



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS:

“VIRULOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Salmonella*
enterica OBTENIDOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS Y
DERIVADOS LÁCTEOS PROVENIENTES DE
MICHOCÁN”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

QFB LUCIA PAULINA MALDONADO RUIZ

Directora de tesis:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS MA.
SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

Co-director de Tesis:

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

Comité tutorial:

D. en C. CARLOS CORTÉS PENAGOS



2015

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL.....	II
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades del Género <i>Salmonella</i>	1
1.1.1 Características bioquímicas.....	1
1.1.2 Clasificación.....	1
1.2 Patología y Epidemiología de <i>Salmonella enterica</i>	2
1.3 Patogenicidad	4
1.4 Identificación de <i>Salmonella enterica</i>	7
1.4.1 Serotipificación	7
1.4.2 Tipificación genético molecular de <i>Salmonella enterica</i>	8
1.4.3 Tipificación mediante la detección de genes asociados a virulencia (virulotipificación).....	10
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. HIPÓTESIS.....	13
4. OBJETIVOS	13
4.1 OBJETIVO GENERAL	13
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. ESTRATEGIA	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Material biológico.....	15
6.2 Extracción de ADN genómico	19
6.3 Amplificación por PCR de los genes de virulencia.....	20
6.4 Asignación de los diferentes perfiles de virulencia.....	21
6.5 Determinación de asociación entre Perfiles de Virulencia con ST y Serotipo	22

6.6 Relación genética entre Perfiles de Virulencia con ST y Serotipo.....	22
7. RESULTADOS	23
7.1 ADN extraído de las cepas de estudio.....	23
7.2. Amplificación por PCR de los genes de asociados a virulencia en las cepas de referencia	23
7.3 Amplificación por PCR de los genes de asociados a virulencia en cepas de estudio	25
7.4 Perfiles de virulencia encontrados en las cepas de estudio.....	26
7.5 Diversidad de Perfiles de Virulencia de acuerdo a la ST	28
7.6 Asociación de Perfiles de Virulencia con ST	31
7.7 Diversidad de Perfiles de virulencia en relación al serotipo.....	32
7.8 Asociación de Perfiles de Virulencia con Serotipo	33
7.9 Distribución geográfica de PV en el estado de Michoacán.....	34
7.10 Análisis de relación genética entre los diferentes Perfiles de Virulencia.....	35
8. DISCUSIÓN	38
9. RESUMEN DE RESULTADOS	44
10. CONCLUSIONES	44
11. ANEXOS	45
11.1 Anexo a. Tabla de contingencia de PV y ST con residuos tipificados corregidos.....	45
11.2 Anexo b. Tabla de contingencia de PV y serotipo con residuos tipificados corregidos	47
12. REFERENCIAS	49

D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS
marisolvaz@yahoo.com

INDICE DE ABREVIATURAS

ADNÁ	cido Desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ARN	Ácido Ribonucleico
°C	Grado Centígrado
dATP	Deoxinucleosido Trifosfato de Adenina
dCTP	Deoxinucleosido Trifosfato de Citocina
dGTP	Deoxinucleosido Trifosfato de Guanina
dTTP	Deoxinucleosido Trifosfato de Timina
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetracético
h	Horas
Kb	Kilobase
LBA	Agar Luria Bertani
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
MLST	Multi Locus Sequence Typing
mM	Milimolar
µL	Microlitro
µM	Micromolar
NaCl	Cloruro de Sodio

NCBI	Centro Nacional de Información para Biotecnología
ND	No determinada
ng	Nanogramo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Electroforesis en geles de campo pulsante
PV	Perfil de Virulencia
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
s	Segundos
SPI	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>
ST	Secuencia Tipo
Tris-HCl	Tris-Ácido Clorhídrico

ÍNDICE DE TABLAS

1. Subespecies del género <i>Salmonella</i>	1
2. Cepas analizadas en este estudio.....	15
3. Iniciadores utilizados en este estudio.....	20
4. Programas de amplificación utilizados para cada uno de los genes estudiados.....	21
5. Perfiles de virulencia encontrados en las cepas de estudio.....	26
6. Perfiles de virulencia en cepas de estudio (ST y serotipo).....	27
7. Tabla de contingencia con residuos tipificados corregidos de STND.....	32
8. Perfiles de virulencia encontrados y frecuencia encontrada en aislados de estudio.....	32
9. Tabla de contingencia con residuos tipificados corregidos de serogrupos que aportan significancia.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

1 . Representacion esquemática de las principales etapas de la infección por <i>S. enterica</i> (Tomado de McGuie <i>et al.</i> , 2009).	6
2. Porcentaje de serotipos de los aislados de <i>Salmonellaenterica</i> utilizados en este estudio.	18
3. Porcentaje de los diferentes serogrupos en los aislados de <i>Salmonellaenterica</i> utilizados en este estudio.	18
4. Porcentaje de aislados de <i>Salmonellaenterica</i> obtenidos de diversos productos cárnicos y derivados lácteos.....	19
5. ADN extraído de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en este estudio.	23
6. Estandarización del ensayo de PCR para los 6 genes de estudio en las cepas de referencia.	24
7. Electroferograma del producto de amplificación del gen <i>sopE</i>	25
8. Amplificación por PCR de los genes asociados a virulencia de las cepas de estudio.	26
9. Frecuencia de los Perfiles de Virulencia dentro de las ST.	29
10. Diversidad y frecuencia de las ST dentro de los Perfiles de Virulencia menos frecuentes.	30
11. Diversidad y frecuencia de las ST dentro de los Perfil de Virulencia menos frecuentes.	31
12. Distribucion geografica en el estado de Michoacan de los PV encontrados por <i>Virulotyping</i> de aislados de <i>Salmonellaenterica</i>	34
13. Dendrograma de relación genética en base a los PV obtenidos en las cepas de estudio.	36

14. Dendrograma de relación fenotípica y genotípica entre cepas de estudio..
..... 37

RESUMEN

Salmonella enterica es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo, el cual se asocia principalmente con la ingestión de alimentos contaminados. El control de la salmonelosis requiere de estrategias de monitoreo que permitan la detección temprana y la tipificación adecuada del agente causal. La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre *S. entérica* en México y en especial en el estado de Michoacán, sólo reportan la incidencia y los serotipos presentes, y aunque se ha iniciado la tipificación genética, no existen estudios sobre genes asociados a virulencia. Los genes asociados a virulencia se encuentran codificados en el ADN bacteriano de *S. enterica* en varias Islas de Patogenicidad (SPI's, por sus siglas en inglés) y sus productos se encuentran involucrados en funciones celulares esenciales como el mecanismo de invasión e infección de la bacteria. Algunos de estos genes son *invA*, *rmbA*, *ssaQ*, *sopB*, *sopE* y *spi4F*, cuya presencia le confieren capacidad invasiva a *S. enterica*, por lo que sus productos son considerados factores de virulencia. La virulotipificación o *virulotyping* es un nuevo esquema de tipificación basado en la detección mediante PCR de genes asociados a virulencia, la cual ha mostrado ser una buena herramienta para la identificación y separación de cepas/clonas del patógeno. Por lo anterior, en este trabajo el objetivo fue identificar genes asociados a virulencia de cepas de *S. enterica* aisladas a partir de productos cárnicos y lácteos del estado de Michoacán. Se analizaron 90 cepas obtenidas durante el periodo 2008-2011. Se amplificaron por PCR los genes *invA*, *rmbA*, *ssaQ*, *sopB* y *spi4F* en cada una de las cepas de estudio. De acuerdo con los patrones de presencia/ausencia de dichos genes se encontraron 8 perfiles de virulencia (PV). No se encontró relación entre el PV y la Secuencia Tipo (ST) de las cepas, determinada en estudios previos. Se encontró relación entre el PV y el serotipo, con un valor de p de 0.000. El PV1 (*invA*, *sopE*, *ssaQ*, *rmbA*, *spi4F* y *sopB*) fue el de mayor distribución geográfica en el estado encontrándose en todas las jurisdicciones sanitarias. Los PV menos frecuentes fueron PV3 (*invA*, *sopE*, *ssaQ*, *rmbA* y *sopB*), PV4, (*invA*, *ssaQ*, *rmbA*, *spi4F* y *sopB*), PV5 (*sopE*, *ssaQ*, *spi4F* y *sopB*), PV6 (*sopE*, *ssaQ*, *rmbA* y *sopB*), PV7 (*invA*, *ssaQ*, *rmbA* y *spi4F*) y PV8 (*invA*, *sopE* y *spi4F*), presentándose solo en una cepa cada uno y en 4 Jurisdicciones sanitarias diferentes (J8, J7, J1 y J3). Los resultados obtenidos muestran que las cepas de *S. enterica* obtenidas de alimentos en el estado de Michoacán presentan genes de virulencia que las hacen de interés en salud pública.

Palabras clave: Virulotipificación, *Salmonella enterica*, virulencia, islas, patogenicidad.

ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the main ethiological agents causing gastrointestinal disease worldwide, and it is mainly associated to the consumption of contaminated meals. Monitoring strategies that allow the early detection of the pathogen are required, as well as the molecular typing of these bacteria. Most of the epidemiological studies about *S. enterica* in Mexico and in the state of Michoacan, are mainly focused on reporting the incidence of the serotypes causing illness, although, there has been recent approaches for molecular typing of *S. enterica*, there are no reports about virulence genes of this pathogen in Mexico. These genes are encoded in different Pathogenicity Islands of Salmonella (SPI), which are located in the chromosome of the bacteria. The products of these genes are involved in essential cellular functions, like the invasion and infection mechanisms of *S. enterica*. The presence of the genes; *invA*, *rmbA*, *ssaQ*, *sopB*, *sopE* and *spi4F*, allow the bacteria to invade, infect and replicate inside the host. *Virulotyping* is a new typing scheme, based on the detection, by PCR, of these virulence genes and it has proven to be an efficient tool for the identification and separation of strains/clones of the pathogen. Therefore, the aim of this study was to identify virulence genes of *S. enterica*, isolated from meat and dairy products in Michoacan. 90 strains obtained during the period of 2008-2011 were analyzed, and 6 virulence genes (*invA*, *rmbA*, *ssaQ*, *sopB* and *spi4F*) were amplified by PCR, in each strain of study. Based on the presence/absence of the genes, 8 different Virulence Profiles were found. No association between Virulence Profile (VP) and Sequence Type (ST) was found. An association between VP and serotype was found, with a p value of 0.000. VP1 (*invA*, *sopE*, *ssaQ*, *rmbA*, *spi4-F* and *sopB*) was the most highly distributed profile in the state. VP3 (*invA*, *sopE*, *ssaQ*, *rmbA* and *sopB*), VP4, (*invA*, *ssaQ*, *rmbA*, *spi4-F* and *sopB*), VP5 (*sopE*, *ssaQ*, *spi4-F* and *sopB*), VP6 (*sopE*, *ssaQ*, *rmbA* and *sopB*), VP7 (*invA*, *ssaQ*, *rmbA* and *spi4-F*) and VP8 (*invA*, *sopE* and *spi4-F*), were the least distributed throughout the state, being found in only one strain each, and located on 4 different jurisdictions of the state of Michoacan (J8, J7, J1 and J3). The results of this study show that strains isolated in the state of Michoacan, carry virulence genes that are relevant for public health.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del Género *Salmonella*

1.1.1 Características bioquímicas

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos que miden 0.7 – 1.5 x 2.5 μm , pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, son anaerobios facultativos, no forman esporas, bioquímicamente se caracterizan por no fermentar lactosa y por la producción de ácido a partir de glucosa, son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer negativo, citrato de Simmons positivo, lisina y ornitina descarboxilasa positivo. También son capaces de reducir los nitratos a nitritos.

1.1.2 Clasificación

El género *Salmonella* se clasifica actualmente en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Tabla 1). *S. enterica* se divide en 6 subespecies (Durango *et al.*, 2004). *Salmonella* es una de las bacterias más complejas de la familia Enterobacteriaceae, con más de 2500 serotipos, establecidos con base en las diferencias en la porción de polisacárido de la capa de lipopolisacárido (antígeno O) y la porción de filamento del flagelo (antígeno H) presentes en la superficie celular de la bacteria (Lavalett *et al.*, 2009). En la actualidad se ha encontrado que el 99% de estos serotipos se encuentran dentro de la especie *S. enterica*, de los cuales la mayoría son patógenos para el humano. Dentro de la subespecie *enterica* encontramos la sub-división en *Salmonella* Tifoidea (responsable de causar fiebre tifoidea) y *Salmonella* no tifoidea.

Tabla 1. Subespecies del género *Salmonella* (Durango *et al.*, 2004)

SUBESPECIE	TAMBIÉN CONOCIDAS COMO
I	<i>S. enterica</i> subespecie <i>enterica</i>
II	<i>S. enterica</i> subespecie <i>salamae</i>
IIIa	<i>S. enterica</i> subespecie <i>arizonae</i>
IIIb	<i>S. enterica</i> subespecie <i>diarizonae</i>
IV	<i>S. enterica</i> subespecie <i>houtanae</i>
V	<i>S. bongori</i>
VI	<i>S. enterica</i> subespecie <i>indica</i>

1.2 Patología y Epidemiología de *Salmonella enterica*

Dentro de los principales patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales, se encuentra *Salmonella enterica*, que es responsable de causar aproximadamente 3 mil millones de infecciones por año a nivel mundial. De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la fiebre tifoidea, causada por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium, suma hasta 22 millones de estos casos y es responsable de 200,000 muertes por año (Cooke *et al.*, 2007).

Las fiebres entéricas se transmiten por la vía fecal-oral, a través de agua o alimentos contaminados y están asociadas a condiciones inadecuadas de higiene y saneamiento. La mayoría de los casos de fiebre tifoidea ocurren en los países en desarrollo, particularmente en la India y el suroeste de Asia, aunque la enfermedad es endémica en otras partes de Asia y África. La enfermedad es comúnmente reportada en el centro y Sudamérica. En el resto de los países en desarrollo es un adicimiento principalmente de viajeros, y se estima una incidencia de 3 a 30 casos por cada 100,000 de ellos (Durango *et al.*, 2004; Raffatellu *et al.*, 2007).

La salmonelosis puede tener manifestaciones clínicas leves, como la gastroenteritis, y graves, como fiebre tifoidea y bacteriemia. Los serotipos que comprenden a la subespecie *enterica* de *Salmonella*, se dividen en dos grupos clínicamente relevantes de acuerdo a la infección que estos producen. Las infecciones causadas por *S. Typhi* y *S. Paratyphi* provocan una infección sistémica invasiva, que a menudo es referenciada como fiebre tifoidea o entérica. Por otra parte, los serotipos de *Salmonella* No Tifoideas (SNT) normalmente son responsables de causar en humanos una gastroenteritis asociada a la inflamación intestinal y diarrea. Sin embargo, en países en desarrollo se ha reportado que hasta un 5% de los casos de SNT, pueden causar enfermedad extra intestinal invasiva complicándose hasta bacteremia e infecciones focales sistémicas. Por otra parte, en África, *Salmonella* no tifoidea invasiva (SNTi) ha sido la principal causa de infección en la sangre, en adultos y niños, con una incidencia estimada de 175-388 casos por cada 100 000 niños y 2000-7500 casos por cada 100 000 adultos infectados por VIH (Raffatellu *et al.*, 2007).

Existen diferentes factores en el hospedero que predisponen al desarrollo de una enfermedad por SNTi, tales como factores genéticos y el estado inmunológico. Sin embargo, debido a que existen ciertos serotipos de SNT que están más inclinados a causar bacteremia

con respecto a otras, como *S. Choleraesuis* y *S. Dublin*, esclarece que las características del patógeno también son altamente importantes (Raffatelu *et al.*, 2007; Suez *et al.*, 2013).

Se han realizado diversos estudios a nivel global sobre la incidencia de los serotipos responsables de causar salmonelosis; estos trabajos han evidenciado que en los últimos 25 años, los serotipos Enteritidis y Typhimurium se han vuelto predominantes en el hemisferio Oriental y Europa, debido en gran parte al consumo de alimentos contaminados de origen animal, que incluyen pollos y huevos (Miko *et al.*, 2005). Diversos factores han sido enumerados para que la salmonelosis, junto con otras enfermedades infecto-contagiosas, represente aún un riesgo para la salud. Entre estos factores se encuentran la globalización, el tráfico de alimentos y la introducción accidental de patógenos en nuevas áreas geográficas. También se han considerado los cambios asociados a las poblaciones microbianas, lo que permite que surjan cepas más virulentas y con resistencia a antibióticos, o con la capacidad de sobrevivir a condiciones adversas (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000).

En México los estudios sobre *Salmonella* y su importancia en salud pública se han enfocado principalmente en registrar la incidencia de ésta en casos de brotes, así como a distinguir los serotipos más frecuentes. En un primer reporte se encontró que el serotipo más comúnmente encontrado en los pacientes ingresados a los servicios de salud pública sin distinción de edad, fue Typhimurium, mientras que el serotipo menos frecuente fue Ohio (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). En un trabajo realizado por Paniagua *et al.* (2007), se encontró que de 300 niños estudiados, los cuales cursaban por un cuadro de diarrea, un 53.5% de estos, estaban asociados a *Salmonella enterica*, encontrándose solo esta bacteria, y en algunos casos en combinación con otros enteropatógenos. En dicho estudio, los serotipos encontrados con mayor frecuencia fueron Ohio (28.3%), Typhimurium (16.3%), Infantis (8%), Anatum (0.6%) y Newport (0.3%). Zaidi y colaboradores (2008) efectuaron uno de los estudios más amplios realizados en México, en el que se incluyeron 4 estados con distintas características socioeconómicas (Sonora, San Luis Potosí, Michoacán y Yucatán), aislando *S. enterica* del 12.3% (2, 893 muestras) de niños menores de 6 años con cuadro de diarrea y del 5.3% de niños asintomáticos (6, 685 muestras). Los serotipos más comúnmente aislados de niños con padecimiento gastrointestinales fueron Typhimurium (22.2%) y Enteritidis (14.5%), encontrándose en menor proporción también los serotipos Agona, Muenchen, Oranienburg,

Anatum, Newport y Meleagridis. En este estudio también se incluyeron algunas muestras de alimentos, en las que se observó cómo serotipo más abundante en carne de res a Anatum (17.7%), seguido del Meleagridis (13%).

1.3 Patogenicidad

En una infección natural por *S. enterica*, ésta es transmitida principalmente por la ingestión de alimentos o agua contaminada, o por el contacto con algún vehículo contaminado. Luego de la ingesta de una carga bacteriana suficiente, una proporción del inóculo sobrevive al ambiente de pH bajo del estómago; para así pasar al intestino delgado donde se establece la infección. Existe evidencia que muestra que algunas cepas de *S. enterica* tienen preferencia por invadir las células M localizadas en los micropliegues del intestino delgado. Las células M son células epiteliales especializadas que muestran el contenido antigénico del intestino delgado. Luego de que el patógeno penetra la barrera epitelial, preferentemente infecta fagocitos localizados en la lámina propia. En la gastroenteritis causada por *S. enterica* la infección suele ser auto limitante y no procede más allá de la lámina propia. Sin embargo, en la salmonelosis en la que la bacteria se ha adaptado al hospedero, como en el caso de la fiebre tifoidea, los fagocitos infectados llegan hasta el torrente linfático y sanguíneo, utilizándolos como vehículos para diseminarse a hígado, bazo y también en la vesícula biliar y la médula ósea (Ruby *et al.*, 2012; Tischler y McKinney, 2010).

S. enterica ha desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir en tipos específicos de células. Su habilidad para infectar todos y cada uno de los tejidos, incluyendo al cerebro, son testimonio de su éxito como patógeno. Además, *S. enterica* también tiene la capacidad de defenderse del sistema inmune innato y adaptativo del hospedero (Lahiri *et al.*, 2010).

La diversidad genómica de las cepas bacterianas se debe en gran parte a la ganancia de funciones a través de la transferencia horizontal de genes (Lawrence, 2005). El ADN adquirido que contiene genes relacionados funcionalmente se denomina Isla Genómica (IG). Las IGs que codifican para genes de virulencia se denominan Islas de Patogenicidad (IPs) y su presencia en el genoma de las bacterias patógenas las distingue de las altamente relacionadas cepas no patógenas (Gal-Mor y Finlay, 2006).

El conocimiento de la secuencia completa del genoma ha permitido la identificación y caracterización de muchos genes implicados en la patogénesis de *S. enterica*. Esto ha revelado

quedichabacteriaha presentado transferencia horizontal de genes, por lo que ha adquirido ciertas IPs. Estos elementos genéticosayudan a la bacteria a invadir, replicarse y esparcirse dentro del ambiente restringido del hospedero. La secuenciación del genoma, reveló varios genes de virulencia con un papelimportante en la patogénesis. Así, se ha documentado que tanto la invasión como la supervivencia intracelular están mediadas por al menos 60 genes cromosómicos de virulencia, codificados en varias islas de patogenicidad (Lahiri *et al.*, 2010). En *S. enterica* se han identificado 21 IPs, a las cuales se les ha denominado de manera genérica SIP (Sabbagh *et al.*, 2010)además de la isla genómica 1 (SIG1) (Akiba *et al.*, 2006) y la isla de alta patogenicidad (HIP) (Petermann *et al.*, 2008). Las SIPs juegan un papel muy importante en la patogénesis (Hensel, 2004) y la especificidad del huésped (Baumler, 1998).Los sistemas de secreción tipo tres I (T3SSI) y sistemas de secreción tipo tres II (T3SSII), localizados en las islas de patogenicidad SPI1 y SPI2, respectivamente, codificanpara proteínas efectoras bacterianas que son secretadas dentro de la célula del hospedero. Estas proteínas de virulencia sabotean los procesos celulares del hospedero tales como la transducción de señales y el tráfico a través de la membrana. Se ha reportado que la SPI1, estápresente tanto en*S. enterica*como en*S.bongori* y es requerida para la invasión de células no fagocíticas (Lahiri *et al.*, 2010); mientras que la SPI2, solo se encuentra en *Salmonella enterica*. Los genes *sopE*, *avrA*, *invA*, *invH*, *sipA*, *sipB*, *sipC*, *sipD*, entre otros,están localizados en SPI1, y son estos genes a los que se les ha atribuido principalmente, el éxito de penetración de la bacteria en la celula epitelial, como es el caso del gen *invA* y *sopE* a los cuales se ha demostrado ser responsables de la modificación en el citoesqueleto de actina de la celula epitelial para favorecer el proceso de invasión de la bacteria(Graziani *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011). Por otro lado, los genes *ssaQ*,*rmbA*, *spi4-F*, *sopB*, localizados en las Islas de Patogenicidad 2 a la 5(SPI2-SPI5),se han asociado a replicación intracelular y el crecimiento en el interior de las células epiteliales y macrófagos para el establecimiento de la enfermedad sistémica; así como también a la supervivencia en un bajo medio ambiente de Mg^{+2} dentro de los macrófagos durante la fase sistémica, a la enteropatogénesis, al proceso de secreción de fluido y el reclutamiento de neutrófilos, así como también a la supervivencia intracelular en el macrófago (Khoo *et al.*, 2009), y se requieren para la supervivencia intracelular de la bacteria y su patogénesis sistémica (Lahiri *et al.*, 2010; Moest y Méresse, 2013).

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

S. enterica logra entrar a las células no fagocíticas por medio de la formación de pliegues en la membrana ricos en actina, que conllevan a la internalización de la bacteria a la célula hospedera, lo que eventualmente lleva a la formación de una vacuola que contiene alpatógeno, denominada SCV. La supervivencia y la replicación de *S. enterica* dentro de la vacuola, están determinadas en parte por la translocación de proteínas efectoras codificadas por la SPI2, la cual es requerida para la infección sistémica (Fig. 1). Se han encontrado varias proteínas efectoras codificadas en las SPI1 y SPI2, las cuales son responsables de las modificaciones del citoesqueleto de actina de las células del hospedero (Lilic y Stebbins, 2004; McGuie *et al.*, 2009).

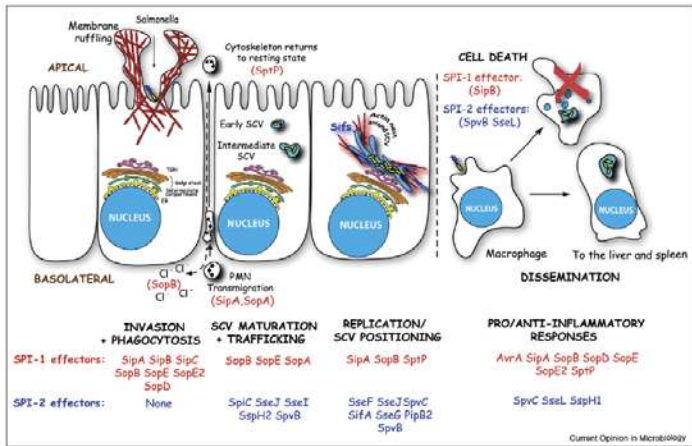


Figura 1. Representación esquemática de las principales etapas de la infección por *S. enterica* (Tomado de McGuie *et al.*, 2009).

Aunque se sabe de la existencia de hasta 21 islas de patogenicidad diferentes, poco se conoce de las funciones de las proteínas para las cuales sus genes codifican. Dentro de las SPI más estudiadas se encuentran la SPI1 y SPI2, cuya presencia se ha asociado con la capacidad de la bacteria para penetrar eficazmente en el epitelio intestinal, inducir la apoptosis en los macrófagos y la secreción de cloruro. Se ha reportado que dentro de las primeras 5 islas de patogenicidad se encuentran los genes que codifican para los principales mecanismos de invasión e infección. Los genes localizados en la SPI3 se asocian principalmente a supervivencia en un bajo medio ambiente de Mg^{+2} dentro de los macrófagos durante la fase de

la enfermedad sistémica, mientras que la SPI4 se ha asociado a la replicación intracelular en el macrófago, al igual que la SPI5 así como a la enteropatogenesis, secreción de fluido y el reclutamiento de neutrófilos (Khoo *et al.*, 2009).

Por otro lado, existen genes asociados a virulencia que se encuentran fuera del DNA cromosómico, como es el caso del gen *spvC*, el cual se encuentra en el plásmido pSLT asociado a virulencia. La diversidad del genoma de *S. enterica* también está relacionada con la adquisición de plásmidos que le confieren una ventaja selectiva, vía resistencia antimicrobiana y/o expresión de virulencia. La característica común de los *loci* localizados en plásmidos de virulencia de dicho patógeno, es que juegan un papel importante tanto de resistencia antimicrobiana como en la expresión del fenotipo de virulencia de ésta. Se ha reportado la presencia de dicho plásmido en cepas del serotipo Typhimurium y se ha asociado con la supervivencia intracelular de *S. enterica* con la infección sistémica (Bugarel *et al.*, 2011).

1.4 Identificación de *Salmonella enterica*

La identificación de *S. enterica* tanto en muestras clínicas como en muestras de alimentos se hace inicialmente con la inoculación y el cultivo de la muestra en medios selectivos, seguido de la realización de pruebas bioquímicas para la detección del género *Salmonella*; luego de estos ensayos se realizan pruebas de serotipificación mediante el empleo de antiseros, procesos que pueden llegar a tardar varios días. Dichas técnicas tradicionales, han sido complementadas mediante el empleo de ensayos enfocados en la identificación de marcadores moleculares, los cuales están basados principalmente en la PCR.

1.4.1 Serotipificación

Uno de los métodos de tipificación más usados para *Salmonella enterica*, es la serotipificación basada en el esquema Kaufmann-White que reconoce 46 antígenos O y 119 antígenos H, los cuales han permitido la caracterización de 2,541 serotipos. Es un método ampliamente utilizado con fines epidemiológicos, que identifica las serovariedades prevalentes en cada región y la etiología de brotes e infecciones en humanos y animales. La variación del antígeno O de *Salmonella* es consecuencia de la diversidad genética dentro de un grupo de genes, los cuales codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis y el ensamble de este

antígeno. La detección de estos antígenos es la base de la serotipificación con antisueros específicos, de los cuales se derivan las fórmulas antigénicas que caracterizan a cada serogrupo y serotipo (Lavalett *et al.*, 2009). La gran diversidad de antígenos se debe en parte a las modificaciones genéticas que ocurren en genes relacionados con la translocación del antígeno de superficie; un ejemplo de esto es la proteína WZX, la cual es característica del grupo de antígenos O y es codificada por el gen *wzx*. Esta proteína es una flipasa utilizada para la translocación del antígeno fuera de la membrana, diferentes mutaciones en este gen alteran la actividad de dicha proteína, lo que a su vez altera la translocación del antígeno a la superficie bacteriana.

Aunque la serotipificación es un método ampliamente utilizado en estudios epidemiológicos con buen poder discriminatorio, presenta limitaciones tales como la necesidad de más de 250 tipos de antisueros diferentes. Los antisueros comerciales son costosos, con disponibilidad limitada y calidad variable para los antígenos menos comunes. Por otra parte, la generación de los resultados toma de tres a cinco días, y aproximadamente 5 a 8% de los aislamientos son parcialmente tipificados, debido a que existen cepas rugosas que no expresan antígenos en la superficie, encapsuladas, y otras que no expresan los antígenos flagelares de las fases (Lavalett *et al.*, 2009).

1.4.2 Tipificación genético molecular de *Salmonella enterica*

Diferentes características bioquímicas y fenotípicas han sido utilizadas para la investigación epidemiológica de *S. enterica*. Más que la caracterización fenotípica, es requerido un método discriminatorio a nivel genético. Es un hecho que los métodos de tipificación genético molecular, basados en las diferencias entre las secuencias de ADN, son esenciales para el estudio epidemiológico de las serovariedades patógenas de dicho patógeno. Los genes de mantenimiento (*housekeeping*) en las bacterias fueron ampliamente utilizados para la tipificación molecular y se caracterizan por el análisis de los polimorfismos en los *loci* bien definidos, encontrados en el genoma de la bacteria, los cuales se amplifican por medio de la reacción de PCR para posteriormente realizar una secuenciación de estos productos de amplificación (Fendri *et al.*, 2013).

Diversos estudios de tipificación molecular han sido desarrollados para el análisis epidemiológico de *S. enterica*, incluyendo la amplificación de fragmentos polimórficos

(AFLP), la electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE) y el Multi Locus Sequence Typing (MLST).

La PFGE es actualmente el método considerado “estándar de oro” usado por los laboratorios de vigilancia epidemiológica, pertenecientes a la PULSENET, para la caracterización de cepas de *Salmonella enterica*. El protocolo de PFGE estandarizado por la CDC, no solo está establecido para la determinación de relaciones genéticas entre cepas de *S. enterica*, sino también para otras enterobacterias, como *Shigella* y *E. coli*. Es un método que se basa principalmente en el empleo de endonucleasas que cortan el ADN en sitios de restricción específicos, que pueden ser frecuentes o poco frecuentes, dependiendo de las enzimas empleadas. Esto genera fragmentos de ADN de distintos tamaños, los cuales se visualizan mediante una electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE), lo que permite una mejor resolución de los fragmentos y genera patrones de bandeo diferentes para cada cepa, es decir, una huella o patrón único para cada uno de los serotipos encontrados de *S. enterica* (Wiesner *et al.*, 2009).

La principal ventaja de la técnica de PFGE es su poder alto de discriminación (habilidad para distinguir cepas no relacionadas) para la tipificación de la mayoría de los serotipos de *Salmonella*, lo que le permite ser una buena herramienta para comprender mejor la epidemiología molecular de la bacteria. Sin embargo, la PFGE carece de poder discriminatorio para serotipos altamente clonales como *S. Enteritidis*. Por otra parte, se han encontrado grandes grupos clonales mediante PFGE, donde se observa un 98% de homología, entre cepas que presentan distinto serotipo (CDC 2007). Adicionalmente, la PFGE no provee de información adecuada para hacer inferencias filogenéticas entre serotipos. Por último, diversos autores mencionan la complejidad y el tiempo de desarrollo de la técnica, lo que limita su empleo y la generación rápida de resultados durante la aparición de brotes (CDC 2007 y Liu *et al.*, 2011).

El MLST es una herramienta muy aceptada para el estudio de la estructura de la población, evolución y la diversidad bacteriana, ya que detecta diferencias en secuencias de nucleótidos en varios *loci* de ADN, generando datos altamente informativos, manejables y reproducibles (Liu *et al.*, 2011). Esta técnica está basada en las diferencias de alelos encontrados debido a cambios en las secuencias de nucleótidos de los genes de mantenimiento de cepas bacterianas de la misma especie (Wiesner *et al.*, 2009). La tipificación de cepas

mediante MLST se considera un patrón estable en el tiempo, que puede ser almacenado y compartido a escala global (Achtman *et al.*, 2012).

1.4.3 Tipificación mediante la detección de genes asociados a virulencia (virulotipificación)

Recientemente, un nuevo esquema de tipificación basado en la detección de genes asociados a virulencia mediante ensayos de PCR, ha mostrado ser una buena herramienta para determinar la capacidad de una cepa para causar enfermedad y la severidad de la misma. Dicho ensayo se basa en la identificación de genes asociados a virulencia, por lo que ha sido designado como virulotipificación (*virulotyping*, en inglés). Este esquema de tipificación se basa en la presencia o ausencia de algunos de estos genes, localizados en diferentes IPs, y en base a las combinaciones de patrones de presencia o ausencia de dichos genes se obtienen los diferentes perfiles de virulencia (PV).

Existen estudios de identificación de genes de virulencia en *S. enterica* en los cuales se obtienen diferentes perfiles de virulencia y se busca alguna asociación de estos con algún serotipo en particular. Así, en aislados del serotipo Bovismorbificans se encontraron 5 de los genes asociados a virulencia (*avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *spi4* y *sopB*), codificados en las islas de patogenicidad 1 a 5 (SPI1- SPI5). Uno de los genes buscados que no se encontraban codificados en islas de patogenicidad, si no en un plásmido asociado a virulencia (*spvC*), se identificó en el 80% de las cepas estudiadas (88/110) (Nógrády *et al.*, 2010). Un estudio reciente reveló que en diferentes aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de distintos tipos de alimentos, había una prevalencia del 100% de los genes: *hilA*, *hilC*, *orgA*, *ttrB*, *misL*, *rhuM*, *rmbA*, *pipB*, *pipD*, *sopD* y *sdhA*; seguidos de *mgtC*, *orfL* y Spi4-F (99%); *sifA* (98%); *hilD* y *sopB* (97%); *ssrB* (95%); *hilA* y *pipA* (94%) y *sopE* (83%). Todos estos genes están codificados en las islas de patogenicidad 1 a 5 (SPI1- SPI5). Dentro de las serovariedades que contaban con una prevalencia del 100% de los genes antes descritos, se encontraron a *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi* y *S. Enteritidis* (Khoo *et al.*, 2009).

Se ha realizado un intento para asociar un perfil de virulencia con un genotipo determinado. En dicho trabajo se llevó a cabo, la tipificación de cepas de *S. enterica* por medio de PFGE, todas del serotipo Napoli, provenientes de humano y distintos animales, evidenciando cierta relación entre un genotipo y un perfil de virulencia (PV). En este

estudio se buscaron 10 genes asociados a virulencia con la finalidad de encontrar alguna relación genotipo/perfil de virulencia, al igual que una relación huésped/ubicación geográfica (Graziani *et al.*, 2001). Al realizar PFGE en las 111 cepas estudiadas, se obtuvieron 7 grupos clonales diferentes, considerándose del mismo grupo clonal con un 80% de similitud en base al patrón de bandeo generado por PFGE, dentro de estas mismas cepas, se encontraron 10 perfiles de virulencia diferentes, los cuales se asignaron con base en las combinaciones de genes asociados a virulencia encontrados en cada cepa. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas que pertenecían a los grupos clonales A, B, C y D, presentaban mayor prevalencia de los PV 1, 2 y 3. Además se encontró una relación entre estos patrones y el tipo de muestra; es decir; para el grupo clonal A las cepas que caían dentro del PV1, provenían principalmente de muestras humanas y ambientales, mientras que del mismo grupo clonal pero con PV2, todas las cepas provenían de muestras humanas (Graziani *et al.*, 2001).

A la fecha no existen reportes en los que se haya intentado asociar un perfil de virulencia (PV) con una secuencia tipo (ST); aunque trabajos recientes han revelado que existen ciertas ST que albergan islas genómicas (IG) específicas que favorecen un mecanismo de virulencia particular, como es el caso de la ST313. Existen trabajos en donde se ha vinculado a *S. Typhimurium* ST313 con infección invasiva. En un estudio realizado por Herrero-Fresno y colaboradores (2014), se demostró que la ausencia del gen *st313-td*, en la isla genómica encontrada en las cepas de ST313 (ST313-GI), causaba una disminución significativa en la supervivencia intracelular de *S. enterica*. Por lo tanto, el gen *st313-td* parece codificar para un factor que favorece la supervivencia intracelular, habilidad esencial para la virulencia de dicho patógeno, ya que es una bacteria facultativa intracelular. En este estudio se encontró que otras cepas de diferente ST a la 313 (ST328 y ST19) también contenían al gen *st313-td*, sin embargo no se detectó la presencia de toda la ST313-GI, sugiriendo la transferencia horizontal del gen *st313-td*. Mientras que la ST313 se ha encontrado circulando principalmente en África, la ST19 es la secuencia tipo de *S. Typhimurium*, más comúnmente identificada y globalmente predominante. Ambas STs están circulando simultáneamente en Kenya y esta co-circulación probablemente permitió el intercambio genético entre estas cepas, lo que podría explicar la propagación del gen *st313-td* a otros grupos clonales (Herrero-Fresno *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Aunque *S. enterica* ha sido reconocida como causa de enfermedad de tracto digestivo por muchos años y los métodos de control están bien establecidos, este patógeno aparece como la primera causa reportada de enfermedades por contaminación alimentaria en el mundo, ocasionando brotes diarreagénicos. Por lo que éste patógeno tiene un impacto importante tanto en la economía como en el sector salud.

En México, los estudios sobre *Salmonella enterica* y su importancia en Salud Pública se han enfocado principalmente a registrar la incidencia de ésta en casos de diarrea, así como a distinguir los serotipos más frecuentes.

En Michoacán nuestro grupo de trabajo ha iniciado estudios de tipificación genético-molecular de *Salmonella enterica* encontrada en alimentos (Regalado-Pineda, 2011; Vázquez-Narváez, 2012; Inocencio-Velázquez, 2013). Dentro de los serotipos descritos, Typhimurium, Agona y Anatum, que comprenden a los más frecuentes en el estado de Michoacán, se encontraron 23 ST diferentes, observándose ST exclusivas del serotipo Typhimurium, así como ST nuevas, no reportadas en las bases de datos globales. Los resultados de dichos estudios han mostrado que no existe una ST asociada a una región geográfica específica dentro del estado. Esto mismo se ha observado para el caso de los serotipos más frecuentes, a los cuales se les ha detectado mayor adquisición de genes asociados a virulencia en otras partes del mundo. Por lo anterior, es necesario ampliar la información genética sobre éstos aislados, particularmente en relación a la posible presencia de dichas regiones genéticas asociadas a patogenicidad y virulencia. Los datos de virulotipificación de las cepas de *S. enterica* obtenidas de Michoacán permitirán conocer el potencial patogénico y el riesgo que pueden representar en términos de salud pública. Al mismo tiempo, la comparación sobre la presencia/ausencia de regiones genéticas asociadas al potencial para causar enfermedad y su posible severidad, ayudará a establecer a un nivel más fino las relaciones genéticas entre los aislados de estudio. Adicionalmente, será posible establecer correlaciones entre la presencia de genes de virulencia en un aislado con su procedencia geográfica, el serotipo y el genotipo, todo lo cual contribuye a entender la dinámica de dispersión de *S. enterica* en alimentos en el estado de Michoacán. Dado lo anterior, es de esperar que la información genético molecular generada en el presente trabajo ayude a optimizar los sistemas de vigilancia epidemiológica para establecer estrategias

de prevención y control de las enfermedades ocasionadas por *S. enterica* al ingerir alimentos contaminados en Michoacán.

3. HIPÓTESIS

El perfil de virulencia de cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos del estado de Michoacán, se relaciona de manera positiva con la secuencia tipo y el área geográfica de procedencia, pero no presenta correlación alguna con el serotipo.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación de los perfiles de virulencia con los genotipos obtenidos por diferentes sistemas de tipificación y la procedencia geográfica de cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos en el estado de Michoacán.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar la presencia de genes asociados a virulencia en las cepas de estudio.
- Generar un esquema para la asignación de perfiles de virulencia (PV) a cepas de *S. enterica*.
- Establecer la posible relación entre el PV y el genotipo obtenido por otras técnicas de tipificación de *S. enterica*.
- Evaluar la posible relación entre el PV obtenido y el área geográfica de procedencia de las cepas de estudio.

5. ESTRATEGIA



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

En este trabajo se utilizaron 90 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de productos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán, por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán, durante los años 2008-2011. La información de las cepas que incluyen serotipo, región y tipo de muestra de donde fueron aislados, fue proporcionada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán (Tabla 2), (Inocencio-Velázquez, 2013). Se utilizaron como controles, las cepas de referencia; *S. enterica* serotipo Typhimurium (ATCC 14028), *S. Typhi* (CDC99) y *S. Typhimurium* ATCC 700720. Pon las cepas de referencia que hayas usado.

Tabla 2. Cepas analizadas en este estudio.

AISLADO	SEROTIPO	PRODUCTO	MUNICIPIO	AÑO
2	Anatum	Ch	Morelia	2009
4	Typhimurium	QF	Ciudad Hidalgo	2009
5	Anatum	QF	La Piedad	2009
10	Serogrupo B	CR	Pastor Ortíz	2009
13	Serogrupo B	CR	Uruapan	2009
15	Anatum	CR	Ciudad Hidalgo	2009
16	Typhimurium	CR	Morelia	2009
17	Anatum	CR	Morelia	2009
21	Typhimurium	Ch crudo	Lázaro Cárdenas	2009
22	Anatum	Ch	Apatzingán	2009
24	Typhimurium	Ch	Lázaro Cárdenas	2009
26	Agona	Ch	Apatzingán	2009
28	Typhimurium	Ch	Uruapan	2009
29	Anatum	CC	Morelia	2009
32	Serogrupo B	Ch	Pátzcuaro	2009
38	Serogrupo B	CR	Uruapan	2008
39	Typhimurium	CR	Apatzingán	2008
40	Agona	CR	Lázaro Cárdenas	2008
43	Anatum	Ch	Lázaro Cárdenas	2008
44	Anatum	CR	Uruapan	2008
45	Anatum	CR	Huetamo	2008
47	Serogrupo B	CR	Lázaro Cárdenas	2008

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

48	Serogrupo C1	CR	Lázaro Cárdenas	2008
49	Serogrupo 35	CR	Uruapan	2008
53	Anatum	CR	Lázaro Cárdenas	2008
54	Typhimurium	CR	Tacámbaro	2009
56	Anatum	CR	Morelia	2009
62	Agona	Ch	Yurécuaro	2009
65	Agona	CR	Mújica	2008
67	Serogrupo B	QF	Zacapu	2008
68	Serogrupo D	CR	Lázaro Cárdenas	2009
69	Typhimurium	CR	Lázaro Cárdenas	2009
70	Serogrupo E1	Ch	Lázaro Cárdenas	2009
75	Serogrupo B	CR	Zamora	2009
81	Agona	CR	Lázaro Cárdenas	2008
84	Anatum	Ch	Uruapan	2008
86	Agona	Ch	Apatzingán	2008
89	Typhimurium	Ch	Charo	2008
90	Agona	Ch	Apatzingán	2008
96	Typhimurium	CR	Zamora	2008
97	Serogrupo B	CR	Lázaro Cárdenas	2009
99	Serogrupo C1	CR	Lázaro Cárdenas	2008
100	Serogrupo E1	L	Zitácuaro	2008
107	Serogrupo I	Ch	Lázaro Cardenas	2008
109	Typhimurium	CR	Zamora	2009
112	Agona	CR	Lázaro Cárdenas	2009
113	Serogrupo B	CR	Lázaro Cárdenas	2009
115	Typhimurium	QA	Tanhuato	2009
116	Typhimurium	QP	Tanhuato	2009
125	Serogrupo B	Ch	Uruapan	2009
127	Typhimurium	CR	La Piedad	2008
132	Agona	Ch	Morelia	2010
133	Anatum	CR	Lázaro Cárdenas	2010
139	Anatum	QF	Tuxpan	2010
141	Serogrupo E4	QF	Tepalcatepec	2010
144	Typhimurium	Ch	Lázaro Cárdenas	2010
146	Agona	Ch	Apatzingán	2010
149	Agona	CR	Huetamo	2010

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

151	Anatum	PC	Guacamayas	2010
153	Serogrupo E1	Ch	Morelia	2010
155	Anatum	CR	Zamora	2010
156	Agona	CR	Angamacutiro	2010
157	Serogrupo B	CR	Lázaro Cárdenas	2010
160	Serogrupo E1	CC	Yurécuaro	2010
161	Agona	L	Zamora	2010
167	Serogrupo B	Ch	Zamora	2010
169	Serogrupo E4	CC	Huetamo	2010
178	Serogrupo B	CC	Pátzcuaro	2010
180	Serogrupo C1	CR	Morelia	2010
185	Agona	Pccido	Parácuaro	2011
188	Anatum	QA	Lázaro Cárdenas	2011
191	Serogrupo C1	Ch	Pastor Ortíz	2011
193	Serogrupo B	Ch	Uruapan	2011
196	Typhimurium	Ch	Pátzcuaro	2011
200	Serogrupo B	CR	Morelia	2011
201	Serogrupo D	CR	Lázaro Cárdenas	2011
202	Serogrupo D	CR	Lázaro Cárdenas	2011
203	Anatum	CR	Morelia	2011
208	Anatum	CR	Morelia	2011
213	Serogrupo B	CC	Zitácuaro	2011
214	Serogrupo B	CR	Ocampo	2011
224	Serogrupo B	L	Zamora	2011
223	Serogrupo B	CR	Purépero	2011
227	Serogrupo B	CR	Mújica	2011
228	Serogrupo E4	P	Mújica	2011
229	Anatum	CR	Lázaro Cárdenas	2011
231	Agona	CR	Lázaro Cárdenas	2011
233	Serogrupo B	CC	Tuxpan	2011
234	Anatum	CR	Morelia	2011
236	Serogrupo B	CC	Ciudad Hidalgo	2011

Clave: QF: Queso Fresco, CR: Carne de Res, CC: Carne de Cerdo, Ch: Chorizo, L: Longaniza, QA: Queso Asadero, P: Pollo, QP: Queso Panela.

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

Del total de 90 aislados de *Salmonella enterica*, 21 corresponden al serotipo Anatum, 16 al serotipo Typhimurium y 15 al serotipo Agona, la mayor proporción de aislados corresponden a cepas no serotificables (monofásicas), confirmados únicamente a nivel de serogrupo, que corresponden a 38 aislados de los aquí estudiados (Fig.2).

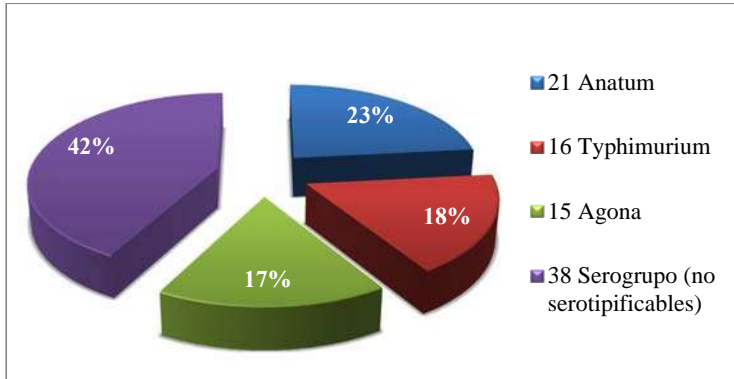


Figura 2. Porcentaje de serotipos de los aislados de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio.

De los 38 aislados confirmados a nivel de serogrupo, se encontraron 7 serogrupos diferentes, dentro de los cuales, el serogrupo B, fue el que se encontró en mayor proporción con 23 aislados, seguido del serogrupo E1 con 4 aislados, de los serogrupos E4, C1 y D con 3 aislados cada uno y por último los serogrupos 35 e I, con un aislado cada uno (Fig.3).

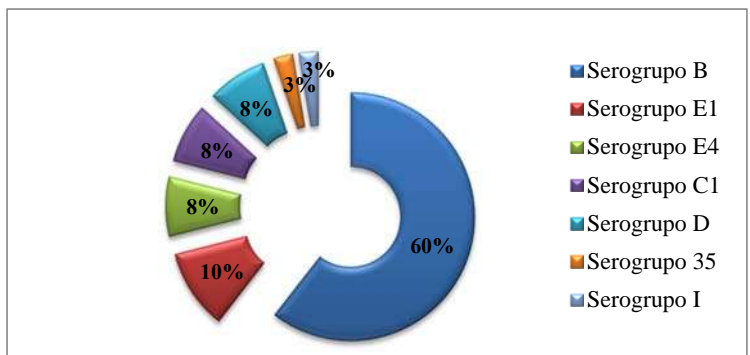


Figura 3. Porcentaje de los diferentes serogrupos en los aislados de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio.

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

Las cepas se aislaron de derivados lácteos y de diversos productos cárnicos, tanto cocinados como crudos (Fig.4).

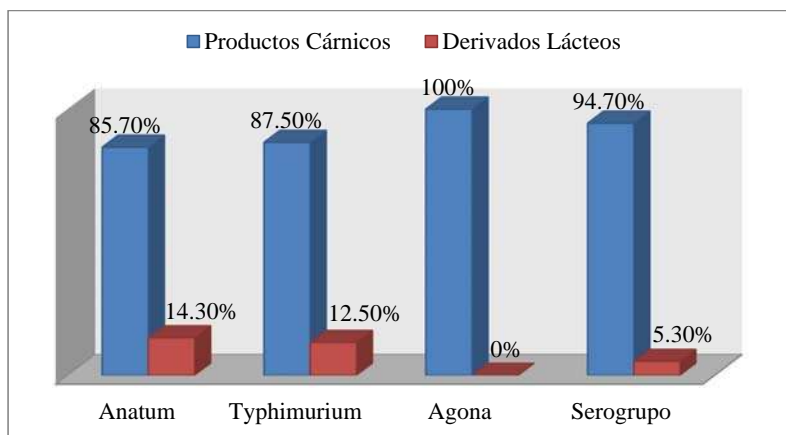


Figura 4. Porcentaje de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de diversos productos cárnicos y derivados lácteos.

6.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001) el cual se describe a continuación. Las colonias bacterianas se crecieron en agar LB sólido y se cosecharon con ayuda de una espátula previamente esterilizada, se colocaron en un microtubo de 1.5 mL y se agregaron 400 μ L de buffer de lisis (Tris-HCl 100mM pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100mM, EDTA 50mM). Las muestras fueron agitadas vigorosamente en vórtex durante 10 min. A continuación se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo (400 μ L), centrifugando durante 5 min a 1500 x g y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El ADN obtenido se precipitó con 1 volumen de isopropanol frío, incubando 10 min a -20°C y centrifugando durante 10 min a 1500 x g. El sobrenadante se desechó y la pastilla (pellet) se lavó 2 veces con 250 μ L de etanol 70% dejándose secar a temperatura ambiente para finalmente ser resuspendido en el volumen mínimo de agua, aproximadamente 20 μ L. Las muestras se trataron con RNAasa (Bio-Rad, USA) incubando a 37 °C por 1 h. La integridad del ADN obtenido se visualizó mediante

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001). El ADN aislado se guardó a -20°C hasta su utilización.

Las imágenes de los geles se obtuvieron empleando un fotodocumentador CHEMI-DOC Molecular viewer (Bio-Rad, USA).

6.3 Amplificación por PCR de los genes de virulencia

Para la optimización de las condiciones de amplificación de los genes *invA*, *rmbA*, *sopB* y *spi4F*, se utilizó el ADN de la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, para el gen, *ssaQ*, la cepa *Salmonella* Typhi CDC99 y para el gen *sopE*, se tomaron como referencia las cepas de estudio 100 y 84. Las reacciones de PCR contenían 0.2 µM de cada uno de los iniciadores (Tabla 3), 0.2mM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Invitrogen, USA), 10 mM de Tris-HCl (pH 8.2), 1.5 mM de MgCl₂, 0.75 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen, USA) y de 30 a 100ng de ADN en un volumen total de 15 µl.

Tabla 3. Iniciadores utilizados en este estudio

Gen e Islas de patogenicidad	*Clave	Oligonucleótidos Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Fuente
<i>sopE</i>	SPI1-F	ATTGTTGTGGCGTTGGCATCGT	†186	Zou <i>et al.</i> , 2011
	SPI1	AATGCGAGTAAAGATCCGGCCT		
<i>invA</i>	SPI1.1-F	GCTGCGCGCAACGGCGAAG	389	Ziemer <i>et al.</i> , 2003
	SPI1	TCCCGGCAGAGTTCCCAT		
<i>ssaQ</i>	SPI2-F	GAATAGCGAATGAAGAGCGTCC	†455	Huehn <i>et al.</i> , 2010
	SPI2	CATCGTGTTATCCTCTGTGAGC		
<i>rmbA</i>	SPI3-F	AGCCTTCACAAATTGTCCATTG	454	Zou <i>et al.</i> , 2011
	SPI3	TCCGTATAGTTAAGCGTTCGTC		
<i>spi4-F</i>	SPI4-F	GTATCATAACCGACACCATTGC	711	Khoo <i>et al.</i> , 2009
	SPI4	CTGCCGTACCGACTAAAAGC		
<i>sopB</i>	SPI5-F	GATGTGATTAATGAAGAAATGCC	1170	Khoo <i>et al.</i> , 2009
	SPI5	GCAAACCATAAAACTACACTCA		

*F: iniciador directo, R: iniciador reverso.

†Tamaños de productos de amplificación reportados en la literatura, diferentes a los obtenidos de manera experimental.

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp 2700 (Applied Biosystems, USA) con los programas más adelante descritos (Tabla 4), los cuales se obtuvieron en base a las condiciones mencionadas en las referencias antes señaladas, mismas que fueron modificadas para optimizar la amplificación del producto buscado. Todos los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001) y las imágenes de los geles fueron capturadas con el sistema ChemiDOC (BioRad, USA).

Tabla 4. Programas de amplificación utilizados para cada uno de los genes estudiados.

Gen	1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>invA</i>	95°C / 5 min	95°C / 30 s	63°C / 30 s	72°C / 30 s	72°C / 5min
<i>ssaQ</i>	95°C / 1 min	95°C / 30 s	58°C / 30 s	72°C / 30 s	72°C / 4min
<i>rmbA</i>	94°C / 5 min	94°C / 30 s	58°C / 30 s	72°C / 30 s	72°C / 5min
<i>spi4-F</i>	94°C / 5 min	94°C / 1 min	56°C / 1min	72°C / 1min	72°C / 5min
<i>sopB</i>	94°C / 5 min	94°C / 1 min	60°C / 1min	72°C / 1min	72°C / 5min
Gen	1 ciclo	25 ciclos			1 ciclo
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>sopE</i>	94°C / 5 min	94°C / 30 s	58°C / 30 s	72°C / 30 s	72°C / 5min

6.4 Asignación de los diferentes perfiles de virulencia

Los perfiles de virulencia se asignaron con base en las combinaciones posibles de los 6 genes buscados, creando una matriz binaria. Cuando un gen no se encontraba presente en una cepa se asignó un valor de cero, cuando se encontraba presente se asignó un valor de 1. Obteniendo un total de 64 combinaciones diferentes, en función de la presencia o ausencia de estos genes.

6.5 Determinación de asociación entre Perfiles de Virulencia con ST y Serotipo

Para las asociaciones entre Perfil de Virulencia con Secuencias Tipo y Serotipo, se utilizó la prueba estadística de Chi Cuadrada de Pearson, considerando como asociación positiva cuando el valor de p es igual o menor a 0.05 utilizando el programa estadístico informático SPSS versión 20.0.

6.6 Relación genética entre Perfiles de Virulencia con ST y Serotipo

Para determinar la relación genética entre los perfiles de virulencia, se realizaron dendrogramas, utilizando la matriz descrita con anterioridad. Se consideraron además características fenotípicas como el serotipo y serogrupo de las cepas. Para la construcción de árboles se utilizó el programa FreeTree versión 0.9.1.50 (Pavlieek *et al.*, 1999), en el cual se calcularon las distancias genéticas a partir de la matriz binaria empleando el algoritmo de Nei y Li; con la matriz de distancias genéticas generada se construyó el patrón de agrupamiento mediante el criterio UPGMA. Para la visualización de los dendrogramas se utilizó el software TreeView versión 1.6.6 (Page, 1996) y para la edición de éstos se utilizó el paquete MrEnt versión 2.5 (Zucon y Zucon, 2013).

7. RESULTADOS

7.1 ADN extraído de las cepas de estudio.

Se extrajo el ADN de las 90 cepas de *Salmonella enterica* de las cuales se disponía de la información de serotipo/serogrupo y secuencia tipo. El ADN extraído en todos los aislados fue de alto peso molecular (Fig.5).

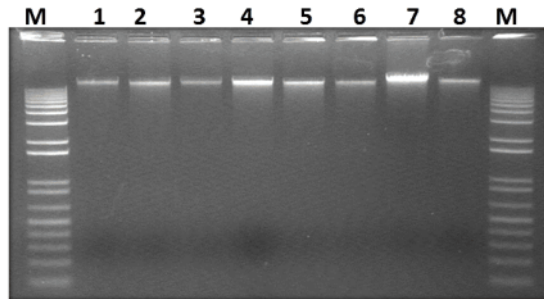


Figura 5. ADN extraído de las cepas de *Salmonella enterica* en este estudio.

Gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA); 1-8 ADN obtenido de diferentes aislados de *Salmonella enterica*.

7.2. Amplificación por PCR de los genes de asociados a virulencia en las cepas de referencia

Se amplificaron los seis genes con el ADN de las cepas de referencia *S. enterica* serotipo Typhimurium (ATCC 14028), Typhi (CDC99) y la cepa de estudio número 100, obteniéndose amplicones con el peso molecular esperado para cuatro genes (Tabla 3, Fig. 6). Para dos de los genes, *sopE* y *ssaQ*, de la isla 1 y 2 respectivamente, no se obtuvieron los tamaños de amplicon reportados en la literatura. Debido a lo anterior, se llevó a cabo una PCR *in silico* utilizando la herramienta en línea *in silico PCR amplification* (San Millán *et al.*, 2013) utilizando como DNA molde el de la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium ATCC 700720, que se encuentra reportada en GenBank y los iniciadores indicados en la tabla 3 para los genes *sopE* y *ssaQ*. Los fragmentos obtenidos en el ensayo de PCR *in silico* fueron de 376pb para el gen *sopE* y de 644pb para el gen *ssaQ*, lo que concordó con los resultados experimentales obtenidos mediante PCR punto final, para la cepa de estudio 100 (Fig. 6b y 6c).

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

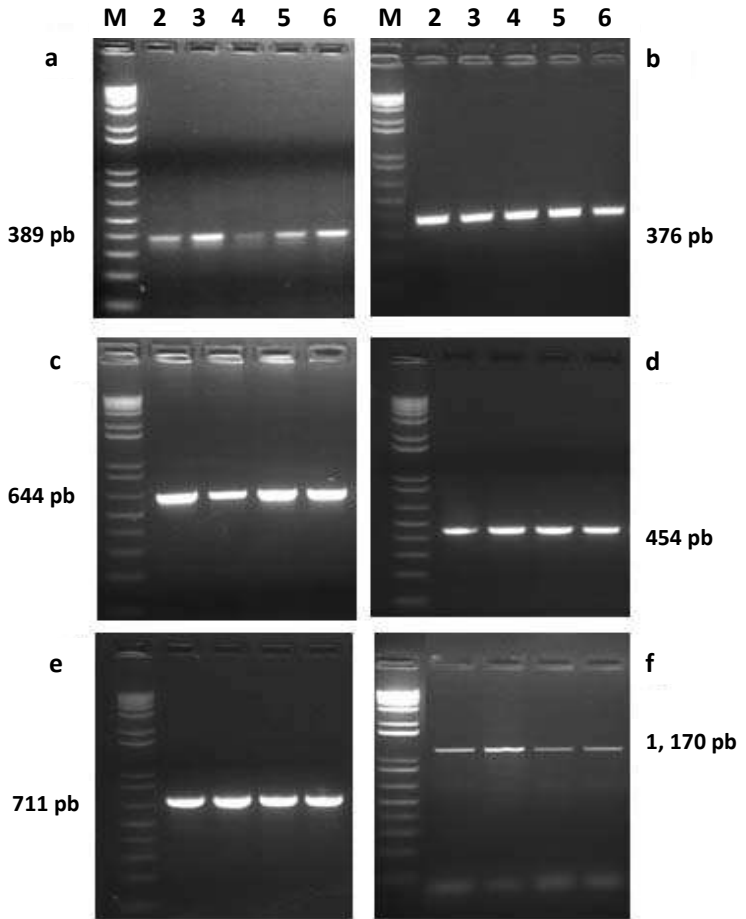


Figura 6. Estandarización del ensayo de PCR para los 6 genes de estudio en las cepas de referencia. Gels de agarosa al 2% (p/v) teñidos con bromuro de etidio. Carriles M de cada imagen: marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA). **a)** Gen *invA*, carriles 2-6 gradiente de temperatura de 56°C a 64°C. **b)** Gen *sopE*, carriles 2-6 gradiente de temperatura de 56°C a 64°C. **c)** Gen *ssaQ*, carriles 2-5 gradiente de temperatura de 54°C a 60°C. **d)** Gen *rmbA*, carriles 2-5 gradiente de temperatura de 54°C a 60°C. **e)** Gen *spi4F*, carriles 2-5 gradiente de temperatura de 54°C a 60°C. **f)** Gen *sopB*, carriles 2-5 gradiente de temperatura de 54°C a 60°C.

Para el gen *sopE* se tomó como referencia la cepa de estudio número 100, con la cual se estandarizaron las condiciones de amplificación (Fig.6b). Se obtuvo la secuencia del fragmento de amplificación. El electroferograma presentó buena calidad de resolución,

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

definición y nitidez de picos (Fig.7). El procedimiento de secuenciación se realizó por duplicado, resultando exactamente en la misma secuencia, que al comparar con la base de datos arrojó una similitud del 100% con la región correspondiente en los genomas de *Salmonella enterica* ya reportados.

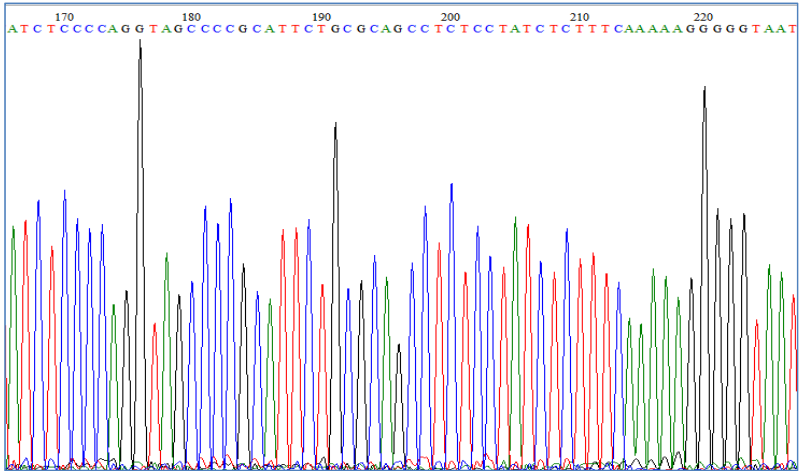


Figura 7. Electroferograma del producto de amplificación del gen *sopE*.

7.3 Amplificación por PCR de los genes de asociados a virulencia en cepas de estudio

Con las condiciones de reacción ya estandarizadas se realizó la amplificación por PCR de los 6 genes asociados a virulencia en las 90 cepas de estudio (fig.8).

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

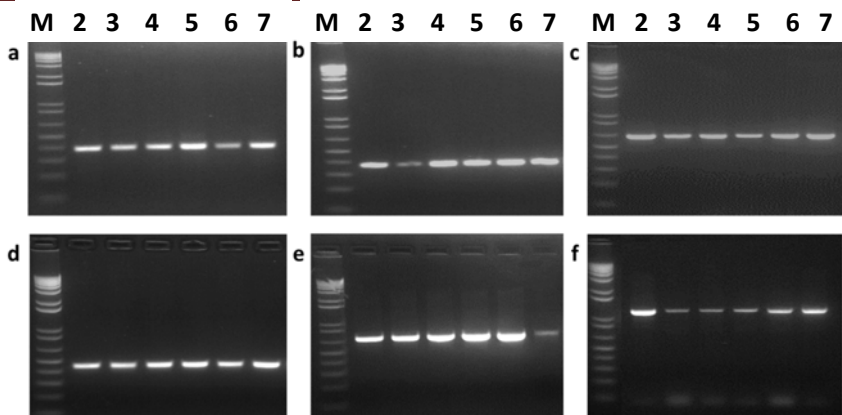


Figura 8. Amplificación por PCR de los genes asociados a virulencia de las cepas de estudio. Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Carriles 1 de cada imagen: marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (invitrogen, USA.) Carriles 2-7 cepas de estudio 2,4,5,10,13,15. **a)** *invA*, **b)** *sopE*, **c)** *ssaQ*, **d)** *rmbA*, **e)** *spi4F* **f)** *sopB*.

7.4 Perfiles de virulencia encontrados en las cepas de estudio

Se asignaron los perfiles de virulencia (PV), en función de la presencia o ausencia de los 6 genes asociados a virulencia (Tabla 5). Con base en las combinaciones obtenidas, se asignaron 8 perfiles de virulencia diferentes (1 al 8) en las 90 cepas analizadas.

Tabla 5. Perfiles de virulencia encontrados en las cepas de estudio

Perfil de Virulencia (PV)	Combinación de genes						Numero de Aislados	% total de aislados
	<i>invA</i>	<i>sopE</i>	<i>ssaQ</i>	<i>rmbA</i>	<i>spi4-F</i>	<i>sopB</i>		
1	1	1	1	1	1	1	79	87.8
2	1	1	1	1	1	0	5	5.5
3	1	1	1	1	0	1	1	1.1
4	1	0	1	1	1	1	1	1.1
5	0	1	1	0	1	1	1	1.1
6	0	1	1	1	0	1	1	1.1
7	1	0	1	1	1	0	1	1.1
8	1	1	0	0	1	0	1	1.1

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

Con un total de 79 aislados, el perfil de virulencia 1(PV1) fue el que se presentó con mayor frecuencia(87.8%)El PV2 con un total de 5 aislados, es el que ocupa el segundo lugar en frecuencia (5.5%), seguido de los PV3, PV4, PV5, PV6, PV7 y PV8, los cuales se presentaron con una frecuencia de 1.1%(Tabla 6).

Tabla 6. Perfiles de virulencia en cepas de estudio (ST y serotipo)

ST	Serotipo	No. de aislados	<i>invA</i>	<i>sopE</i>	<i>ssaQ</i>	<i>rmbA</i>	<i>spi4-F</i>	<i>sopB</i>	PV
13	Agona	9	1	1	1	1	1	1	1
	Agona	1	1	1	1	1	1	1	3
14	Serogrupo 35	1	1	1	1	1	1	1	1
	Serogrupo E4	1	1	1	1	1	1	1	1
19	Typhimurium	1	1	1	1	1	1	1	1
40	Serogrupo B	12	1	1	1	1	1	1	1
	Serogrupo B	1	1	1	1	1	1	1	4
	Anatum	3	1	1	1	1	1	1	1
	Agona	1	1	1	0	0	1	0	8
	Serogrupo E1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	Serogrupo D	1	1	1	1	1	1	0	2
64	Anatum	13	1	1	1	1	1	1	1
	Anatum	2	1	1	1	1	1	1	2
	Agona	1	1	1	1	1	1	1	1
	Serogrupo B	1	1	1	1	1	1	1	1
65	Serogrupo C1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	Serogrupo B	2	1	1	1	1	1	1	1
112	Serogrupo B	1	1	1	1	1	1	1	1
118	Serogrupo B	1	1	1	1	1	1	1	1
	Serogrupo E1	1	1	1	1	1	1	1	1
142	Serogrupo C2	1	1	1	1	1	1	1	1
155	Serogrupo E1	1	1	1	1	1	1	1	1
213	Typhimurium	13	1	1	1	1	1	1	1
	Typhimurium	1	1	1	1	1	1	1	2
	Agona	1	1	1	1	1	1	1	1
	Anatum	1	1	1	1	1	1	0	2
292	Typhimurium	1	1	1	1	1	1	1	1
321	Serogrupo C1	2	1	1	1	1	1	1	1
329	Anatum	1	1	1	1	1	1	1	1
440	Serogrupo B	1	1	1	1	1	1	1	1
447	Serogrupo B	1	1	1	1	1	1	1	1

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

463	Agona	1	1	1	1	1	1	1	1
	Serogrupo E1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Serogrupo B	1	1	1	1	1	1	1	1
588	Serogrupo B	1	1	1	1	1	1	1	1
	Serogrupo E4	1	1	1	1	1	1	1	1
592	Agona	1	1	1	1	1	1	1	1
1674	Serogrupo D	2	1	1	1	1	1	1	1
ND	Serogrupo I	1	0	1	1	0	1	1	5
	Serogrupo E4	1	1	0	1	1	1	0	7
	Anatum	1	0	1	1	1	0	1	6

7.5 Diversidad de Perfiles de Virulencia de acuerdo a laST

Al realizar el análisis comparativo de los PV y las ST, se observó que el PV1 se encontró presente en la mayoría de las ST, con excepción de la ST48 y las No Determinadas (ND), encontrándose en mayor proporción dentro de la ST40, ST64, ST213 y ST13, siendo estas ST las que presentaron mayor diversidad de PVs, al igual que los aislados de secuencia tipo ND, que incluye 3 PVs distintos (Fig. 9).

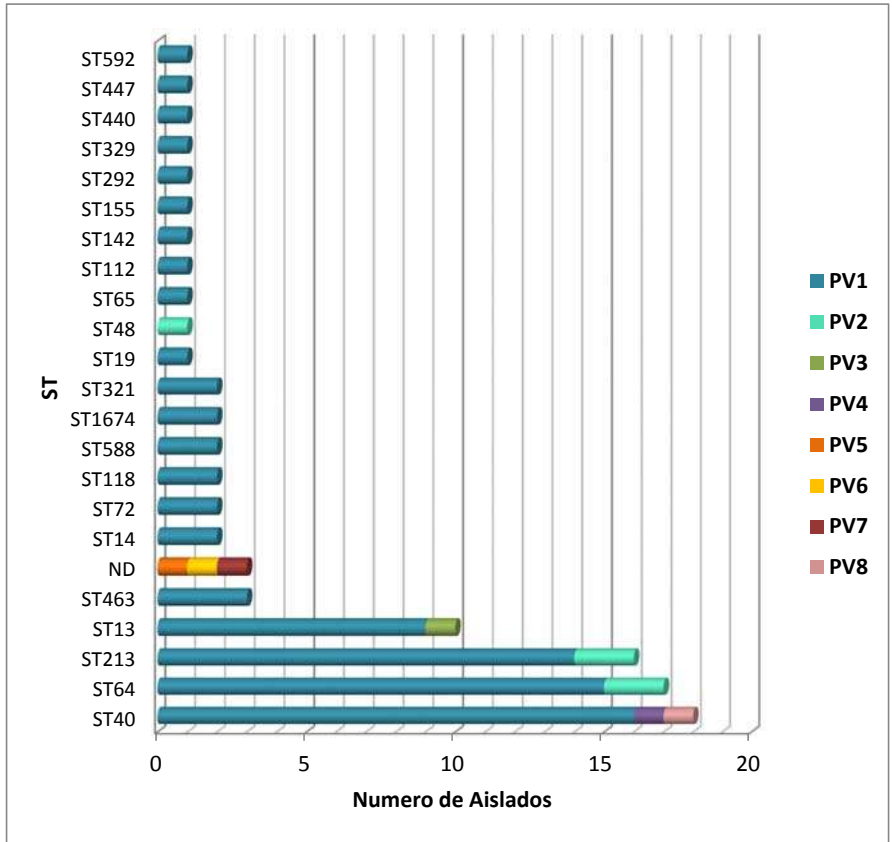


Figura 9. Frecuencia de los Perfiles de Virulencia dentro de las ST.

Se realizó el análisis de la diversidad de ST dentro de PV1 y se observó que dentro de este perfil, se encontraban 21 Secuencias Tipo diferentes, encontrándose con una mayor frecuencia la ST40 con un total de 16 aislados, seguido de la ST64 con un total de 15 aislados, ST213 con un total de 14 aislados y ST13 con un total de 9 aislados. La ST463 presentó un total de 3 aislados y el resto de las ST se presentaron con una frecuencia de 2 y 1 aislado en el PV1 (Fig.10).

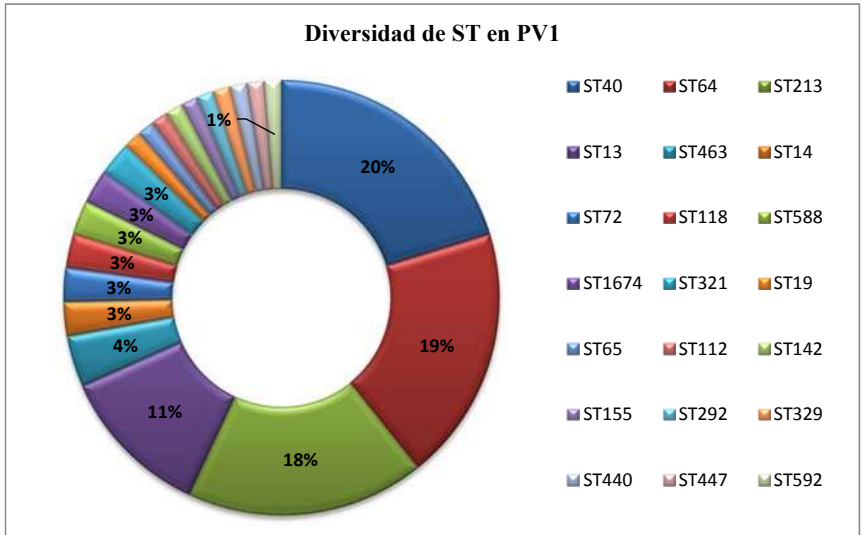


Figura 10. Diversidad y frecuencia de las ST dentro de los Perfiles de Virulencia menos frecuentes.

Se realizó el análisis de STs y Perfiles de Virulencia 2, 3, 4 y 5 de manera independiente. El PV2 se presentó con un total de 5 aislados siendo estos, de 3 ST diferentes. Dentro de las ST que presentaron mayor diversidad de Perfiles de Virulencia, se encontró a las ND presentando 3 perfiles distintos (Fig. 11).

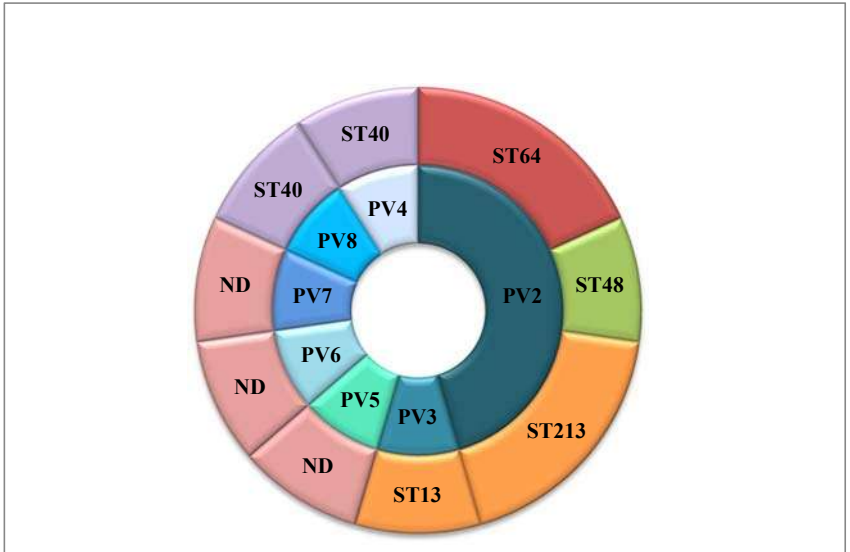


Figura 11. Diversidad y frecuencia de las ST dentro de los Perfil de Virulencia menos frecuentes.

7.6 Asociación de Perfiles de Virulencia con ST

Para determinar si existía una asociación entre los Perfiles de Virulencia y las Secuencias Tipo, se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba Chi cuadrada de Pearson. Se encontró que la diferencia entre las variables comparadas fue grande, dando un valor de p de 0.932. Se realizó el cálculo de residuos tipificados corregidos para determinar entre qué combinaciones de atributos se produce una dependencia, en el que valores absolutos por encima de dos, representan un cruce con diferencia estadísticamente significativa, en caso de independencia entre variables (Anexo a); donde se destacan los porcentajes totales representativos de cada ST por PV. Mediante dicho análisis se observó que cuando las STND, presentaban los perfiles de virulencia; 5, 6 y 7 estas tenían un valor de residual de 5.4. En segundo lugar se observó a las ST48 (PV2), ST13 (PV3) y ST40 (PV4 y PV8), con un valor de residual tipificado de 4.1, 2.8 y 2.0 respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla de contingencia con residuos tipificados corregidos de STND.

ST	PV								Total	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
ND	Recuento	0	0	0	0	1	1	1	0	3
	% del total	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	1.1%	1.1%	0.0%	3.3%
	Residuos corregidos	-4.7	-4	-2	-2	5.4	5.4	5.4	-2	

7.7 Diversidad de Perfiles de virulencia en relación alserotipo

Al realizar el análisis de la diversidad de PV encontradospor serotipo, se observó que la mayor proporción de aislados correspondientes a las cepas confirmadas a nivel de serogrupo caen dentro del PV1, y que dentro de los perfiles encontrados con menor frecuencia (PV3, PV4, PV5, PV6 PV7 y PV8) se encontraban tanto aislados identificados a nivel de serogrupo como aislados del serotipo Anatum y Agona, mas no del serotipo Typhimurium. Dentro de las cepas que tuvieron mayor diversidad de PVs, se encontraron las cepas identificadas hasta serogrupo, con 5 PV diferentes y el serotipo que presentó menor diversidad de PVs fue el serotipo Typhimurium, ya que 15 de los 16 aislados pertenecen al mismo PV (Tabla 8).

Tabla 8. Perfiles de virulencia encontrados y frecuencia encontrada en aislados de estudio.

PV	Perfiles y combinación de genes invA, sopE, ssaQ, rmbA, spi4-F, sopB	Número (%) de aislados			
		Serogrupo	Anatum	Typhimurium	Agona
1	1-1-1-1-1-1	34 (88)	17 (81)	15 (94)	13 (86)
2	1-1-1-1-1-0	1 (3)	3 (14)	1 (6)	0
3	1-1-1-1-0-1	0	0	0	1 (7)
4	1-0-1-1-1-1	1 (3)	0	0	0
5	0-1-1-0-1-1	1 (3)	0	0	0
6	0-1-1-1-0-1	0	1 (5)	0	0
7	1-0-1-1-1-0	1 (3)	0	0	0
8	1-1-0-0-1-0	0	0	0	1 (7)
Total de aislados		38	21	16	15
Combinaciones de PVs		5	3	2	3

7.8 Asociación de Perfiles de Virulencia con Serotipo

Al realizar en análisis estadístico utilizando la prueba de Chi cuadrada de Pearson para determinar la relación entre Perfiles de Virulencia y serotipo, se observó que la diferencia entre las variables comparadas fue pequeña dando como resultado un valor significativo (p de 0.000). Se realizó el cálculo de residuos tipificados corregidos para determinar cuáles fueron los datos específicos que aportan esa significancia (Anexo b), en donde se puede observar los porcentajes totales correspondientes a un serotipo con respecto a los PVs, así como también los residuos tipificados corregidos de cada dato. En los casos específicos con valores de residual tipificado mayor a dos, destacan las cepas del serogrupo I, cuando estas pertenecen al PV5, con un residuo de 9.5, seguido de las cepas del serogrupo E4, cuando estas pertenecen al PV7, con un residuo de 5.4, seguido de los serotipos Agona (VP8), Anatum (PV2) y Serogrupo D (PV2), con valores de residuos tipificados corregidos de 2.2 2.0 y 2.1 respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla de contingencia con residuos tipificados corregidos de serogrupos que aportan significancia.

Serotipo		PV								Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Agona	Recuento	13	0	1	0	0	0	0	1	15
	% del total	14.4%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	16.7%
	Residuos corregidos	-1	-1.0	2.2	-4	-4	-4	-4	2.2	
Anatum	Recuento	17	3	0	0	0	1	0	0	21
	% del total	18.9%	3.3%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	23.3%
	Residuos corregidos	-1.1	2.0	-6	-6	-6	1.8	-6	-6	
Serogrupo D	Recuento	2	1	0	0	0	0	0	0	3
	% del total	2.2%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%
	Residuos corregidos	-1.1	2.1	-2	-2	-2	-2	-2	-2	
Serogrupo E4	Recuento	2	0	0	0	0	0	1	0	3
	% del total	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	3.3%
	Residuos corregidos	-1.1	-4	-2	-2	-2	-2	5.4	-2	
Serogrupo I	Recuento	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	% del total	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	-2.7	-2	-1	-1	9.5	-1	-1	-1	

7.9 Distribución geográfica de PV en el estado de Michoacán

Al colocar cada perfil de virulencia y aislado de estudio en el mapa del estado de Michoacán de acuerdo al lugar de procedencia de cada uno de los aislados analizados, se observa el patrón de distribución de los PV en la entidad (Fig.12). El municipio de Lázaro Cárdenas posee la mayor diversidad de PV, con un total 4 perfiles de virulencia diferentes, seguido por el municipio de Morelia con un total de 3 perfiles diferentes. En los municipios de Apatzingán, Huetamo, Mujica y Tuxpan se encontraron 2 perfiles de virulencia diferentes por cada municipio. El resto de los municipios de los que se contaba aislado, correspondían al PV1 con excepción del municipio de Charo, el cual presentó únicamente al PV2.

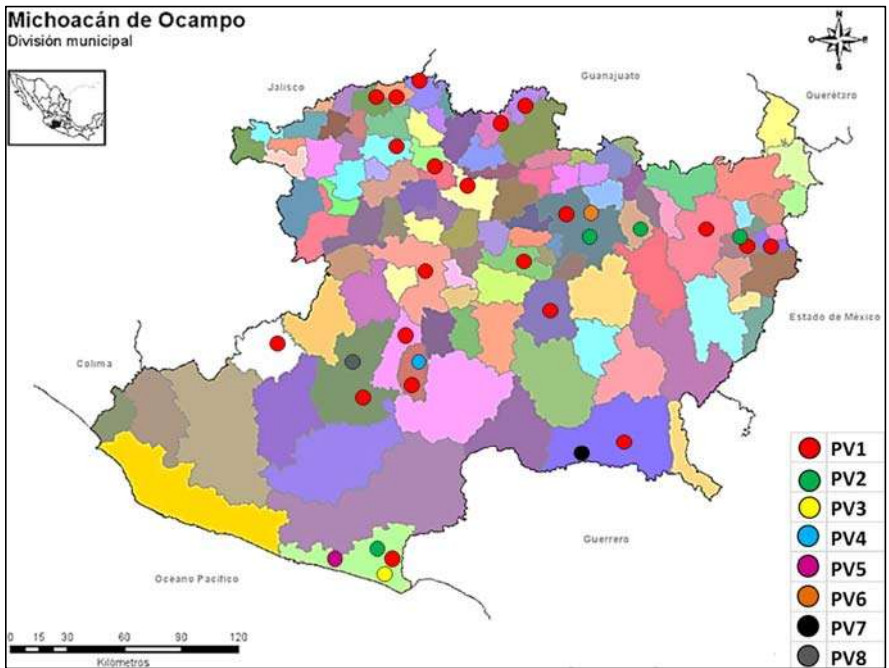


Figura 12. Distribución geográfica en el estado de Michoacán de los PV encontrados por *Virulotyping* de aislados de *Salmonella enterica*.

7.10 Análisis de relación genética entre los diferentes Perfiles de Virulencia

Se construyó un dendrograma partir de la matriz binaria generada con base en la presencia y ausencia de los 6 genes estudiados dentro de las cepas de estudio. Considerando únicamente las características genotípicas de las cepas, se generó un primer dendrograma donde se observó la formación de 8 clados diferentes correspondientes a los 8 PV asignados, encontrándose en un solo clado a 79 aislados con el PV1 (Fig. 13). Los primeros 6 clados formados por una cepa cada uno de diferente procedencia, diferente serotipo y de secuencias tipo ST40, STND Y ST13. En el clado7 se agruparon 79 aislados de los cuales 43% corresponden a las cepas No serotificables, 22% al serotipo Anatum 19% serotipo Typhimurium y 16% serotipo Agona. En el clado 7 se observaron 5 cepas de diferente procedencia, serotipos Typhimurium y Anatum y serogrupo D, con secuencias tipo ST213, ST64 y ST48 (Fig. 13).

Con la intención de ver si se obtenía un patrón de agrupamiento más fino, que mostrara un mayor número de grupos, se generó un dendrograma incluyendo al serotipo o serogrupo del aislado. Este análisis arrojó una mayor resolución en el árbol para distinguir relaciones entre cepas, observándose agrupamientos en base a serotipos. Al considerar las características fenotípicas y genotípicas se generó un dendrograma con 8 clados (Fig. 14). Los clados 1 al 4, constituidos por 1 aislado cada uno, (PV8, PV6, PV5 y PV7) corresponden a los serotipos Agona, Anatum y 2 aislados No serotificables. El clado 5(rojo) constituido por 36 cepas, todas de PV1, corresponden a las cepas No serotificables, el clado 6 (rosa) constituido por 16 cepas, con PV1 y PV2, corresponden al serotipo Typhimurium. El clado 7 (verde) constituido por 14 cepas, con PV3 y PV1 corresponden al serotipo Agona y el clado8(azul), constituido de 20 cepas, con PV1 y PV2 corresponden al serotipo Anatum.

Se realizó un análisis de coordenadas principales para determinar la dispersión que existe entre los grupos de PV generados (Fig.15). En dicho gráfico se observó como grupo más cercano al origen y en plano positivo al PV1, seguido de PV2 en plano positivo y PV3 en plano negativo, PV4 en plano positivo, y más alejados del origen y en plano negativo a los PV5, PV6, PV7. Se observó al PV8 como el más alejado del origen y de ejes y en plano negativo.

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

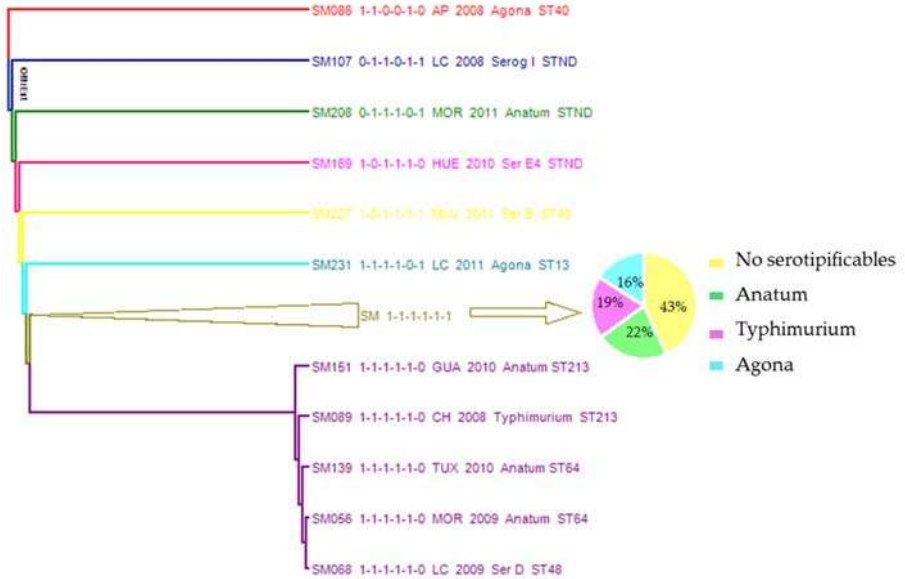


Figura 13. Dendrograma de relación genética en base a los PV obtenidos en las cepas de estudio. El dendrograma se generó empleando el software FreeTree calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Ne y Li y construyendo el patrón de agrupamiento mediante el criterio UPGMA. El árbol fue editado empleando el paquete MrEnt. El color de cada rama representa un perfil de virulencia. El gráfico inserto hace referencia a porcentajes exclusivamente dentro de la rama SM 1-1-1-1-1. En cada rama terminal se muestra el número de la cepa seguido del patrón de perfil de virulencia, las siglas de la población de procedencia dentro del estado de Michoacán, el año del aislamiento, el serotipo y la secuencia tipo (ST). Clavede municipios: AP, Apatzingán; LC, Lázaro Cárdenas; Mor, Morelia; Hue, Huetámoo; MUJ; Mujica; GUA, Guacamayas; CH, Charo; TUX, Tuxpan

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

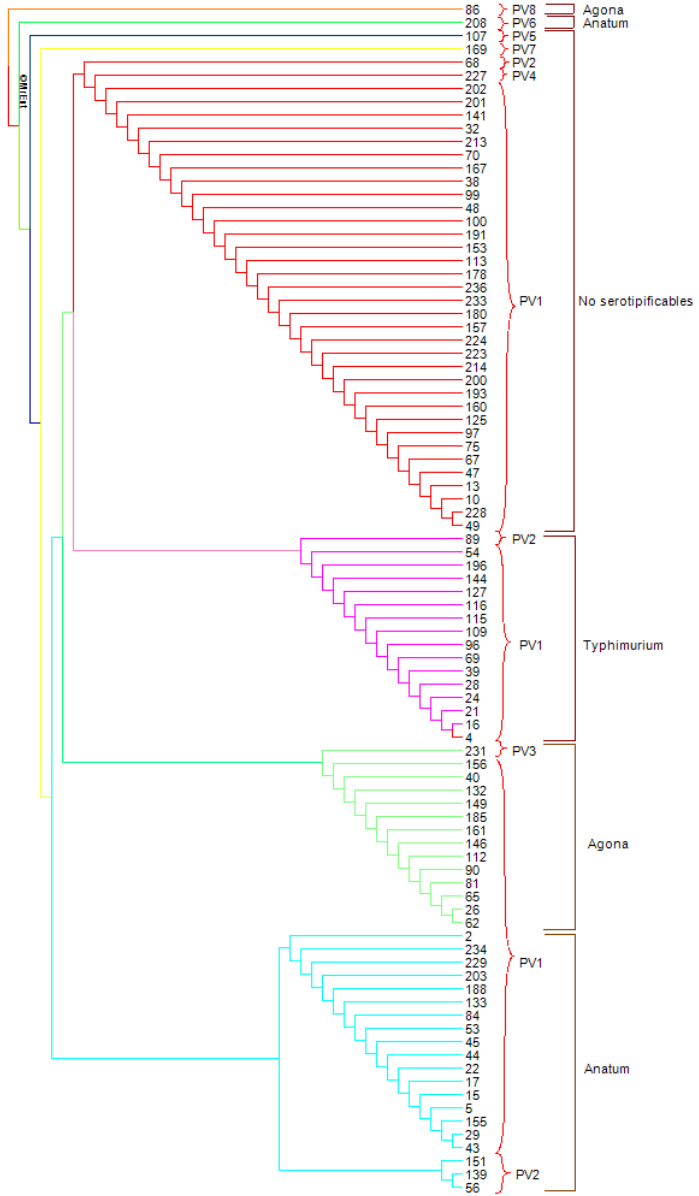


Figura 14. Dendrograma de relación fenotípica y genotípica entre cepas de estudio. El dendrograma se generó empleando el software FreeTree calculando las distancias genéticas mediante el algoritmo de Ne y

Li y construyendo el patrón de agrupamiento mediante el criterio UPGMA. El árbol fue editado empleando el paquete MrEnt. Cada rama terminal tiene el número de la cepa estudiada y los colores designan a un serotipo particular, aunque en el caso de Agona y Anatum se presentan las cepas 86 y 208, respectivamente, separadas del clado principal.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron un total de 90 aislados de *Salmonella enterica* con la finalidad de encontrar patrones de presencia/ausencia de 6 genes asociados a virulencia seleccionados de 5 Islas de Patogenicidad presentes en dicho patógeno. Los resultados obtenidos proporcionaron información sobre el potencial de virulencia/patogenicidad de las cepas que se encuentran contaminando alimentos con mayor frecuencia en el estado de Michoacán.

Las cepas analizadas mostraron 8 Perfiles de Virulencia (PV) diferentes, resultados que muestran similitud con el trabajo de Graziani *et al.* (2011), en el que se reportaron 10 perfiles diferentes analizando 10 genes de virulencia de las mismas 5 islas en un total de 112 cepas de *Salmonella enterica* aisladas tanto de muestras clínicas como de muestras de alimentos. Los perfiles aquí encontrados fueron enumerados del 1 al 8, siendo el PV1 el que se encontró con mayor frecuencia, presentándose en 79 (87.77%) de los aislados y constituido por la presencia de los 6 genes aquí estudiados. El segundo PV más frecuente fue el PV2, encontrándose en 5 de los aislados, representando un 5.55% y conformado por la presencia de 5 de los genes seleccionados para este estudio, ausencia excepción del gen *sopB* de la SPI5. Debido a las características de dichos perfiles, estos son considerados con mayor potencial de virulencia, ya que presentan los dos genes seleccionados de la SPI1, lo que les confiere alta capacidad invasiva, así como la presencia de los genes en las islas 2,3 y 4, los cuales se han reportado como los responsables de la supervivencia intracelular de la bacteria y su habilidad para invadir a otros tejidos (Khoo *et al.*, 2009; Huehn *et al.*, 2010).

Los perfiles aquí sugeridos como aquellos con menor potencial patogénico son PV5, PV6, PV7 y PV8, los cuales se presentaron con una frecuencia del 1.1%, conformados por una cepa cada uno. Dos de las cepas analizadas presentaron el PV5 y el PV6 respectivamente, y por lo tanto no presentan al gen *invA* de la SPI1, lo que puede sugerir que las cepas que portan estos perfiles de virulencia tengan una capacidad invasiva disminuida, ya que este gen está

asociado principalmente al proceso de invasión, aunque dicho mecanismo necesita ser comprobado particularmente en estas cepas. Este resultado es interesante ya que no existen reportes en los que se documente que cepas de *Salmonella enterica* hayan presentado la ausencia de este gen. Un extenso trabajo realizado por Ziemer y colaboradores (2003), en el que se buscaron en 52 cepas los genes de la SPI1, incluido el gen *invA*, mostró que de 37 serotipos y 11 serogrupos de *S. enterica* estudiados, todos tenían dicho gen. El trabajo citado incluyó cepas de los serotipos y serogrupos analizados en el presente estudio. En aspecto interesante de éste gen es que diferentes reportes enfocados en la detección de *Salmonella enterica* en muestras clínicas, ambientales y de alimentos se basan en la amplificación mediante PCR del gen *invA*, dando por sentado que se encuentra presente en todas las cepas de *Salmonella enterica* (Rahn *et al.*, 1992; Glynn *et al.*, 2006). Los resultados aquí obtenidos muestran la importancia de analizar a futuro a nivel genómico las cepas en las que no se encontró dicho gen.

Aunque los PV7 y PV8 no presentan el gen *sopB* de la SPI5, se sugiere que pueden presentar la misma capacidad invasiva que los perfiles 1 al 4, ya que presentan el gen *invA* de la SPI1. La ausencia de los genes de las SPI1 (*sopE*), SPI2 (*ssaQ*), SPI3 (*rmbA*) y SPI5 (*sopB*) sugiere una capacidad disminuida de replicación en el interior de la célula epitelial y del macrófago y capacidad de invadir otros tejidos; no obstante, existe la posibilidad de que haya la ausencia de dichas regiones genéticas sea compensada por otros genes que tengan la capacidad de realizar las mismas funciones, los cuales no fueron estudiados en este trabajo (Lahiri *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se observó que el PV1 está distribuido en la mayoría de las ST, lo que puede deberse en parte a que dicho perfil fue el más abundante en nuestras cepas de estudio, con excepción de la ST48 y las ND, no reportadas en la base de datos, y por primera vez identificadas en el estado de Michoacán. Dentro de las ST con mayor diversidad de PV, se encontró a la ST40 y las STND, encontrándose 3 PV diferentes en cada una de éstas ST. La diversidad de Perfiles de virulencia en el caso de la ST40 puede deberse a que esta secuencia tipo fue la que se encontró en mayor proporción, representando un 20% del total de las secuencias tipo aquí estudiadas, con un total de 18 cepas. El caso de las cepas STND es interesante ya que, no obstante que constituyen el 3.3% del total de las ST, con un total de 3

cepas, se encontró una alta diversidad de PVs, presentando el PV5, PV6 y PV7, los cuales, no se encuentran presentes en ninguna otra ST aquí estudiada. Estos resultados concuerdan con la detección de otros determinante genéticos de virulencia en ST particulares, como se demostró en los trabajos de Garcia *et al.*, (2014) y Wiesner *et al.*, (2009), en los cuales se comprueba la asociación entre la ST19 y la presencia de los genes de virulencia *spvC* y *mig5*.

Dentro de las ST que presentaron 2 PV diferentes se encontró a la ST64, ST213 y ST13, las cuales presentaron el segundo lugar en frecuencia entre las cepas de estudio, después de la ST40, con un 18.8%, 17.7% y 11.1% respectivamente.

Se aplicó la prueba de Chi-cuadrada de Pearson, empleada para la búsqueda de asociación entre dos variables no paramétricas, como es el caso de la ST y el PV. El análisis arrojó resultados no significativos, con un valor de p de 0.932, lo que indica que no existe asociación entre ambas variables. Nuestros resultados difieren de otros estudios en los que se ha podido asociar un genotipo con una PV, como el caso específico del trabajo de Graziani y colaboradores (2011), quienes sugieren una asociación entre un genotipo obtenido por PFGE y diferentes perfiles de virulencia generados a partir de la búsqueda de 10 genes de 5 SPI. No obstante, cuando se hace el cálculo de residuos tipificados corregidos para determinar entre qué combinaciones de atributos se produce una dependencia, se pudo observar que en los casos particulares de las STND con PV5, PV6 y PV7, se obtuvo un valor de residual tipificado corregido de 5.4, lo que implica que cierto valor de dependencia en particular en estas variables. Esto mismo ocurre en los casos de las ST48 (PV2), ST13 (PV3) y ST40 (PV4 y PV8), con valores de residual tipificado corregido de 4.1, 2.8 y 2.0, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados en los trabajos realizados por Wiesner *et al.* (2009), Garcia *et al.* (2014) y Liu *et al.* (2011), en los cuales se muestra que ciertos genotipos obtenidos por MLST están asociados a la presencia de regiones genéticas relacionadas con la virulencia.

En el presente trabajo se seleccionaron cepas del serotipo Agona, Anatum, y Typhimurium, por ser los serotipos encontrados con mayor frecuencia en muestras de alimentos en el Estado de Michoacán. También se incluyeron las cepas no serotipificables, identificadas únicamente a nivel de serogrupo y que presentaron mayor diversidad de perfiles

de virulencia. Esta diversidad de PV puede deberse en parte a que estas cepas constituyen el 42.2% de las cepas de estudio, aunque por otro lado también se puede atribuir a que en estas cepas existen modificaciones genéticas, tanto en genes de virulencia como en genes involucrados en la translocación a la superficie de algunas proteínas, lo que se ve reflejado como una diferente variante que no expresa el antígeno de superficie, razón por la cual no es posible su serotipificación por métodos convencionales (Lavalett *et al.*, 2009). Por otro lado, se encontró que en los serotipos Agona y Typhimurium había la menor diversidad de PV, ya que todas las cepas dentro de estos serotipos presentan solo 2 PV diferentes, siendo a su vez los de mayor potencial de virulencia. Con base en este análisis, y dado que el serotipo Typhimurium es el que presentó menor variabilidad en cuanto a estos genes, y a su vez presentó los PV con mayor potencial de virulencia, se puede considerar al serotipo Typhimurium como más estable en cuanto a genes de virulencia y posiblemente como el más patógeno. Estos datos coinciden con lo descrito en el trabajo de García *et al.* (2014), quienes establecen que el serotipo Typhimurium tiene un alto potencial patogénico, ya que presenta gran cantidad de genes de virulencia. Nuestros resultados también coinciden con el trabajo de Khoo *et al.* (2009), quienes analizaron la presencia de 19 genes distribuidos en 5 Islas de patogenicidad en cepas de distintos serotipos, encontrando que aquellas del serotipo Typhimurium los presentaban todos. La presencia de dichos genes en este serotipo puede deberse a la adquisición de plásmidos de virulencia y su integración al DNA cromosómico mediante procesos de recombinación, o bien mediante la integración de Islas de Patogenicidad completas específicas de *Salmonella enterica*.

Los resultados genéticos de estos estudios previos y los aquí reportados son congruentes con estudios experimentales de patogenicidad, en los que se ha encontrado que cepas del serotipo Typhimurium son capaces de causar una infección sistémica aguda en ratones, siendo mortal en el 80% de los casos al cabo de 4 a 7 días, una virulencia superior a la de las cepas de otros serotipos evaluados (Suez *et al.*, 2013). Esto indica claramente que hay ciertos serotipos que se pueden considerar más virulentos que otros, siendo en este caso particular, dada la consistencia del PV1 en las cepas del serotipo Typhimurium, un indicio de dicho potencial.

En este trabajo se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el PV de una cepa y su serotipo o serogrupo. Los datos que contribuyen a dicha asociación son independientes de la frecuencia, es decir, los valores que denotan una alta asociación no son precisamente los serotipos o serogrupos más frecuentes aquí encontrados. El valor más alto de residual tipificado corregido fue del serogrupo I, al presentarse el PV5, con un valor de 9.5, siendo este serogrupo y PV únicos en este trabajo, seguido del serogrupo E4 con el PV7 (5.4), Agona PV8 (2.2) y Anatum PV2 (2.0). Por otro lado, se observó a las cepas del serotipo Typhimurium con valores de residual tipificado corregido por debajo de dos, lo que denota que la asociación encontrada no está dada por este serotipo.

Aunque las cepas estudiadas en este trabajo provienen de diferentes partes del estado de Michoacán, los municipios que contribuyeron con mayor número de muestras fueron LázaroCárdenas (26.6%), Morelia (13.3%), Uruapan (8.8%), Zamora (7.7%) y Apatzingán (6.6%); observándose mayor diversidad de PV en las localidades de LázaroCárdenas y Morelia, con 4 y 3 PV, respectivamente. También se pudo observar que existe una amplia distribución en todo el estado del PV1, sugerido aquí como el de mayor potencial de virulencia, esto puede deberse en parte a que es el PV mayoritario en las cepas de estudio. El PV2, que fue el PV segundo más frecuente, no fue específico de alguna región, encontrándose en diferentes municipios del estado. El análisis de la distribución geográfica de los PV mostró que no existe asociación entre una región geográfica específica del estado de Michoacán con un PV. En cuanto a los PV menos frecuentes, se encontraron distribuidos en los municipios de Apatzingán, Huetamo, Morelia y Mujica. Aunque con base en la información obtenida de la distribución geográfica se observó que los PV están ampliamente distribuidos en el estado, falta analizar aquellas localidades de las que no se incluyeron aislados en este estudio.

En el presente trabajo se se analizaron los PV mediante la generación de dendrogramas o patrones de agrupamiento. El análisis de agrupamiento es un análisis gráfico complementario al análisis estadístico el cual permite una rápida visualización de las características de los perfiles de virulencia en relación con características fenotípicas, como el serotipo. Así, los patrones de agrupamiento presentados permiten visualizar rápidamente la diversidad de perfiles de virulencia y la variedad de serotipos dentro de cada perfil (Figura 13), así como la distribución de las cepas y los serotipos dentro de un perfil de virulencia en

particular (Figura 14). Para la realización de dichos dendrogramas los datos de presencia/ausencia de cada una de los genes de virulencia analizados en todas las cepas de estudio fueron convertidos en una matriz binaria de 1 (presencia del gen) y 0 (ausencia del gen). La generación de matrices binarias y su análisis mediante la construcción de patrones de agrupamiento es una herramienta ampliamente utilizada en diversas áreas de la microbiología, incluyendo la ecología (Singh et al., 2006), la epidemiología (Melles et al., 2006) y la fisiología (Aquilanti et al., 2007), entre otras. Las matrices binarias pueden generarse tanto con datos bioquímicos, como con datos genéticos (Singh et al., 2006; Aquilanti et al., 2007). En particular, el patrón de bandeo generado mediante electroforesis en geles de campo pulsante (PFGE), considerada como la técnica “estándar de oro” para la tipificación genético molecular de cepas de *S. enterica* en estudios epidemiológicos, basa su análisis en la generación de una matriz binaria a partir de la cual se construyen patrones de agrupamiento (Goering, 2010).

Aunque algunos de los estudios de perfiles de virulencia en cepas de *S. enterica* únicamente reportan la presencia o ausencia de genes de virulencia (Bokko et al., 2013) o bien haplotipos de virulencia (Capuano et al., 2013) sin generar gráficos, mientras que en otros trabajos se utilizan los perfiles encontrados para generar patrones de agrupamiento (Huehn et al., 2010; Khoo et al., 2009). Estudios previos han utilizado 19 (Khoo et al., 2009) y un microarreglo de 102 (Huehn et al., 2010) genes de virulencia para construir los patrones de agrupamiento. De manera interesante, en el estudio en el cual se utilizaron 19 genes no se encontró relación entre el patrón agrupamiento y el serotipo (Khoo et al., 2009), mientras que en el estudio de microarreglos con 102 genes, los patrones de agrupamiento por perfiles de virulencia coincidieron con el serotipo de las cepas (Huehn et al., 2010), y además se logró identificar variaciones de perfiles dentro de un serotipo. En el presente trabajo únicamente se utilizaron únicamente 6 genes, y en general se logró una separación entre serotipos y perfiles de virulencia, a diferencia que del trabajo de Khoo et al. (2009). Los resultados aquí generados lograron generar 8 grupos asociados a perfiles de virulencia, con 9 genes se definieron 6 grupos asociados a dichos perfiles (Khoo et al., 2009), y con 10 genes es posible visualizar 14 perfiles (Huehn et al., 2010). A futuro sería interesante analizar que número de mínimo de

genes de virulencia y que combinaciones pueden generar patrones de agrupamiento congruentes con características fisiológicas como el serotipo.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- i. Se estableció un esquema para la asignación de perfiles de virulencia con base en la detección de 6 genes de virulencia localizados en 5 Islas de Patogenicidad, en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos en el estado de Michoacán.
- ii. La búsqueda de genes asociados a virulencia arrojó 8 Perfiles de Virulencia, siendo el PV1, sugerido aquí como el de mayor potencial virulencia, el que se encontró con mayor frecuencia, presentándose en 79 de los aislados (87.77%).

10. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo no mostraron relación entre el perfil de virulencia de las cepas de estudio con la secuencia tipo, ni con alguna área geográfica específica del estado de Michoacán, pero si con el serotipo.

11. ANEXOS

11.1 Anexo a. Tabla de contingencia de PV y ST con residuos tipificados corregidos

ST		PV								Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	
112	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
118	Recuento	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	% del total	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%
	Residuos corregidos	.5	-.3	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
13	Recuento	9	0	1	0	0	0	0	0	10
	% del total	10.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	11.1%
	Residuos corregidos	.2	-.8	2.8	-.4	-.4	-.4	-.4	-.4	
14	Recuento	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	% del total	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%
	Residuos corregidos	.5	-.3	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
142	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
155	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
167	Recuento	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	% del total	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%
	Residuos corregidos	.5	-.3	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
19	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
213	Recuento	14	2	0	0	0	0	0	0	16
	% del total	15.6%	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	17.8%
	Residuos corregidos	.0	1.3	-.5	-.5	-.5	-.5	-.5	-.5	
292	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

321	Recuento	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	% del total	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%
	Residuos corregidos	.5	-.3	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
329	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
40	Recuento	16	0	0	1	0	0	0	1	18
	% del total	17.8%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	20.0%
	Residuos corregidos	.2	-1.2	-.5	2.0	-.5	-.5	-.5	2.0	
440	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
447	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
463	Recuento	3	0	0	0	0	0	0	0	3
	% del total	3.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%
	Residuos corregidos	.7	-.4	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
48	Recuento	0	1	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	-2.7	4.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
588	Recuento	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	% del total	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%
	Residuos corregidos	.5	-.3	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
592	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
64	Recuento	15	2	0	0	0	0	0	0	17
	% del total	16.7%	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	18.9%
	Residuos corregidos	.1	1.2	-.5	-.5	-.5	-.5	-.5	-.5	
65	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
72	Recuento	2	0	0	0	0	0	0	0	2
	% del total	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.2%

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

	Residuos corregidos	.5	-.3	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
ND	Recuento	0	0	0	0	1	1	1	0	3
	% del total	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	1.1%	1.1%	0.0%	3.3%
	Residuos corregidos	-4.7	-.4	-.2	-.2	5.4	5.4	5.4	-.2	
Total	Recuento	79	5	1	1	1	1	1	1	90
	% del total	87.8%	5.6%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	100.0%

11.2 Anexo b. Tabla de contingencia de PV y serotipo con residuos tipificados corregidos

Serotipo		PV								Total	
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Agona	Recuento	13	0	1	0	0	0	0	0	1	15
	% del total	14.4%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	16.7%
	Residuos corregidos	-.1	-1.0	2.2	-.4	-.4	-.4	-.4	-.4	2.2	
Anatum	Recuento	17	3	0	0	0	1	0	0	0	21
	% del total	18.9%	3.3%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	23.3%
	Residuos corregidos	-1.1	2.0	-.6	-.6	-.6	1.8	-.6	-.6	-.6	
Salmonella35	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
Serogrupo B	Recuento	21	0	0	1	0	0	0	0	0	22
	% del total	23.3%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	24.4%
	Residuos corregidos	1.3	-1.3	-.6	1.8	-.6	-.6	-.6	-.6	-.6	
Serogrupo C1	Recuento	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	% del total	3.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%
	Residuos corregidos	.7	-.4	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
Serogrupo C2	Recuento	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	% del total	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	.4	-.2	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	-.1	
Serogrupo D	Recuento	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3
	% del total	2.2%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%
	Residuos corregidos	-1.1	2.1	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	
Serogrupo E1	Recuento	4	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	% del total	4.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	4.4%
	Residuos corregidos	.8	-.5	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	-.2	

Virulotipificación de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

Serogrupo E4	Recuento	2	0	0	0	0	0	1	0	3
	% del total	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	3.3%
	Residuos corregidos	-1.1	-4	-2	-2	-2	-2	5.4	-2	
Serogrupo I	Recuento	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	% del total	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%
	Residuos corregidos	-2.7	-2	-1	-1	9.5	-1	-1	-1	
Typhimurium	Recuento	15	1	0	0	0	0	0	0	16
	% del total	16.7%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	17.8%
	Residuos corregidos	.8	.1	-5	-5	-5	-5	-5	-5	
	Recuento	79	5	1	1	1	1	1	1	90
	% del total	87.8%	5.6%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	100.0%

12. REFERENCIAS

Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Brisse S; S. Enterica MLST Study Group (2012) Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002776. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776

Akiba M, Nakamura K, Shinoda D, Yoshii N, Ito H, Uchida I, Nakazawa M (2006) Detection and characterization of variant *Salmonella* genomic island 1s from *Salmonella* Derby isolates. *Jpn J Infect Dis* 59: 341–345.

Aquilanti, L., Silvestri, G., Zannini, E., Osimani, A., Santarelli, S., & Clementi, F. (2007). Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *Journal of applied microbiology*, 103(4), 948-960.

Baumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 66: 4579–4587.

Bugarel M, Granier SA, Weill FX, Fach P, Brisabois A (2011) A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Microbiology* 11: doi: 10.1186/1471-2180-11-151. 1 – 11.

CDC. 2007. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2006. CDC, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/SalmonellaAnnualSummary2006.pdf>.

Cooke FJ, Threlfall EJ, Wain J (2007) Current trends in the spread and occurrence of human salmonellosis: molecular typing and emerging antibiotic resistance, En: *Molecular Biology*

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

and Pathogenesis..Mikael Rhen, Mikael Maskell, Pietro Mastroeni, John Threlfal. Horizon Bioscience, Wymondhand Norfolk, UK. pp 1-30.

Durango J, Arrieta G, Mattar S (2004) Presence of *Salmonella* as a risk to public health in the Caribbean zone of Colombia. *Biomedica* 24: 89-96.

Gal-Mor O, Finlay BB (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8: 1707-1719.

Glynn B, Lahiff S, Wernecke M, Barry T, Smith T J, Maher M (2006) Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *International Journal of Dairy Technology*. 59(2): 126-139.

Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 866-875.

Graziani C, Busani L, Dionisi AM, Caprioli A, Ivarsson S, Hedenström I, Luzzi I (2011) Virulotyping of *Salmonella enterica* serovar Napoli strains isolated in Italy from human and nonhuman sources. *Foodborne Pathog Dis* 8: doi: 10.1089/fpd.2010.0833. Epub 2011 May 11. 997-1003.

Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública México*. 42: 490-495.

Hensel M(2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294: 95-102.

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

Herrero-Fresno A, Wallrodt I, Leekitcharoenphon P, Olsen JE, Aarestrup FM, Hendriksen RS. (2014) The role of the st313-td gene in virulence of *Salmonella* Typhimurium ST313. *PLoS One* 9(1):e84566. doi: 10.1371/journal.pone.0084566. eCollection 2014; 1-11.

Huehn S, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, Helmuth R, Hauser E, Guerra B, Beutlich J, Brisabois A, Peters T, Svensson L, Madajczak G, Litrup E, Imre A, Herrera-Leon S, Mevius D, Newell DG, Malorny B (2010) Virulotyping and antimicrobialresistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe.7: doi: 10.1089/fpd.2009.0447. 523-35.

Inocencio-Velázquez AG (2013) Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán. Tesis de Maestría Fac. de Ciencias Médicas y Biológicas, “Dr Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán, México.

Khoo CH, Cheah YK, Lee LH, Sim JH, Salleh NA, Sidik SM, Radu S, Sukardi S(2009) Virulotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry meat in Malaysia using multiplex-PCR. *Antoine van Leeuwenhoek*96: doi 10.1007/s10482-009-9358-z.441–457.

Kumar R, Surendran PK, Thampuran N (2008) Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 221-226.

Lahiri A, Lahiri A, Iyer N, Das P, Chakravorty D (2010) Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes infect*. 12: 809 – 818.

Lavalett L, Sánchez MM, Muñoz N, Moreno J, Cardona-Castro N (2009) Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction for molecular identification of *Salmonella* entérica serogrupos B, C2, D and E. *Biomédica*29: 244 – 252.

Lawrence JG (2005) Common themes in the genome strategies of pathogens. *Curr Opin Genet Dev* 15: 584–588.

Lilic M, Stebbins CE (2004) Re-structuring the host cell: up close with *Salmonella*'s machinery. *Microbes infect* 6: 1205 – 1211.

Liu F, Kariyawasam S, Jayarao BM, Barrangou R, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Knabel SJ, Dudley EG (2011) Subtyping *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates from Different Sources by Using Sequence Typing Based on Virulence Genes and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs). *Appl Environ Microbiol* 77: doi:10.1128/AEM.00468-11.4520–4526.

McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D, Koronakis V (2009) *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* 12: doi 10.1016/j.mib.2008.12.001. 117–124.

Melles, D. C., Tenover, F. C., Kuehnert, M. J., Witsenboer, H., Peeters, J. K., Verbrugh, H. A., & van Belkum, A. (2008). Overlapping population structures of nasal isolates of *Staphylococcus aureus* from healthy Dutch and American individuals. *Journal of clinical microbiology*, 46(1), 235-241.

Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R (2005) Molecular mechanisms of resistance in multidrug g-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from food in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 56(6):1025-33

Moest TP, Méresse S. (2013) *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol* 16: doi: 10.1016/j.mib.2012.11.006. Epub 2013 Jan 5. 38–44.

Nógrády N, Imre A, Kostyák A, Tóth A, Nagy B (2010) Molecular and pathogenic characterization of *Salmonella enterica* serovar strains of animal, environmental, food,

Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

and human origin in Hungary. *Foodborne Pathog Dis* 7: doi: 10.1089/fpd.2009.0420. 507 - 513.

Page R D M(1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12:357–358.

Pavlieek A, Pavlieek P, Jaroslav (1999) FreeTree version 0.9.1.50 *Folia Biologica (Praha)* 45,97-99.

Perrett CA, and Jepson MA(2009) Regulation of *Salmonella* induced membrane ruffling by SipA differs in strains lacking other effectors. 11: doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01268.x. Epub 2008 Dec 11. 475 - 87.

Petermann SR, Sherwood JS, Logue CM (2008) The *Yersinia* high pathogenicity island is present in *Salmonella enterica* Subspecies I isolated from turkeys. *MicrobPathog* 45: 110–114.

Raffatellu M, Tükel Ç, Chessa D, Wilson R.P., Bäumler AJ (2007) The intestinal phase of *Salmonella* infections En: *Salmonella: Molecular Biology and Pathogenesis.* Mikael Rhen, Mikael Maskell, Pietro Mastroeni, John Threlfall . Horizon Bioscience, Wymondhand Norfolk, UK. pp 31-52.

Rahn K1, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R 3rd, Gyles CL (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes.* 6(4):271-9.

Regalado-Pineda I (2010) Aislamiento y caracterización Bioquímica y Genética de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* de productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán México. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México.

Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F (2010) So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* 305: 1–13

Sambrook, J and Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring, USA. Sharples GJ and Lloyd RG. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*. 18: 6503-6508.

San Millán RM, Martínez-Ballesteros I, Rementeria A, Garaizar J, Bikandi J (2013) Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Research Notes* 6:513. DOI: [10.1186/1756-0500-6-513](https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-513).

Singh BK, Munro S, Reid E, Ord B, Potts JM, Paterson E, Millard P (2006) Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soil Science*, 57(1): 72-82.

Suez J, Ponwollik S, Dagon A, Schirr YI, Desai PT, Agmon V, McLelland M, Rahav G, Galnor O (2013) Virulence gene profiling a pathogenecy characterization of non-Typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease humans. *PloS One*.8:doi: [10.1371/journal.pone.0058449](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058449). e58449.

Tischler AD, McKinney JD (2010) Contrasting persistence strategies in *Salmonella* and *Mycobacterium*. *Curr Opin Microbiol* 13: doi [10.1016/j.mib.2009.12.007](https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.007). 93–99

Vázquez- Narváez EG (2012) Elementos Repetitivos para el análisis de Diversidad Genética de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de productos cárnicos y lácteos del Estado de Michoacán. Tesis de Maestría Fac. de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán, México.

WHO. 2008. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva, World Health Organization.

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:doi: 10.1186/1471-2180-9-131; 1-15.

Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-García MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott J, Zhao S, McDermott P, and Tollefson L. 2008. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. Emerging Infectious Diseases. 14: 429-4353.

Ziemer CJ, Steadham SR (2003) Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. Lett Appl Microbiol. 37:doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01430.x; 463-469.

Zou W, Al-Khalidi SF, Branham WS, Hant T, Fuscoe JC, Han J, Foley SL, Xu J, Fong H, Cerniglia CE, Naya KR (2011) Microarray analysis of virulence gene profiles in *Salmonella* serovars from food/food animal environment. J infect Dey Ctries2;5: 94-105.

Zuccon A. & Zuccon D. 2013. MrEnt v.2.5. Program distributed by the authors. [<http://www.mrent.org>].