cuales se utilizan RAPD's en combinación con otros marcadores de tipificación, se encuentra que el índice de discriminación se incrementa (Lim et al., 2005; Delgado et al., 2006; Shabarinat et al., 2007). Cuando se calcula la relación número de genotipos/número de aislados analizados, en las referencias antes citadas se obtienen valores que oscilan entre 0.23 (Delgado et al., 2006) y 0.96 (Lim et al., 2005). En el presente trabajo, se obtuvieron 28

genotipos de 130 cepas a los que se les tipificó por RAPD, encontrando una relación genotipos / número de cepas de 0.22, ligeramente por debajo de lo que se ha observado en la literatura.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo empleando marcadores RAPD's, no muestran un patrón de agrupamiento de acuerdo al serotipo, encontrando distintos serotipos dentro de un mismo genotipo. La relación genotipo-serotipo muestra resultados contrastantes en la literatura. El estudio genético con la metodología PFGE de distintos serotipos ha mostrado una relación directa entre el genotipo y el serotipo (Zaidi et al., 2008; Weisner et al., 2009). Esta relación genotipo-serotipo ha sido también documentada cuando se emplean otros marcadores de tipificación genética como REP (Weigel et al., 2004; Rasschaert et al., 2005; Albufera et al., 2009), RAPD's (Hilton et al., 1996; Chansiripornchai et al., 2000; Lim et al., 2005; Shabarinath et al., 2007) y ERIC's (Versalovic et al., 1991; Lim et al., 2005; Shabarinath et al., 2007).

En otros estudios, también se ha documentado que un mismo serotipo puede estar presente en distintos linajes genéticos cuando se generan patrones de agrupamiento basados en los resultados de tipificación obtenidos mediante marcadores RAPD's (Khoodoo et al., 2002), REP (Burr et al., 1998) y, aun, empleando MLST (Torpdahl et al., 2005) y PFGE (Falush et al., 2006; Lan et al., 2009). Estos datos aportan evidencia de que no siempre existe una relación entre serotipo y genotipo.

En nuestros resultados obtuvimos en general a distintos serotipos compartiendo un genotipo. Los datos de identificación del origen de los serotipos principales, y la identificación mediante ensayo RAPD de sus genotipos, permitieron observar la distribución geográfica de los genotipos a lo largo del territorio Michoacano, permitiendo identificar a los genotipos de los serotipos mayoritarios que tienen una amplia distribución en el estado, así como los que por algún motivo se encuentran restringidos a una zona geográfica determinada.

El conocimiento del comportamiento de la distribución de los genotipos de *S. enterica* en el estado es de gran importancia epidemiológica para conocer que tan oscilante es la población en el estado, cuantos genotipos nuevos llegan, cuales permanecen, y cuales son eventuales, además de poder comparar los genotipos identificados en alimentos o muestras ambientales con los identificados en pacientes portadores de *S. enterica* y poder obtener una relación entre los patógenos.

La distribución que presentan los genotipos de los principales serotipos es heterogénea para cada uno. Typhimurium fue uno de los serotipos con mayor diversidad genética con 4 genotipos distintos, en el que se observó una amplia distribución en general, teniendo sólo un genotipo restringido a la zona norte del estado (G1), probablemente esto se deba a la falta de ciertas características específicas que le permitieran a este genotipo una amplia distribución, restringiéndolo a condiciones específicas de esta zona. Anatum fue el serotipo con un mayor número de genotipos (5) que se distribuyen heterogéneamente a lo largo del territorio Michoacano. En el caso de los genotipos de Agona fueron 3, mostrando en dos de sus genotipos una distribución restringida en la región sureste del estado (G1 y G2), y el otro genotipo se dispersó a lo largo del estado, desde Lázaro Cardenas (J-8) hasta la Piedad (J-6) pasando por las jurisdicciones 7 y 5.

X. CONCLUSIONES

Se encontraron 27 serotipos distintos y 7 serogrupos de *S. enterica* contaminando carne de res cruda, chorizo, quesos, ostiones y algunos productos cárnicos cocidos en el estado de Michoacán durante el periodo 2008 – 2009 en un total de 130 cepas aisladas de 8 414 alimentos analizados. Se determinó a Typhimurium, Anatum y Agona como los serotipos mayoritarios aislados en este tipo de alimentos para el estado.

La recuperación de *S. enterica* del total de las carnes de res crudas analizadas para el estado de Michoacán mostró una incidencia de 13.2 %, porcentaje que es menor en comparación con otros estados de la República Mexicana en donde se ha reportado una incidencia de hasta 32.44 %. Sin embargo, resulta mayor cuando se compara con la incidencia por éste patógeno en alimentos en otros países, como por ejemplo Estados Unidos y Europa, en donde se reporta una incidencia en carne de res cruda de 2.5 % y 0.2 % respectivamente.

De igual manera, en carne de cerdo cruda (chorizo) se determinó para el estado de Michoacán una incidencia por ésta bacteria de 10.5 %, siendo menor a lo reportado en otros estudios en México, donde se ha reportado una incidencia de hasta 40.7 %. Por otra parte, el resultado de la presencia de *S. enterica* en chorizos del estado de Michoacán es alta en comparación con lo reportado en Estados Unidos y Europa, en donde reportan una incidencia en éste tipo de productos alimenticios de 2.3 % y 0.7 %.

La incidencia de *S. enterica* en quesos y ostiones en el estado fue menor a 1 %, y coincide en lo reportado para otros países. Para los alimentos cocidos la incidencia de *S. enterica* en el estado fue prácticamente nula, lo que evidencia la importancia del proceso de cocción de los alimentos en su inocuidad.

La tipificación de *S. enterica* mediante ensayo RAPD, ha mostrado un alto poder discriminatorio. Al igual que lo reportado, en el presente trabajo también se obtuvo un alto poder discriminatorio al obtener $D = 0.965$, permitiendo identificar 28 genotipos distintos de las 130 cepas aisladas. A su vez se ha evidenciado la capacidad de esta metodología para poder clasificar a los individuos de esta subespecie a nivel intraserotipos e interserotipos con los primers aquí utilizados, por lo que se esperaba ese tipo de diferenciación en el presente trabajo.

Sin embargo, se obtuvo una agrupación de individuos de *S. enterica* en donde un mismo serotipo se encuentra formando parte de distintos genotipos, es decir, que los serotipos no muestran una relación directa con el genotipo, teniendo a distintos serotipos compartiendo un mismo genotipo. Por otro lado, este resultado concuerda con otros estudios realizados mediante MLST y PFGE para la tipificación de *S. enterica*, en donde se observa a un mismo serotipo compartiendo distintos genotipos.

En el presente trabajo no se observó una relación directa entre el genotipo con respecto al tipo de muestra o lugar de origen, mostrando una correlación muy baja (0.0612) entre el lugar de origen de la muestra y el genotipo en el análisis de coordenadas principales.

El patrón de distribución de los genotipos de los serotipos mayoritarios; Typhimurium, Anatum y Agona, fue en general heterogéneo, mostrando en los 3 genotipos al menos un genotipo que se distribuye a lo largo del territorio Michoacano del sureste al noreste o viceversa, se requieren otros tipos de estudios para definir la direccionalidad del desplazamiento. Por otra parte, se observó una distribución restringida para el caso de algunos genotipos, tal es el caso del genotipo 1 de Typhimurium, que se encuentra establecido en la región norte del estado. A su vez, también el genotipo 1 y 2 de Agona se encuentran restringidos a la zona sureste del estado.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Abdelhalim A H, Eisa I E G and Ahmed A M, 2009. Use of the RAPD-PCR fingerprinting and API system for clustering lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese sour milk (Roab). *Afr J Biotechnol.* 8: 3399 – 3404 pp.
- Aktas Z, Day M, Kayacan, CB, Diren S, Threlfall EJ. 2007. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Antimicrob Agents.* 30: 541–545.
- Arbuzova VA. 1960. Features of reservoirs of *Salmonella* among humans subjects. *J Microbiol Epidemiol Immunol.* 31:1353-1356.
- Bailey JS, Fedorka-Cray PJ, Stern NJ, Craven SE, Cox NA, Cosby DE. 2002. Serotyping and ribotyping of *Salmonella* using restriction enzyme PvuII. *J Food Prot.* 65: 1005–1007.
- Bello LA, Ortiz DM, Pérez E, Castro V. 1990. *Salmonella* en carnes crudas: un estudio en localidades del estado de Guerrero. *Salud Pública de México.* 32: 74 – 79
- Bello LA y Abarca C. 1991. Incidencia de *Salmonella* en chorizos que se expenden en Acapulco, Guerrero. *Salud Pública de México.* 33: 178 – 183.
- Bessa MC, Michael GB, Canu N, Canal CW, Cardoso M, Rabsch W, Rubino S. 2007. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. *Res Vet Sci.* 83:302-310.
- Bhutta ZA. 2008. Typhoid fever. *In* Conn's Current Therapy. Edited by Rakel P, Bope ET. 60th ed. Philadelphia, Pa. *Saunders Elsevier.*
- Bouchet V, Huot H, Goldstein R. 2008. Molecular genetic basis of ribotyping. *Clin Microbiol. Rev.* 21: 262–273.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol.* 38: 2465-2467.
- Burr MD, Josephson KL, Pepper IL. 1998. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Lett Appl Microbiol.* 27: 24–30.

- Busch U, Nitschko H. 1999. Methods for the differentiation of microorganisms. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 7221-2: 263–278.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006. Annual Summary.
- Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, A., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B., 2000. Application of randomly amplified polymorphic DNA RAPD analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Immunol Med Microbiol.* 29: 221–225.
- Creus E, Pérez JF, Peralta B, Baucells F, Mateu E. 2007. Effect of acidified feed on the prevalence of *Salmonella* in Market-age pigs. *Zoonoses and Pub Health* 54: 314 - 319
- Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. 1973. Molecular relationships among the *Salmonella*. *J Bacteriol.* 115: 307–315.
- Crump JA, Luby SP, Mintz ER. 2004. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ.* 82: 346-352.
- Delgado N, Muñoz JL, García MI, Ibañez R, Muñoz S, Serrano R, Sáenz MC , García JA. 2006. Molecular epidemiology of drug-resistant *Salmonella* Typhimurium in Spain. *Rev Esp Quimioterap.* 19: 152 – 160.
- Fakhr MK, Nolan LK, Logue CM. 2005. Multilocus Sequence Typing Lacks the Discriminatory Ability of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol.* 43:2215-2219.
- Falush D, Torpdahl M, Didelot X, Conrad DF, Wilson DJ, Achtman M. 2006. Mismatch induced speciation in *Salmonella* : model and data. *Philos. Trans R Soc Lond Biol Sci.* 361: 2045–2053.
- Figuroa G, González M, Molina A, Yáñez R, Espinoza J, Serna MC, Carranza J. 2005. Identificación de *Salmonella* spp. en agua, melones cantaloupe y heces fecales de iguanas en la huerta melonera. *Med Int Mex.* 21:255-258
- Foley SL, White DG, McDermott PF, Walker RD, Rhodes B, Fedorka-Cray PJ, Simjee S, Zhao S. 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *J Clin Microbiol.* 44: 3569–3577.
- Foley SL, Zhao S, Walker RD. 2007. Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis.* 4: 253–276.

- Food and Drug Administration. 2009. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Salmonella* spp. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm>
- Food Safety and Inspection Service (FSIS). 2009. *Salmonella* Annual Report. http://www.fsis.usda.gov/science/progress_report_salmonella_testing/index.asp
- Food Safety and Inspection Service (FSIS). 2009b. Serotypes Profile of *Salmonella* Isolates from meat and poultry products – January 1988 through December 2008. http://www.fsis.usda.gov/PDF/Serotypes_Profile_Salmonella_2008.pdf#page=79
- Food and Drug Administration (FDA), 2009. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Salmonella* spp. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Foodbornellness/FoodbornellnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm>
- Franciosa G, Tartaro S, Wedell-Neergaard C, Aureli P. 2001. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and noninvasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques. *Appl Environ Microbiol.* 67:1793–1799.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. 2004. Taxonomic outline of prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2da Edición. Release 5.0., Springer-Verlag, New York. pp 79-122.
- Giammanco GM, Mammina C, Romani C, Luzzi I, Dionisi AM, Nastasi A. 2007. Evaluation of a modified single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) technique for subtyping *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Res Microbiol.* 158:10-17.
- Gopal N, Pushpa M, Anil KG. 2010. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella* Typhi strains isolated over a period of two decades. *Infect Gen Evol.* 10: 530 - 536
- Gutiérrez L, Montiel E, Aguilera P, González MC. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en México. *Sal Pub Mex.* 42:490-495
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Pal Electron.* 4, 9 pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

Haysom I, Sharp AK. 2005. Bacterial contamination of domestic kitchen over a 24 hour period. *British Food J.* 107 : 453 -466.

Hilton AC, Banks JC, Penn CW. 1997. Optimization of RAPD for fingerprintin *Salmonella* .*Lett Appl Microbiol.* 24: 243-248.

Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer JJ. 2008. Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC Microbiol.* 8: 178-186.

<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf> (Accesada en Octubre de 2010)

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm> (Accesada en Octubre de 2010)

http://www.fsis.usda.gov/Science/Serotypes_Profile_Salmonella_Isolates/index.asp (Accesada en Octubre de 2010)

<http://www.who.int/salmsurv/activities/en/CountryDatabankAdministrator>:
Susanne Karlsmose: suska@food.dtu.dk
(Accesada en Enero del 2011)

Humphrey TJ, Martin KW, Whitehead A. 1994. Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiol Infect.* 113: 403 – 409.

Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 26: 2465 – 2466.

Juneja VK, Valenzuela MM, Huang L, Gumudavelli V, Subbiah J, Thippareddi H. 2007. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Microbiol.* 24: 328 – 335.

Kam KM, Luey KY, Chiu AW, Law CP, Leung SF. 2007. Molecular characterization of *Salmonella enterica* Serotype Typhi isolates by pulsed-field gel electrophoresis in Hong Kong, 2000–2004. *Foodborne Pathog Dis.* 4: 41–49.

Kaye KS, Kaye D. 2007. *Salmonella* infections (including typhoid fever). In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier.

- Khoodoo MHR, Issack MI, Jaufeerally-Fakim Y. 2002. Serotyping and RAPD profiles of *Salmonella enterica* isolates from Mauritius. *Lett Appl Microbiol.* 35: 146–152.
- Koehn A. 1970. Technical modification of the swarming plate method according to Sven Gard in *Salmonella* diagnosis. *Zentralbl Bakteriologie*. 215: 449 – 455.
- Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris Jr. JG, Sulakvelidze A. 2002. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *J Clin Microbiol.* 40: 1626–1635.
- Lan R, Reeves P, Octavia S. 2009. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect.Genetics Evol.* 9: 996-1005.
- Le Minor L, Popoff MY, Laurent B, Hermant D. 1986. Individualisation D'une septieme sous-espece de *Salmonella* : *S. choleraesuis* subsp. indica subsp. nov. *Annales de l'Institut Pasteur -Microbiologie* 137B: 211–217.
- Lim H, Kyung Hee Lee, Chong-Hae Hong, Gyung-Jin Bahk, Weon Sang Choi. 2005. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. *Int J Food Microbiol.*105:411 – 418
- Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Kapperud G. 2000. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J Clin Microbiol.* 4: 1623–1627.
- Lopes VC, Velayudhan BT, Halvorson DA, Lauer DC, Gast RK, Nagaraja KV. 2004. Comparison of methods for discrimination of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 isolates. *J Vet Res.* 65: 538-43.
- Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. 2004. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS* 11211: 908–929.
- Lynch M, Milligan BG. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol.*3:91-99.
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci. (USA)*95: 3140-3145.

- Malorny B, Bunge C, Helmuth R. 2003. Discrimination of d-tartrate-fermenting and -nonfermenting *Salmonella* enterica subsp. enterica isolates by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 41: 4292–4297.
- Meunier JR, Grimont PA. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol.* 144: 373–379.
- Micheli MR, Bova R, Pascale E, D'Ambrosio E. 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA RAPD method. *Nucleic Acids Res.* 22: 1921–1922.
- Millemann Y, Gaubert S, Remy D, Colmin C. 2000. Evaluation of IS200-PCR and Comparison with Other Molecular Markers to Trace *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Serotype Typhimurium Bovine Isolates from Farm to Meat. *J Clin Microbiol.* 38:2204-2209.
- Mueller UG, Wolfenbarger LL. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol.* 14: 389–394.
- Nayak R, Stewart T, Wang RF, Lin J, Cerniglia CE, Kenney PB. 2004. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *Int J Food Microbiol.* 91: 51–62.
- Nayak R, Stewart-King T. 2008. Molecular epidemiological analysis and microbial source tracking of *Salmonella enterica* serovars in a preharvest turkey production environment. *Foodborne Pathog Dis.* 5: 115–126.
- Otero AA, De la Cruz M, Oyama K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Biol Soc Bot Mex.* 60:85-117.
- Pacheco A, Guth B, Soares K, de Almeida D, Ferreira L. 1997. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O6 isolates based on RAPD. *Microbiol. Lett.* 148: 255 - 260
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA. 1998. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.
- Parry CM. 2004. The treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever in Viet Nam. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 413–422.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6, 288-295.

- Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Res Microbiol.*155: 568–570.
- Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, Heyndrickx M. 2005. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. *J Clin Microbiol.* 43: 3615–3623.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* , and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 3: 59–67.
- Ruiz P, Izquierdo P, Seseña S and Llanos M. 2008. Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol.* 25: 942 – 948.
- Russell JR, Fuller JD, Macaulay M, HatzBG, Jahoor A, Powell W, Waugh R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet.* 95:714-722.
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3ed. Vol. II, Chap. 8, protocol 1.
- Shabarinath S, Sanath Kumar H, Rekha Khushiramani, Indrani Karunasagar, Iddya Karunasagar. 2007. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. *Int J Food Microbiol.*114: 227–233.
- Skibsted U, Baggesen DL, Dessau R, Lisby G. 1998. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and phage-typing in the analysis of a hospital outbreak of *Salmonella enteritidis*. *J Hosp Infect.* 38(3): 207-216.
- Spratt BG. 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Curr Opin Microbiol.*2:312-316.
- Takson JD, Fedorka-Cray PJ, Jackson CR, Headrick M. 2006. Genetic relatedness of a rarely isolated *Salmonella* :*Salmonella enterica* serotype Niakhar from NARMS animal isolate. *J Antimicrob Chemother.* 57: 190-198.
- Tamada Y, Nakaoka Y, Nishimori K, Doi A, Kumaki T, Uemura N, Tanaka K, Makino SI, Sameshima T, Akiba M, Nakazawa M, Uchida I. 2001.

- Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 39: 1057–1066.
- Tauxe RV, Hassan LF, Findeisen KO, Sharrar RG, Blake PA. 1988. Salmonellosis in nurses: Lack of transmission to patients. *J Infect Dis.* 157:370-373.
- Threlfall EJ, Torre E, Ward LR, Davalos-Pérez A, Rowe B, Gibert I. 1994. Insertion sequence IS200 fingerprinting of *Salmonella* Typhi: an assessment of epidemiological applicability. *Epidemiol Infect.* 112: 253-261.
- Toledo M. 2008. Protocolos de control de *Salmonella* en granjas de producción porcino. Tierras de Castilla y León: Ganadería. 146: 85 - 87
- Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 13: 1–46.
- Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, Suh DK, Barber DA, Isaacson RE, White BA. 2004. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. *Vet Microbiol.* 100: 205–217.
- Wiesner M, Zaidi MB, Calva E, Fernández-Mora M, Calva JJ, Silva C. 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* 9: 131.
- Weissfeld AS, McNamara AM, Tesh VL, Howard BJ. Enterobacteriaceae. In: Clinical and Pathogenic Microbiology. Howard BJ, Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC Eds. 2nd ed. Mosby - Year Book Inc., St. Louis MO. 1994:299-336.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- World Health Organization, Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 2001. Formules antigeniques des serovars de *Salmonella*. WHO International Salmonella Center, Institut Pasteur, Paris.

- Yeh KS, Chen TH, Liao CW, Chang CS, Lo HC. 2002. PCR amplification of the *Salmonella* typhimurium fimY gene sequence to detect the *Salmonella* species. *Int J Food Microbiol.*78: 227-234.
- Zaidi MB, López M, Calva E. 2006a. Estudios mexicanos sobre *Salmonella* : epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev Lat Mic* 48: 121-125
- Zaidi MB, McDermott FP, Fedorka-Cray P, Leon V, Canche C, Hubert SK, Abbott J, León M, Zhao S, Headrick M, Tollefson L. 2006b. Nontyphoidal *Salmonella* from Human Clinical Cases, Asymptomatic Children, and Raw Retail Meats in Yucatan, Mexico. *Clin Infect Dis.* 42: 21-28.
- Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-Garcia MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott J, Zhao S. 2008. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg Infect Dis*14:429-435.

12.2 Tabla matriz binaria del oligo 1290

Oligo 1290

PB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50		
2074	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0			
1851	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1304	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	
1169	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0		
1081	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
1000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
838	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
607	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
536	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Oligo 1290

PB	51	52	53	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	73	74	75	76	81	82	84	85	86	87	89	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100											
2074	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1				
1851	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1304	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1081	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1000	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
838	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
607	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
536	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Oligo 1290

PB	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130																					
2074	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1		
1851	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1304	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1169	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1081	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
838	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
607	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
536	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
490	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0</																																									

