



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS
"Dr. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

**Caracterización metabólica y respuesta a estrés de cepas
de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos colectados
en Michoacán**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

MVZ MARIANA ESTHER KUK SOBERANIS

DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

COMITÉ TUTORAL:

**D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO
D. en C. VIRGINIA A. ROBINSON FUENTES
D. en C. ANA EDITH HIGAREDA MENDOZA
D. en C. ANA LAURA GUILLEN NEPITA**

Morelia, Mich., agosto 2016

El Comité Tutorial designado por la División de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, aprobó la tesis que presentó:

Médico Veterinario Zootecnista

Mariana Esther Kuk Soberanis

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Edith Higareda Mendoza

PhD

Virginia Angélica Robinson Fuentes

Doctor en Biotecnología de Plantas

Gerardo Vázquez Marrufo

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Laura Guillen Nepita

Dirección de tesis

Doctora en Ciencias (Biología)

Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pertenece al Patrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Recibió beca del CONACyT durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud con Registro de becaria: 305216 y CVU: 589795.

La presente investigación se realizó en:
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
División de Estudios de Posgrado
Laboratorio de Genética Molecular Microbiana

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Le doy gracias a Dios por permitirme finalizar una etapa académica más, a mi familia, Erick y Santy por darme la fuerza y el apoyo necesario para sacar adelante mis estudios, por permitirme robarles tiempo para la realización de la maestría, de verdad estoy agradecida por tenerlos en mi vida, los amo con todo mi ser, son mis ángeles. A mi mamá, por el apoyo que nos ha brindado siempre, por su amor incondicional, por sus consejos y por escucharme, a mis hermanos que nos apoyaron desde el principio de este camino y a mis sobrinos hermosos que saben que los amo, a mis cuñadas y a mi suegra por el apoyo recibido. Gracias a mis compañeros de generación, pues el apoyo como grupo se notó desde el primer semestre. A mis Profesores de Maestría, que nos han transmitido sus conocimientos. A la Doctora Robinson y Doctora Higareda gracias por las aportaciones tan valiosas en el desarrollo de este trabajo, por su apoyo y dedicación muchas gracias. A mis compañeros de laboratorio, en especial a Paulina, Andrei, Adrián y Ana por su apoyo en este trabajo, a Mar, Naya, Erandi, Saila y los chicos de servicio que hacen el ambiente de trabajo ameno y agradable, ustedes hacen que el laboratorio se vuelva familia. Gracias Doctora Sol y al Doctor Gerardo pues ustedes son el pilar más valioso que pueda tener el laboratorio, pues su apoyo y aportaciones han hecho que todos logremos lo que nos proponemos, ¡mil gracias!. Gracias al MC. Ignacio Barajas y la MVZ. Gabriela Arnaud pues ellos son mis mentores y me apoyaron al inicio de la Maestría, a ellos siempre les estaré eternamente agradecida.

Dedicado a mi papá, pues sé que él siempre está a mi lado y a mis grandes amores, Erick, Santy y Bebé.

ÍNDICE GENERAL

Resumen

1. Introducción	1
1.1. Generalidades sobre el género <i>Salmonella</i>	1
1.2. Clasificación	1
1.3. Identificación de <i>Salmonella</i>	2
1.3.1. Serotipificación	2
1.3.2. Tipificación genético molecular de <i>Salmonella</i>	3
1.4. Epidemiología y Patología	4
1.5. Características de crecimiento y supervivencia	9
1.6. Resistencia a estrés	10
1.7. Formación de células filamentosas	14
1.8. Caracterización fenotípica de enterobacterias	17
1.8.1. Microarreglos metabólicos	17
1.9. Ventajas de la combinación del análisis genético y caracterización fenotípica de <i>S. enterica</i>	18
1.10. Antecedentes	21
2. Justificación	23
3. Hipótesis	24
4. Objetivos	24
5. Estrategia experimental	25
6. Material y métodos	26
6.1. Material biológico	26
6.2. Ensayos de recuperación a condiciones de refrigeración y actividad de agua reducida (a_w)	27
6.3. Tratamiento estadístico	28
6.4. Observación de formación de células filamentosas	28
6.5. Ensayos de utilización de fuentes mediante el sistema Biolog	28
6.6. Correlación entre resistencia a estrés y metabolismo	29
7. Resultados	30
7.1. Capacidad de recuperación al estrés por refrigeración y actividad de agua reducida (a_w)	30
7.2. Velocidad de crecimiento	33
7.3. Formación de células filamentosas	38
7.4. Microarreglos metabólicos	40
7.5. Correlaciones entre resistencia a estrés y metabolismo	52
8. Discusión	55
9. Resumen de resultados	63
10. Conclusiones	65
11. Referencias bibliográficas	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Num.	Descripción	Pag.
1	Antígenos somáticos y flagelares de <i>Salmonella enterica</i> .	2
2	Vías de transmisión de <i>Salmonella enterica</i> .	7
3	Respuesta de las células bacterianas durante la exposición a ambientes con baja a_w .	16
4	Sustratos presentes en la microplaca GEN III.	18
5	Porcentajes de secuencias tipo de <i>S. Typhimurium</i> utilizadas en el estudio.	27
6	Cinéticas de crecimiento a TA.	30
7	Cinéticas de crecimiento durante el periodo de recuperación al estrés a TA y a_w .	31
8	Cinéticas de crecimiento de las cepas durante el periodo de recuperación al estrés a 6°C.	32
9	Cinéticas de crecimiento durante el periodo de recuperación al estrés a 6°C y a_w .	32
10	Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio.	34
11	Velocidad de crecimiento de las cepas sin estrés.	35
12	Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio durante su recuperación por estrés a TA.	36
13	Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio durante su recuperación por estrés a TA y a_w .	36
14	Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio durante su recuperación por estrés a 6°C.	37
15	Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio durante su recuperación por estrés a 6°C y a_w .	37
16	Morfología que presentaron las cepas de estudio durante la exposición a estrés.	38
17	Mapa de calor que indica el perfil metabólico de las 16 cepas analizadas utilizando las placas GNIII.	40
18	Porcentaje de utilización de sustratos presentado por las cepas de estudio.	41
19	Porcentaje de carbohidratos utilizados por las cepas de estudio.	42
20	Utilización de carbohidratos por las cepas de estudio.	43
21	Porcentaje de hexosas utilizadas por las cepas de estudio.	45
22	Utilización de hexosas por las cepas de estudio.	46
23	Porcentaje de ácido hexosas utilizados por las cepas de estudio.	46
24	Utilización de ácido hexosas por parte de las cepas de estudio.	47
25	Porcentaje de aminoácidos utilizados por las cepas de estudio.	48
26	Utilización de aminoácidos por las cepas de estudio.	49
27	Porcentaje de ácidos carboxílicos, ésteres y ácidos grasos utilizados por las cepas de estudio.	50
28	Utilización de ácidos carboxílicos, ésteres y ácidos grasos por las cepas de estudio.	50
29	Porcentaje de sustratos con NaCl utilizados por las cepas de estudio.	51
30	Diferencias estadísticas bajo la concentración de NaCl 8% en las cepas de estudio.	52
31	Correlación en cepas sin estrés.	53
32	Correlación entre velocidad de crecimiento y metabolismo en cepas de estudio que no fueron sometidas a estrés	54

ÍNDICE DE TABLAS

Num.	Descripción	Pag.
1	Factores que afectan al crecimiento y la supervivencia de <i>Salmonella spp</i>	10
2	Aislados de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium utilizados en el presente estudio.	26
3	Cepas que mostraron la capacidad de formar filamentos bajo las condiciones de estrés.	39
4	Utilización de carbohidratos por las cepas de estudio.	44

ABREVIATURAS

ABNC: Células activas pero no cultivables.

AFLP: Polimorfismos en los fragmentos de amplificación.

ATP: Adenosín trifosfato.

a_w : Disponibilidad de agua.

°C: Grados Celsius.

CDC: Centro de control de enfermedades.

CFU: Unidad formadora de colonias.

ESR: Envoltura de respuesta al estrés.

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos.

FI: Fluido de inoculación.

LB: Luria Bertani.

MF's: Microarreglos fenotípicos.

MLST: Tipificación por secuencias de múltiples locus.

nm: Nanómetro.

PBS: Buffer salino de fosfato.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PV: Perfil de virulencia.

SE: Sin estrés.

SPI: Islas de patogenicidad de *Salmonella*.

ST: Secuencia Tipo.

TA: Temperatura Ambiente.

T: Transmitancia.

VBNC: Células viables pero no cultivables.

VNTR: Número variable de repeticiones en tándem.

RESUMEN

Salmonella enterica es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales, asociada con la ingestión de alimentos contaminados. La tipificación genética de *S. enterica* permite establecer relaciones entre cepas obtenidas de alimentos y aquellas provenientes de infecciones y brotes, ayudando a una rápida identificación de la fuente de contaminación para el establecimiento de medidas de prevención y control. Se ha documentado que la respuesta de *S. enterica* a diferentes condiciones de estrés ambiental (cambios de pH, osmolaridad, temperatura, humedad, radiación, etc.), al cual puede enfrentarse *S. enterica* fuera del hospedero, no solo impacta a la sobrevivencia y al crecimiento del patógeno, sino que también pueden influir en la virulencia y la multi-resistencia a antibióticos. También se ha reportado que cepas con diferencias metabólicas tienen diferencias en su capacidad infectiva. Por otro lado se sabe que el estrés osmótico fomenta la formación de células filamentosas provocando un aumento en la biomasa total que en un alimento podría conducir al aumento del número de células potenciales para causar infecciones. En el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana se cuenta con una colección de 180 cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán. De todas las cepas se conoce el serotipo y origen geográfico, de 100 se ha determinado su genotipo, Secuencia Tipo (ST), Perfil de virulencia (PV) y resistencia a antibióticos, pero no se conoce su capacidad metabólica. El serotipo más abundante es el de Typhimurium (16 cepas). La combinación de la información genética existente con el análisis fisiológico y bioquímico, generará información valiosa para entender mejor la biología de cepas y clonas de relevancia en salud pública en el estado de Michoacán, y aportará información sobre los mecanismos de diversificación y adaptación regional. **Objetivo General:** Analizar la diversidad de patrones metabólicos y de resistencia a estrés asociado con la preservación de alimentos entre cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium aisladas de productos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán. **Material y métodos:** Se utilizaron 15 cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium ST 213 y una cepa ST19. Para analizar la diversidad metabólica se utilizaron las placas GNIII del sistema BIOLOG. Para los ensayos de resistencia a estrés, las bacterias obtenidas de pre-cultivos de 16 h en LB a 37°C, se resuspendieron en medio LB control o medio LB con actividad de agua reducida y se incubaron a 6°C. Se permitió su recuperación a 37°C y 150 rpm durante 6 h, y se midió la absorbancia a 600nm cada 2 h. La formación de células filamentosas se observó mediante la tinción de Gram. **Resultados:** Se encontró que las cepas pueden recuperarse más rápidamente del estrés a 6°C que a TA, ya sea en ausencia o presencia de a_w . Las cepas: 021, 024, 089 y 096 presentaron un retraso en el inicio de la fase exponencial en las 4 condiciones de exposición, pero logran un crecimiento similar a las 6 horas de cultivo. La velocidad de crecimiento en las condiciones TA con a_w , 6°C y 6°C con a_w fue mayor que a TA. La baja temperatura favorece la formación de células filamentosas. Todas las cepas mostraron patrones distintos de utilización de sustratos. La cepa 016 puede utilizar todos los sustratos analizados, mientras que las cepas 116 y 196 utilizaron una baja cantidad de sustratos. Se encontró correlación directa entre el crecimiento en la condición sin estrés y el metabolismo en presencia de β -metil-D-glucósido, NaCl al 1%, ácido-D-glucorónico y ácido propiónico. Además se observó correlación inversa con β -metil-D-glucósido bajo la condición de 6°C.

palabras Clave: salmonella, resistencia, estrés, supervivencia y metabolismo.

ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the main etiological agents of gastrointestinal diseases associated with ingestion of contaminated food. Genotyping of *S. enterica* can establish relationships between strains obtained from food and those from infections and outbreaks, helping to quickly identify the source of contamination for the establishment of prevention and control measures. It has been documented that *S. enterica* response to different environmental stress conditions (changes of pH, osmolarity, temperature, humidity, radiation, etc.), which may face *S. enterica* outside the host, not only impacts the survival and growth of the pathogen, but can also influence virulence and multi-antibiotic resistance. It has also been reported that metabolic differences strains have differences in their infectivity. Furthermore it is known that osmotic stress promotes the formation of filamentous cells causing an increase in the total biomass in a food could lead to increased number of potential cells to cause infections. In the Molecular Genetics Laboratory of Microbial it has a collection of 180 strains of *S. enterica* isolated from food by the State Laboratory of Public Health of Michoacan. All strains of serotype and geographical origin is known, it is determined 100 genotype, Sequence Type (ST), Virulence Profile (PV) and antibiotic resistance, but its metabolic capacity is unknown. The most abundant serotype is Typhimurium (16 strains). The combination of the genetic information with the physiological and biochemical analysis, generate valuable information to better understand the biology of strains and clones of relevance to public health in the state of Michoacan, and provide information on the mechanisms of diversification and regional adaptation. **General Objective:** To analyze the diversity of metabolic patterns and resistance to stress associated with the preservation of food among strains of *S. enterica* serotype Typhimurium isolated from meat and dairy products derived Michoacan state. **Methods:** 15 strains of *S. enterica* serotype Typhimurium ST 213 and ST19 strain were used. To analyze the metabolic diversity the system GNIII BIOLOGY plates were used. For stress resistance tests, bacteria obtained from pre-cultures of 16 h in LB at 37°C, resuspended in LB medium control or LB medium with reduced water activity and incubated at 6°C. Recovery at 37°C and 150 rpm for 6 h allowed, and absorbance at 600nm each the 2 h was measured. The formation of filamentous cells was observed by Gram staining. **Results:** It was found that strains can recover faster stress to 6°C than at RT, either in the absence or presence of a_w . Strains: 021, 024, 089 and 096, showed a delay in the start of the exponential phase 4 exposure conditions, but achieved a similar growth 6 hours of growth. The growth rate in conditions RT with a_w , 6°C and 6°C with a_w was higher than at RT. The low temperature favors the formation of filamentous cells. All strains showed distinct patterns of substrate utilization. The 016 strain can use all substrates analyzed and strains 116 and 196 used a low amount of substrates. A direct correlation was observed between the increase in stress condition and metabolism in β -methyl-D-glucoside, presence, NaCl 1%, acid-D-glucuronic and propionic acid. Additionally inverse correlation was observed with β -methyl-D-glucoside under the condition of 6°C.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre el género *Salmonella*

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos de tamaño 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 (Bergey, 2000; Hawley, 2004).

1.2 Clasificación

El género *Salmonella* comprende a las especies *S. bongori* y *S. enterica*, reconociéndose seis subespecies de esta última: Subespecie I *enterica* (1547 serotipos), Subespecie II *salamae* (513 serotipos), Subespecie IIIa *arizonae* (100 serotipos), Subespecie IIIb *diarizonae* (341 serotipos), Subespecie IV *houtanae* (73 serotipos) y Subespecie VI *indica* (13 serotipos) (Tindall *et al.*, 2005). Las especies de *Salmonella* se han dividido en distintos 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 (Voogt *et al.*, 2002) (Fig. 1). En la actualidad se han descrito más de 2,500 serotipos de *Salmonella*, encontrándose el 99% de éstos dentro de la especie *S. enterica*, la cual contiene la mayoría de serotipos que son patógenos para los humanos (Popoff *et al.*, 2001).

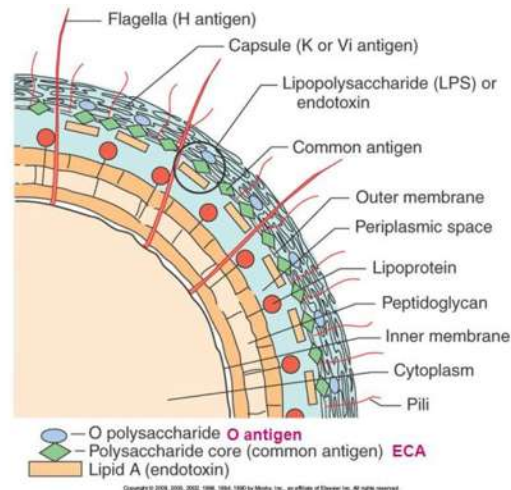


Figura 1. Antígenos somáticos y flagelares de *Salmonella enterica* (Caffer, 2001).

1.3 Identificación de *Salmonella*

1.3.1 Serotipificación

Uno de los métodos de tipificación más usados para *Salmonella* 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. Por otra parte, la proteína WZX es característica del grupo de antígenos O y es codificada por el gen *wzx*; esta proteína es una lipasa utilizada para la translocación del antígeno fuera de la membrana. La detección de estos antígenos es la base de la serotipificación con antisueros específicos, de los cuales se derivan las fórmulas antigénicas que caracterizan cada serogrupo (Lavalett *et al.*, 2009).

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 tipificados parcialmente, debido a que existen cepas rugosas que no expresan

antígenos en la superficie, encapsuladas, y otras que no expresan los antígenos flagelares (Lavalett *et al.*, 2009).

1.3.2 Tipificación genético molecular de *Salmonella*

Las herramientas de genética molecular han sido utilizadas ya por más de 20 años para la tipificación, el diagnóstico y el análisis epidemiológico de *S. enterica*. En la actualidad existe una amplia gama de técnicas que permiten la diferenciación de cepas relacionadas con brotes y la relación epidemiológica entre aislados de *S. enterica* (Foley *et al.*, 2009; Wattiau *et al.*, 2011). Las técnicas de biología molecular más empleadas para la diferenciación y el establecimiento de relaciones genéticas entre aislados de *Salmonella* son la electroforesis en geles de campo pulsante (PFGE, por sus siglas en inglés) y aquellas basadas en el ensayo de PCR. La PFGE ha sido aceptada como el estándar para la genotipificación de aislados de *S. enterica* por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos (Cimons, 2000) y es recomendada por la Organización Mundial de la Salud para estudios epidemiológicos de enfermedades y brotes ocasionados por alimentos contaminados (WHO, 2008). No obstante que la técnica de PFGE ha mostrado un gran poder de discriminación en diferentes serotipos de *S. enterica*, también se han documentado casos en los que no ha podido distinguir entre aislados del serotipo Enteritidis (Liebana, 2002). Las herramientas genético-moleculares basadas en la PCR y empleadas para la diferenciación entre aislados son la tipificación por secuencias de múltiples locus (MLST, por sus siglas en inglés) (Sangal *et al.*, 2010), los polimorfismos en los fragmentos de amplificación (AFLP, por sus siglas en inglés) (Giammanco *et al.*, 2007) y el número variable de repeticiones en tándem VNTR, por sus siglas en inglés) (Boxrud *et al.*, 2007). Es de esperar que a corto plazo todas las técnicas anteriores sean desplazadas por el análisis de genomas completos ya que la sensibilidad para detectar diferencias entre aislados, la rapidez y el abatimiento de costos hacen factible dicha predicción.

1.4 Epidemiología y Patología

Las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años. Son enfermedades prevenibles y tratables (WHO, 2013). Un alto porcentaje de las enfermedades diarreicas son originadas por alimentos contaminados, aunque las estimaciones de enfermedades ocasionadas por alimentos contaminados son difíciles de realizar debido a distintas circunstancias, entre las que se encuentran las diferencias para definir una enfermedad diarreica aguda en distintos estudios, el hecho de que la mayoría de este tipo de padecimientos no son reportadas a los sistemas de salud pública y debido a que pocas enfermedades pueden ser ligadas con seguridad a la comida ingerida (WHO, 2008). Aproximadamente 93,8 millones de casos de gastroenteritis ocurren cada año en el mundo, y entre estos, 80,3 millones de casos son transmitidas por los alimentos (Chauhan y Kang, 2014).

Uno de los agentes patógenos comúnmente asociados a alimentos contaminados es *Salmonella* spp. (WHO, 2008). La salmonelosis es una de las zoonosis más prevalentes en el mundo entero. En los últimos años ha habido un aumento significativo en la incidencia y la severidad de los casos de salmonelosis, la mayoría de ellos en países pobres cuyas condiciones socioeconómicas y sanitarias favorecen la proliferación de estos microorganismos (Ortega, 2007). A pesar de los avances tecnológicos y los esfuerzos educativos por mejorar el manejo de los productos alimenticios a lo largo de la cadena de producción y comercialización, los brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) debido a *Salmonellas*, siguen siendo frecuentes, en particular los que involucran consumo de alimentos lácteos (Scaramelli *et al.*, 1999). La salmonelosis puede manifestarse mediante distintos síndromes que incluyen gastroenteritis, bacteremia, fiebre tifoidea e infecciones localizadas en ciertas áreas del cuerpo (Darwin y Miller, 1999). La fiebre tifoidea es una manifestación única de enfermedad asociada con infección por *S. enterica* serotipo Typhi. La manifestación más común de salmonelosis no tifoidea es una gastroenteritis de leve a moderada, con presentación de diarrea, dolor abdominal, vómito y fiebre. Los síntomas de gastroenteritis aparecen normalmente entre las 6 a 72 h después de ingerir alimentos contaminados con la bacteria (Pegues *et al.*, 2005) y aunque normalmente pueden remitir en un lapso de 2 a 7 días, se puede desarrollar septicemia e infecciones invasivas de órganos, originando problemas de salud más serios como osteomielitis, neumonía y

meningitis (Cohen *et al.*, 1987). Después de la ingestión de un número suficiente de inóculo, las bacterias sobreviven al pH ácido del estómago para entrar al intestino delgado, donde se establece la infección. Un rasgo de virulencia importante de *Salmonella*, es su capacidad para invadir y crecer dentro de las células huésped. Existen determinantes genéticos esenciales para los procesos relacionados a virulencia. La invasión de las células epiteliales requieren de la expresión de un sistema de secreción tipo III, el cual permite el ingreso de proteínas bacterianas en las células del huésped. Las proteínas implicadas en este proceso están codificadas por un gran grupo de genes denominados como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI1) (Clements *et al.*, 2002). Una vez en el intestino *Salmonella* tiene preferencia por las células M, que son células epiteliales especializadas que están adosadas al intestino delgado y muestran un alto contenido antigénico de éste órgano. La bacteria penetra la barrera epitelial y es capaz de infectar fagocitos dentro de la lámina intestinal. En la gastroenteritis causada por *Salmonella*, la infección suele ser autolimitante y no migrar más allá de la lámina intestinal, sin embargo, en algunas ocasiones los fagocitos infectados pueden tener acceso a vasos linfáticos y al torrente sanguíneo, permitiendo de esta manera que se extienda a otros órganos como el hígado y el bazo (Ruby *et al.*, 2012).

Los grupos sociales más susceptibles a estas manifestaciones severas de la enfermedad son los niños, los adultos mayores y las personas inmunocomprometidas, las cuales requieren de terapia antimicrobiana para superar la enfermedad (Benenson y Chin, 1995). Las enfermedades diarreicas en México ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad en población menor de cinco años de edad, generando el 20% de la demanda de consulta en los servicios de salud y el 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Este grupo de edad presenta entre 2 y 4 episodios diarreicos al año, presentándose *Salmonella* spp. como la quinta causa de enfermedad diarreica aguda. En el 2010 se presentaron 878 egresos hospitalarios por *Salmonella* spp., presentándose 392 casos en el sexo masculino y 485 en el sexo femenino. Fue la causa número 2 de defunciones con 59 casos; sin embargo, las defunciones relacionadas con *Salmonella* no tifoidea han presentado una disminución importante en el periodo del 2000 al 2010, siendo la reducción de tasa del 60% (SINAVE, 2012). En EUA se registran más de 1,2 millones de enfermos,

con aproximadamente 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes cada año, siendo la principal causa de enfermedades transmitidas por alimentos (Yanga *et al.*, 2015).

La salmonelosis es una enfermedad que ha sido reportada durante décadas, sin embargo, dicho padecimiento se considera emergente debido a que en diversas partes del mundo se ha vuelto más frecuente. En los últimos 25 años, el serotipo Enteritidis se ha vuelto predominante en el hemisferio Oriental y en Europa, debido en gran parte al consumo de alimentos contaminados de origen animal, que incluyen pollos y huevos (WHO, 2002). Diversos factores han sido enumerados para que la salmonelosis, junto con otras enfermedades infecto-contagiosas, represente aún un riesgo para la salud y sea considerada como enfermedad emergente por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002). Entre estos factores se encuentran la globalización del 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).

Los dos serotipos de *Salmonella* más frecuentemente encontrados alrededor del mundo son Enteritidis y Typhimurium, que representa el 52,3% (11.8 por 100,000 habitantes) y 23,3% (5,3 por 100.000 habitantes), respectivamente, de todos los serotipos reportados en los casos de salmonelosis confirmada. Los casos humanos de *S. Enteritidis* fueron más comúnmente asociados con el consumo de huevos contaminados y aves de corral, mientras que los casos de *S. Typhimurium* se asociaron principalmente con el consumo de carne de cerdo contaminada, carne de aves de corral y la carne bovina (Álvarez *et al.*, 2012).

Otro factor importante es la movilidad internacional de personas expuestas a patógenos. Por ejemplo, se estima que cerca del 90% de los casos de salmonelosis que se presentan en Suecia son importados de viajeros que fueron a lugares con alta incidencia del patógeno. Los cambios en la población humana, incluyendo modificaciones en la edad de la población, la alimentación deficiente y otras enfermedades como las infecciones por VIH, ocasionan una mayor susceptibilidad a infecciones por *Salmonella* y otras bacterias patógenas. En el caso de los países en vías de desarrollo como México, los niños con alimentación deficiente son una población más susceptible a las enfermedades transmitidas por alimentos. Los cambios

en el estilo de vida son otro factor que favorece la transmisión de salmonelosis por alimentos, debido al incremento en el consumo de comida rápida en lugares con escasas condiciones de higiene (WHO, 2002).

Se estima que el 90-95% de los casos de salmonelosis en el humano están asociados al consumo de alimentos contaminados, otras vías de trasmisión incluyen: contacto con personas infectadas, animales infectados (recientemente por reptiles utilizados como mascotas siendo los niños el grupo más vulnerable) (UERIA, 2011) (Fig. 2).

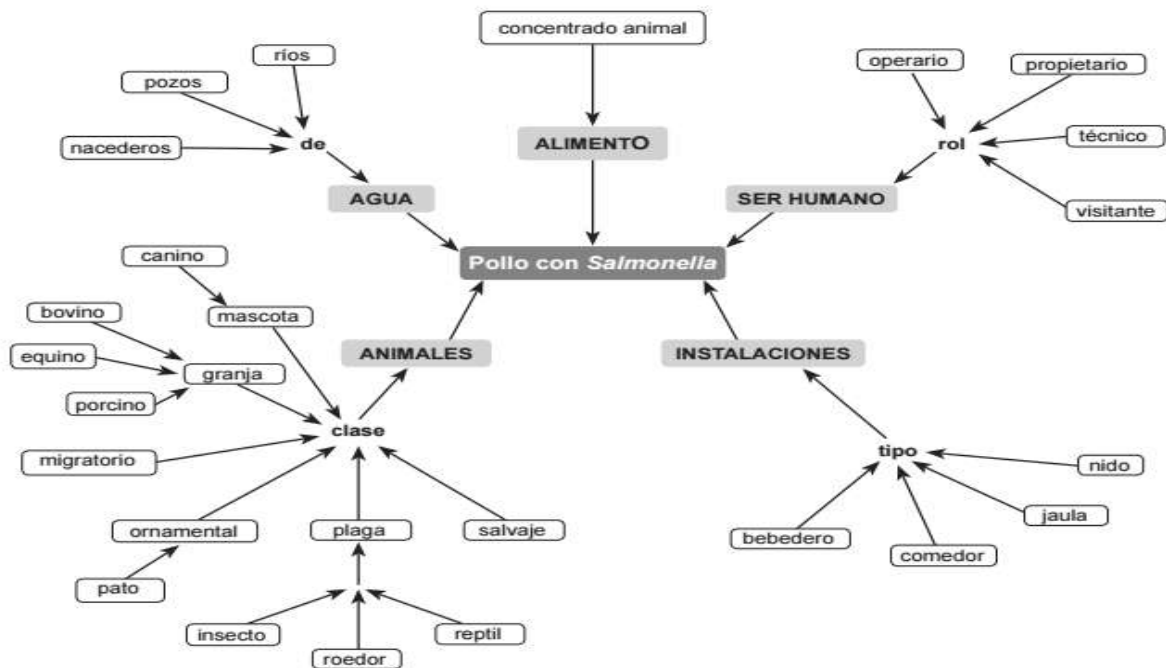


Figura 2. Vías de transmisión de *Salmonella enterica* (Fuente: UERIA, 2011).

Un estudio realizado en el 2011 reporta la incidencia de serotipos que causan salmonelosis en diferentes regiones del mundo. Los serotipos que frecuentemente se identifican en alimentos contaminados con *Salmonella* son Typhimurium y Enteritidis. Para la región de África, los 5 serotipos mayormente aislados son: Enteritidis, Typhimurium, Livingstone, Corvallis y Tiphys. Para Asia, los serotipos Enteritidis, Weltevreden, Typhi, Stanley y Typhimurium son los más frecuentemente encontrados. Para la región de Europa, son los serotipos Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow e Infantis; para Norteamérica Typhimurium, Enteritidis, Newport,

Heidelberg y Javiana. En Oceanía son los serotipos Typhimurium, Enteritidis, Virchow, Saintpaul e Infantis. Por último, en Latinoamérica los 5 serotipos mayoritariamente aislados son: Enteritidis, Typhimurium, Typhi, Agona y Paratyphi B (Hendriksen *et al.*, 2011).

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 diarrea, 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). Estudiando una población de 300 niños que cursaban un cuadro de diarrea, se encontró que *Salmonella enterica* estaba asociada a un 53.5% de casos de niños menores de 12 años, sola o en combinación con otros enteropatógenos (Paniagua *et al.*, 2007). 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%). En 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) se aisló *Salmonella* 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) (Zaidi *et al.*, 2008). 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. El serotipo más abundante en carne de res fue el Anatum (17.7%), seguido del Meleagridis (13%). En este mismo estudio se encontró una alta incidencia de contaminación de carne de vaca por *Salmonella* (21.3%-36.4%) al analizar 1,733 muestras de carne en expendios de venta al menudeo.

En el caso del estado de Michoacán, la prevalencia de contaminación por *Salmonella* en carne de bovino fue del 16%, encontrándose un 5.8% de prevalencia de la bacteria en casos de niños con episodios de diarrea y de aproximadamente 2% en muestras de niños asintomáticos. En particular, los serotipos más frecuentemente aislados de carne de res en el estado de Michoacán son Typhimurium (34.1%) y Derby (24.4%), seguidos del Anatum (9.8%), más otros 11 serotipos en menor proporción. En total, se han detectado 24 serotipos distintos contaminando

carne de cerdo, res y pollo en el estado de Michoacán (A. Figueroa, Laboratorio Estatal de Salud Pública, comunicación personal).

1.5 Características de crecimiento y supervivencia

Salmonella crece normalmente a 37°C; sin embargo algunos serotipos pueden crecer a temperaturas incluso entre 5 y 7°C (Matches y Liston, 1968). Las bajas temperaturas pueden influir en la capacidad de crecimiento de este patógeno en los alimentos almacenados durante largos periodos de tiempo a temperaturas superiores a 5°C. Algunos alimentos especialmente las carnes parecen tener un efecto protector para *Salmonella* durante procesos de congelación, asociados a su contenido de grasa (Oscar, 2009).

Salmonella generalmente es sensible a altas concentraciones de sal (9%), aunque los niveles óptimos de crecimiento son en presencia de concentraciones menores a 3% de NaCl (Thomas y Wimpenny, 1996).

La adición de compuestos conocidos como humectantes en los alimentos es un proceso que funciona para controlar la actividad de agua (a_w , la cantidad de agua “libre” o disponible en un sustrato), para mejorar la estabilidad, mejorar el sabor y limitar el deterioro de los alimentos. El humectante más utilizado es la sal común (NaCl) y varios azúcares, tales como sacarosa y fructuosa. Otros humectantes que pueden ser utilizados incluyen glicerol, sorbitol y KCl. Muchas bacterias Gram-negativas, incluyendo *Salmonella*, requieren un nivel de $a_w > 0.93$ para su crecimiento. *Salmonella* es la causa etiológica en la mayoría de los brotes vinculados a los alimentos de baja a_w . Algunos estudios han comenzado a arrojar luz sobre los mecanismos por los cuales *Salmonella* sobrevive en un ambiente seco que está presente en las fábricas. Cuando *Salmonella* se encuentra en un producto alimenticio con baja a_w , es capaz de entrar en un estado de latencia en donde menos del 5% del genoma se logra transcribir (Finn *et al.*, 2015).

Tabla 1. Factores que afectan al crecimiento y la supervivencia de *Salmonella spp*

Parámetro	Intervalo de crecimiento		
	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	5°C	33-43°C	45-47°C
Actividad de agua	0.94	0.99	-
% NaCl	-	-	4-5%

Rodríguez y Santos, 2014.

1.6 Resistencia a estrés

Las células bacterianas pueden adaptarse normalmente a condiciones desfavorables para su crecimiento tras una breve exposición a estrés leve. Ejemplos de este fenómeno incluyen la respuesta de choque térmico y la respuesta de tolerancia a un medio ácido (Gahan y Hill, 1999). Varios estudios han intentado determinar si la adaptación de los patógenos a estos tipos de estrés puede afectar el resultado de la infección.

Respecto a la sobrevivencia de *Salmonella*, se sabe que crece bien en alimentos (especialmente si tienen un alto contenido de proteína como el pollo y el huevo), así como en superficies de la industria de alimentos. La habilidad de *Salmonella* para sobrevivir en la cadena agroalimentaria se debe en parte a su capacidad para responder efectivamente a los cambios medioambientales (Humphrey, 2004). La presencia de *Salmonella* en las superficies de plantas procesadoras de alimentos puede conducir a la contaminación de los productos alimenticios, aumentando el riesgo de infecciones transmitidas por alimentos tanto a animales como a humanos. Los serotipos de *Salmonella*, incluyendo *S. Agona*, *S. Montevideo* y *S. Senftenberg*, se sabe que logran sobrevivir y persistir por años en el entorno de las procesadoras de alimentos. En consecuencia, las fabricas generalmente implementan medidas estrictas de control, con base en el monitoreo bacteriológico del entorno de producción y de los productos finales (Habimana *et al.*, 2014). A pesar de que tradicionalmente se ha asociado a *Salmonella* con los alimentos de origen animal, productos alimenticios tales como frutas frescas, verduras y jugos de frutas se reconocen cada vez más como importantes fuentes de infección por *Salmonella enterica*. En Inglaterra y Gales *S. Typhimurium* es uno de los serotipos más importantes y responsable de

causar enfermedad en los humanos. Se ha detectado que *S. Typhimurium* DT104 es la cepa que se presenta con mayor frecuencia entre los animales criados para la producción de alimentos. Las técnicas de conservación intentan producir un entorno perjudicial para el crecimiento bacteriano en los productos alimenticios (Humphrey *et al.*, 2011).

Aunque el tracto digestivo es el hábitat natural de *S. enterica*, este patógeno infecta a su hospedero mediante la ingesta de comida contaminada, por lo que puede tener periodos prolongados de exposición al ambiente fuera del tracto digestivo, en los cuales debe de enfrentar cambios súbitos en las condiciones fisicoquímicas del entorno. El tipo de ambiente al cual se puede enfrentar *S. enterica*, además del hospedero, puede ser natural, incluyendo suelo y cuerpos de agua, y comercial que abarcaría entre otros, plantas de procesamiento de alimentos, rastros y refrigeradores de comercios (Winfield y Groisman, 2003). En dichos ambientes los cambios de pH, osmolaridad, temperatura, humedad, radiación, etc., son constantes. De manera importante, la respuesta de *S. enterica* a estas condiciones de estrés fuera del hospedero no sólo impactan a la sobrevivencia y el crecimiento del patógeno, sino que también pueden afectar la virulencia y la multi-resistencia a antibióticos (Altier, 2005; Clements *et al.*, 2001; Kenyon y Spector, 2012; McMahon *et al.*, 2007). Pocas bacterias patógenas son capaces de enfrentar de manera exitosa la amplia gama de condiciones de estrés presentes en los microambientes naturales, comerciales y del hospedero como lo hacen los distintos serotipos de *S. enterica* (Kenyon y Spector, 2012; Rychlik y Barrow, 2005).

S. enterica serotipo Typhimurium es de particular interés para la industria alimentaria debido a la gravedad de la enfermedad en humanos, que es capaz de provocar su resistencia a múltiples fármacos y a los extensos reservorios animales. La reducción del agua disponible en los alimentos es un método establecido para controlar el crecimiento bacteriano. La desecación o el aumento de un humectante en los alimentos dan lugar a una reducción de la actividad de agua. Estas bacterias son capaces de tolerar diversas condiciones estresantes y pueden sobrevivir en alimentos con baja a_w durante largos períodos. Se pueden incorporar varios solutos a los alimentos con el fin de reducir la a_w y mantener un margen de seguridad razonable antes de que se pueda producir el crecimiento de microorganismos. Posiblemente debido al ácido que se

produce después del estrés osmótico subletal, es que ha aumentado la preocupación sobre la supervivencia de las bacterias bajo estas condiciones (Mattick *et al.*, 2000).

Durante mucho tiempo se ha creído que la refrigeración y el tratamiento de los alimentos que tienden a bajar el pH o disminuir la actividad de agua son bacteriostáticos para *S. enterica*, pero de hecho se ha probado que éste no es el caso. Los alimentos con una $a_w < 0.93$ no permiten el crecimiento de *Salmonella* aunque puede sobrevivir largos periodos de tiempo en condiciones de baja a_w . Son inhibidas por concentraciones de 3-4% de NaCl pero la tolerancia a la sal aumenta en el intervalo de 10-30°C. La supervivencia en medios con baja a_w es una característica de estos microorganismos. Por ejemplo, pueden sobrevivir en chocolate (a_w 0.3 – 0.5) durante meses. En estas condiciones, puede aumentar considerablemente su resistencia al calor (CAE, 2008). También se ha documentado la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir por largos periodos de tiempo en otros productos con baja a_w , por ejemplo, cáscaras de almendras secas, mantequilla de cacahuate, leche en polvo, polvo de cacao y productos de alimentación de las aves de corral, incluso en la nuez (Margas *et al.*, 2014).

Siendo *Salmonella* un patógeno intracelular en animales de sangre fría y caliente, tiene que sobrevivir en un rango de condiciones de estrés ambiental tanto dentro como fuera de un hospedero. La capacidad de realizarlo es en parte gobernada por reguladores transcripcionales con alta capacidad de respuesta. Éstos responden a estímulos específicos y encienden una cascada de señalización para contrarrestar la tensión dada. Las tensiones ambientales, que dañan la membrana externa o interrumpen la homeostasis periplásmica de bacterias Gram-negativas conducen a la estimulación de la envoltura de respuesta al estrés (ESR). La ESR se compone parcialmente de un mínimo de 5 sistemas superpuestos, siendo estos el factor sigma alternativo σ^E (RpoE), dos componentes reguladores CpxAR y BaeSR, las proteínas de choque de fago (PspABCDEF) y el sistema fosforilativo RcsCDB (Appia-Ayme *et al.*, 2011).

Humphrey y colaboradores examinaron la capacidad de las cepas de *S. Typhimurium* SL1344 y DT104 para recuperarse de la exposición prolongada al ambiente común de producción de alimentos, como la reducción de a_w , y la temperatura de refrigeración (6°C). La exposición a NaCl (685 mM) fue seleccionado para simular la a_w reducida, tal condición se encuentra en los alimentos con alto contenido de sal, como es el caso del tocino. La exposición al estrés por

temperatura baja (6°C) se utilizó para medir la recuperación de *Salmonella* después de haber estado bajo refrigeración. Se encontró que *S. Typhimurium* SL1344 como DT104 son capaces de reanudar el crecimiento exponencial y la división celular normal, tras recuperarse de una lesión inducida por el estrés dentro de las 6 horas posteriores a la eliminación del medio estresante (Humphrey *et al.*, 2011).

En un estudio, 38 cepas Typhimurium/DT104 fueron examinadas por su capacidad para sobrevivir a una exposición al calor y al estrés ácido, así como la supervivencia en superficies, siendo clasificadas como sensibles o resistentes (Jørgensen *et al.*, 2000). En otro estudio, 7 cepas Enteritidis/PT4 fueron identificadas como sensibles, tras ser expuestas a tensiones de calor, ácido, secado al aire en superficies y secado con peróxido de hidrógeno, alterando de esta manera su virulencia (Humphrey *et al.*, 1995). Ambos estudios se centran en la comparación al estrés ácido y exposición al calor con la supervivencia en superficies.

La baja temperatura es uno de los métodos más utilizado para inhibir el crecimiento de patógenos y el deterioro de microorganismos, ya sea en la forma de enfriamiento rápido o como depósitos a largo plazo a temperaturas de refrigeración. Un número de condiciones de estrés pueden causar daños y mal plegamiento de las proteínas, representando una amenaza para la bacteria (Knudsen *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las células de *Salmonella* pueden entrar en un estado fisiológico de latencia en la que siguen siendo activas metabólicamente y por lo tanto pueden presentar una fase de crecimiento exponencial posterior. Las células que se encuentran en estado de latencia pero que son metabólicamente activas son capaces de recuperarse y multiplicarse para lograr causar una infección se definen como células viables pero no cultivables (VBNC), mientras que aquellas que no son cultivables pero son metabólicamente activas se definen como activas pero no cultivables (ABNC). Un estado no cultivable puede ser inducido por factores de estrés tales como temperatura subóptima, estrés osmótico o falta de nutrientes. Los entornos de procesamiento de alimentos son conocidos por manejar diferentes temperaturas y humedades, por lo tanto podrían inducir potencialmente un estado de VBNC en *Salmonella*. Se ha demostrado que las células VBNC pueden resucitar y crecer en agar nutritivo después de la exposición al choque térmico, antioxidantes, compuestos de H₂O₂ degradantes y la incubación en medios

nutricionales. Curiosamente, la presencia específica de moléculas secretadas por células cultivables es lo que permite que sean células viables. Existe un factor de reanimación secretada por *Salmonella* serotipo Typhimurium LT2 el cual permite persistir durante años en entornos de procesamiento de alimentación (Habimana *et al.*, 2014).

1.7 Formación de células filamentosas

Las bacterias han evolucionado en organismos con sistemas más complejos para mantener morfologías celulares consistentes; sin embargo, en ciertas circunstancias, las bacterias alteran este proceso altamente regulado para transformarse en organismos filamentosos. Existen pruebas de los papeles biológicos importantes para la filamentación en entornos de estrés, incluyendo a los sitios de interacción entre bacterias patógenas y sus hospederos. La filamentación podría representar una respuesta destinada a señales ambientales específicas que promueven la supervivencia en medios donde las bacterias se sientan amenazadas (Justice *et al.*, 2008). La formación de filamentos conduce a un aumento en la biomasa total sin ningún aumento en el número de células. Naturalmente, esto presenta un problema para los fabricantes de alimentos. Si la filamentación bacteriana se produce dentro de un producto alimenticio podría conducir a la subestimación del número de células potenciales; como la formación de filamentos largos no aumentan las CFU cuando se prueba utilizando métodos microbiológicos convencionales. El uso de una etapa de enriquecimiento puede permitir que se produzca una etapa de septación lo cual resulta en un número superior de células patógenas (Finn *et al.*, 2013).

La refrigeración, los métodos que disminuyen el pH de los alimentos, así como la disminución de actividad de agua son condiciones que pueden inhibir la septación y la división celular, pero no detienen el crecimiento bacteriano o la replicación del cromosoma (Humphrey, 2004). En situaciones de estrés osmótico, las bacterias se dividen en dos subpoblaciones: uno se adapta y crece de manera exponencial, mientras que el otro no prolifera. Esto puede ser debido a que las células mueren o se encuentran en un persistente estado viable, pero no cultivable (George *et al.*, 2015).

El crecimiento continúa en estas condiciones, como lo muestra el incremento de biomasa y se forman grandes filamentos multinucleados (>200 μm). Este comportamiento se ha reportado en los serotipos Enteritidis y Typhimurium, en cierto tipo de alimentos, a bajas temperaturas y bajos valores de a_w (Mattick *et al.*, 2003).

Se sabe que el crecimiento de bacterias filamentosas en forma de bastón se produce en condiciones subóptimas donde la división celular se inhibe, a pesar de que el crecimiento no se ve afectado. Diferentes serotipos de *S. enterica* forman filamentos durante el crecimiento en condiciones hiperosmóticas, así como en ambientes alcalinos o ácidos durante la refrigeración de los alimentos. *Salmonella* es capaz de generar filamentos a valores de a_w de 0.92 a 0.96 en medios suplementados con glicerol, sacarosa o NaCl (Pratt *et al.*, 2012).

Cuando las bacterias se exponen a un entorno de baja a_w , deben equilibrar la osmolaridad interna de la célula con la del ambiente externo con el fin de evitar la pérdida de agua. Las bacterias poseen numerosos mecanismos celulares que están involucrados en este proceso de osmoregulación, como los osmoprotectores, tales como prolina, glicina-betaína, y ectoína que pueden facilitarle a la célula bacteriana limitar la pérdida de agua. Los osmoprotectores pueden concentrarse en altos niveles tanto dentro como fuera de las bacterias. Los principales transportadores de éstos son ProP (MFS permeasas), Prou y OSMU. Se ha demostrado que estos transportadores desempeñan un papel importante durante la exposición a medios con baja a_w . En estas condiciones se ha observado la biosíntesis de la trealosa, la cual es un soluto compatible con la osmo-adaptación en *Salmonella*. Se ha propuesto que las células derivan energía por medio del catabolismo de los ácidos grasos, siendo de elevado costo para la bacteria, pero efectiva fuente de energía para la producción de ATP. También existe una regulación sobre los genes implicados en la formación de complejos Fe-S, ya que se han detectado durante la desecación, dicha regulación puede estar vinculada a un aumento de la energía demandada la cual se obtiene a través de la cadena de transporte de electrones. Se sabe que el K^+ y glutamato estimulan la producción y el transporte de osmoprotectores.

En respuesta a un estrés por baja a_w , existe también la expresión de dos porinas de membrana, OmpF y OmpC, que son vías alternativas de regulación externa. Estas porinas están involucradas en la difusión pasiva de osmoprotectores (Finn *et al.*, 2013), en altas

concentraciones de sal, la porina OmpF se sustituye por la porina OmpC que forma poros de la membrana externa con un diámetro menor, disminuyendo así la afluencia de solutos en el periplasma (Rychlik y Barrow, 2005). También existen factores sigma alternativos (σ^S y σ^E) relacionados con la supervivencia durante la inanición y las condiciones de estrés osmótico, pero su importancia va a depender de la composición del medio ambiente donde se encuentre la bacteria, se sabe que la importancia del factor alternativo σ^E radica en que otorga a *Salmonella* tolerancia a la deshidratación. La formación de filamentos puede ocurrir debido a la inhibición de las proteínas de la división celular como resultado del estrés osmótico. Sin embargo, varios autores plantearon la hipótesis de que *Salmonella* puede producir inhibidores de la división celular en respuesta al estrés osmótico con el fin de obtener una ventaja de supervivencia (Finn *et al.*, 2013) (Fig. 3).

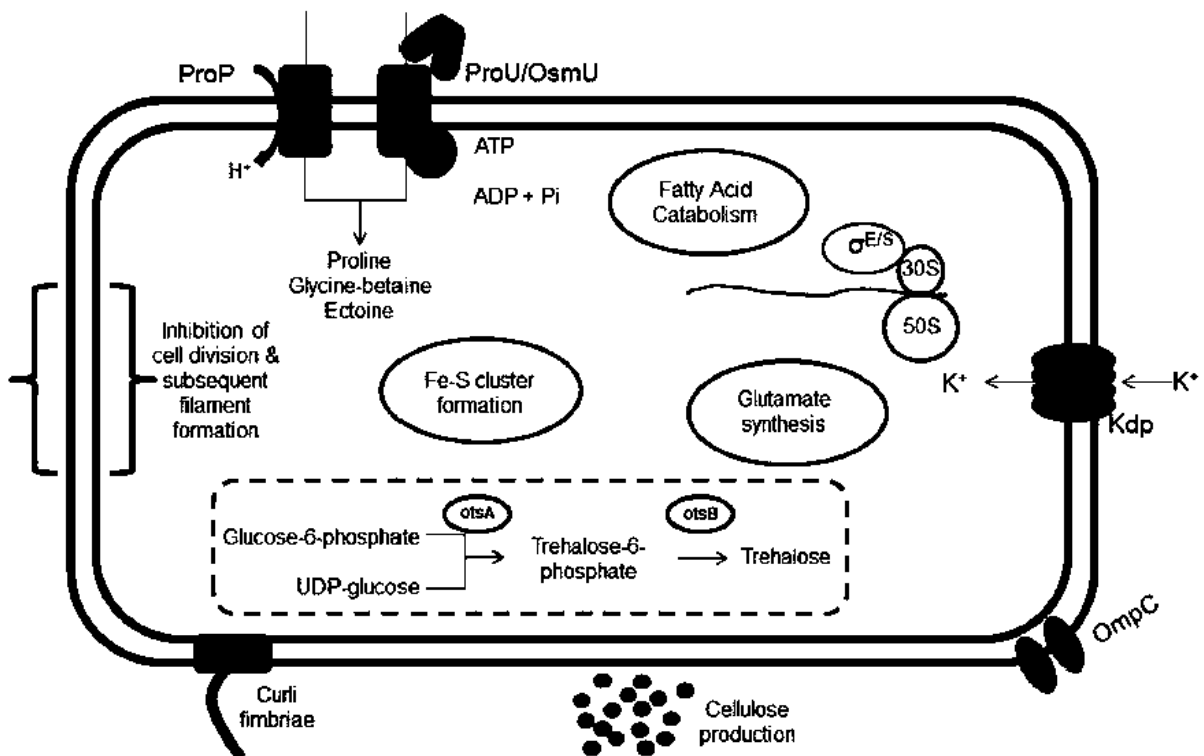


Figura 3. Respuesta de las células bacterianas durante la exposición a ambientes con baja aw. (Finn *et al.*, 2013).

1.8 Caracterización fenotípica de Enterobacterias

1.8.1 Microarreglos metabólicos

Un aspecto clave del estudio microbiológico involucra la determinación de características fenotípicas de las células microbianas. Las pruebas fenotípicas deben realizarse bajo condiciones perfectamente estandarizadas para obtener resultados reproducibles (Van Damme *et al.*, 1996).

La Microestación Biolog es un semiautomatizado apropiado para los estudios denominados Microarreglo de Fenotipos (MFs) y está conformada por un lector de microplacas compatible que puede leer automáticamente y en unos cuantos segundos los patrones de oxidación y de asimilación desarrollados en las microplacas con 95 fuentes carbohidratos, nitrógeno y azufre. Cada pozo de la placa contiene violeta de tetrazolio el cual es utilizado como colorante redox para indicar la utilización de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, por cada una de las cepas estudiadas. Aquellos pozos en los que el sustrato puede ser metabolizado por la cepa analizada, la respiración de las células provoca la reducción del tetrazolio, generando una coloración púrpura. En los pozos en los que no se presenta respiración celular el tetrazolio no es modificado y permanece incoloro, al igual que el pozo control que posee agua. Para detectar el cambio o no de color, al término de la incubación la absorbancia de cada pozo de la placa es leído a 570 nm mediante el lector de placas Biolog. (Klingler *et al.*, 1992).

El panel de prueba GEN III microplaca™ proporciona un método estandarizado donde se analizan los microorganismos en 94 pruebas fenotípicas: ensayos de utilización de 71 fuentes de carbono (Fig. 4, columnas 1-9) y 23 ensayos de sensibilidad química (Fig. 4, columnas 10-12).

El panel de prueba proporciona una “huella digital fenotípica” del microorganismo que puede ser utilizado para identificarlo a nivel de especie. Todos los nutrientes y productos bioquímicos necesarios están precargados y secados en los 96 pocillos de la microplaca. El azul de tetrazolio se utiliza para indicar colorimétricamente la utilización de las fuentes de carbono o la resistencia a productos químicos inhibitorios (Biolog Inc., 2013).

GEN III MicroPlate™

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D-Maltose	A4 D-Trehalose	A5 D-Cellobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 8
B1 D-Raffinose	B2 α-D-Lactose	B3 D-Melibiose	B4 β-Methyl-D-Glucoside	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl-D-Glucosamine	B7 N-Acetyl-β-D-Mannosamine	B8 N-Acetyl-D-Galactosamine	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid	B10 9% NaCl	B11 4% NaCl	B12 25% NaCl
C1 α-D-Glucose	C2 D-Mannose	C3 D-Fructose	C4 D-Galactose	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D-Mannitol	D3 D-Fructitol	D4 myo-Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose-6-POM	D7 D-Fructose-6-POM	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Tetrahydrozoin	D11 Ribosylin 5V	D12 Minocycline
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L-Proline	E3 L-Alanine	E4 L-Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L-Pyrogutamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Mycopof 4
F1 Pectin	F2 D-Galacturonic Acid	F3 L-Galactonic Acid Lactone	F4 D-Glucuronic Acid	F5 D-Glucuronic Acid	F6 Glucuronamide	F7 Malic Acid	F8 Quinic Acid	F9 D-Saccharic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetracycline Violet	F12 Tetracycline Blue
G1 p-Hydroxy-Pyruvic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α-Keto-Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo-Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ-Amino-Butyric Acid	H3 α-Hydroxy-Butyric Acid	H4 β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	H5 α-Keto-Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Acetronam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

Figura 4. Sustratos presentes en la microplaca GEN III (Fuente: www.biolog.com).

1.9 Ventajas de la combinación del análisis genético y la caracterización fenotípica de *S. enterica*

La tipificación genética de *S. enterica* se ha utilizado en combinación con estudios fisiológicos y bioquímicos, generando así información valiosa para entender mejor la biología de cepas y clones de relevancia en salud pública; también aporta información sobre los mecanismos de diversificación y adaptación de éstas. Así, al analizar dos cepas del serotipo Enteritidis que tienen un 99.99% de identidad genética, el sistema de microarreglos fenotípicos de Biolog mostró que aquella cepa capaz de formar biofilms e infectar huevos era metabólicamente más activa que la cepa que no podía infectar huevos (Bochner *et al.*, 2008), dicho hallazgo fue utilizado como guía para seleccionar cepas para el análisis genómico.

La resecuenciación de genomas guiada por el análisis fenotípico permitió encontrar mutaciones que alteraban la estructura de proteínas de funciones conocidas entre las cepas comparadas. Los microarreglos fenotípicos también fueron la base para encontrar que el operón

de D-serina es un sitio “caliente” de variación genética en el serotipo Enteritidis, debido a una deleción de 10 pb que interrumpe el marco de lectura del gen *dsdA* dentro de dicho operón (Bochner *et al.*, 2008).

El análisis genómico de cepas del serotipo Enteritidis ha mostrado alteraciones en el operón *sefABCD* en cepas del mismo fagotipo; dicho operón está involucrado en el ensamble de la fimbria y ha sido relacionado con patogenicidad. Mutantes de este fagotipo en el operón *sefABCD* han mostrado deficiencias en sus capacidades metabólicas, evidenciadas mediante el análisis de microarreglos fenotípicos de Biolog (Morales *et al.*, 2012). En particular, la ausencia del gen *sefD* dentro de dicho operón ha sido relacionada con virulencia, al facilitar el crecimiento dentro del hospedero mediante el aprovechamiento de una gran variedad de sustratos (Morales *et al.*, 2012).

El análisis de microarreglos fenotípicos de cepas del serotipo Typhimurium del genotipo DT104 multirresistente a antibióticos y relacionado con epidemias, mostró que las cepas de dicho genotipo presentan cambios únicos en el metabolismo de la histidina y el glioxilato, los cuales no se presentan en la cepa de referencia LT2 del mismo serotipo. Las cepas DT104 son capaces de utilizar la histidina como fuente de carbono y nitrógeno, lo cual no puede hacer las cepas LT2 debido a una mutación que modifica el marco de lectura del gen *hutU*. Por otra parte, las cepas DT104 resistentes a cinco antibióticos son incapaces de metabolizar glioxilato como fuente de carbono, debido probablemente a la pérdida de una región del cromosoma que contiene los genes involucrados en esta ruta metabólica, ya que una cepa de este genotipo que posee dichos genes es capaz de metabolizar el glioxilato. A la fecha se desconoce la significancia de esta región genética en el incremento de la virulencia y sobrevivencia dentro del hospedero, algo que sin duda es interesante de investigar (Bochner *et al.*, 2008).

Los datos anteriores muestran la importancia de la vinculación entre datos fenotípicos y genotípicos en el estudio de cepas de *S. enterica*, particularmente del uso de fuentes de C y N y de resistencia a antibióticos con la presencia de mutaciones en regiones genéticas específicas. Dichas correlaciones permiten generar hipótesis sobre procesos microevolutivos dentro de *S. enterica*, elucidar mecanismos para la aparición de cepas virulentas o adaptadas a hospederos específicos, generar marcadores para la detección de dichas cepas y conocer las variaciones

presentes dentro de una población asociada a brotes, entre otras aplicaciones. Eisenstark y colaboradores (2002) examinaron aislados de *Salmonella* que habían sido almacenadas en agar blando a temperatura ambiente durante 40 años. Por pruebas de C y N mediante fenotipos metabólicos con placas PM1 y PM3, determinaron que muchas cepas habían perdido funciones metabólicas, mientras que otras las habían ganado debido a alteraciones genéticas (Bochner, 2009).

El análisis genómico, en combinación con modelos de infección animal y generación de mutantes, ha permitido encontrar genes no canónicos relacionados con la respuesta a estrés y la virulencia en *S. Typhimurium* (Chaudhuri *et al.*, 2013). Por otra parte, existen genes bien identificados que participan de la respuesta a estrés en *S. enterica* y otras enterobacterias patógenas (Humphrey, 2004). Los resultados derivados de dichos trabajos permiten buscar mutaciones en regiones genéticas específicas de cepas de otros serotipos de *S. enterica* y relacionar estos cambios genéticos con la capacidad de sobrevivencia fuera del hospedero.

Kauco y colaboradores (2010), analizaron distintas cepas de *Salmonella*, entre seis cepas de *S. Typhimurium*, se detectó la actividad metabólica mediante la actividad respiratoria de DT1, DT40 y DT104 y observaron que éstas diferían en 10 sustratos: ácido tartárico, m-inositol, ácido glioxílico, L-alanina, L-ramnosa, ácido itacónico, L-prolina y en dipéptidos Met-Phe, Asp-Trp y Trp-Glu. La cepa DT104 no pudo asimilar ácido glioxílico y m-inositol como fuentes de carbono. Tres de las seis cepas de *S. Typhimurium* DT1 que fueron analizadas eran genotipo STYMXB.0098 y mostraron heterogeneidad, una de las cepas aisladas en 1995 resulto ser fenotipo positivo para L-prolina, Trp-Glu, Asp-Trp y Met-Phe. Entre todas las cepas analizadas, *S. Typhimurium* DT1 mostró un fenotipo negativo para L-ramnosa. Sin embargo, el fenotipo L-ramnosa-negativo no se pudo confirmar cuando fue sometida a una prueba de crecimiento convencional en medio líquido mínimo que contiene 22 mM de L-ramnosa. Siete de nueve cepas de *S. Agona* no pudieron utilizar ácido D-galactónico γ -lactona. Dos cepas de *S. Agona* que fueron analizados en placas PM1 y PM10, asimilaron la D-tagatosa, en contraste con la totalidad de las cepas *Typhimurium* probadas. Tres de las nueve cepas de *S. Agona* mostraron actividad respiratoria retardada en L-prolina después de 15 h de incubación.

1.10 Antecedentes

En el estado de Michoacán ya se han realizado análisis para evaluar la diversidad genética en aislados de *S. enterica* haciendo uso de diferentes marcadores moleculares.

En un estudio realizado en el 2011, Regalado-Pineda (2011) evaluó la diversidad genética de 130 aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos en el estado de Michoacán durante los años 2008 y 2009. Mediante la serotipificación convencional se encontraron 34 serotipos diferentes. El dendrograma generado mediante marcadores obtenidos de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) mostró 28 genotipos distintos a un corte de similitud de un 95%. En dicho estudio no se encontró correlación entre los genotipos y el tipo de muestra de procedencia del aislado, la localidad de origen o el serotipo. Al analizar los genotipos de los serotipos mayoritarios (Typhimurium, Anatum y Agona) se encontró que algunos de éstos tienen una amplia distribución geográfica en el estado de Michoacán, mientras que otros se encuentran restringidos a ciertas áreas.

En otro estudio realizado por Vázquez-Narváez (2012) se evaluó la diversidad genética de algunos de los aislados de *S. enterica* utilizados en el estudio de Regalado-Pineda. Se tipificaron un total de 102 aislados haciendo uso de tres marcadores moleculares basados en la amplificación de elementos repetitivos ERIC, REP y BOX. El análisis de agrupamiento realizado empleando dichos marcadores mostró un número diferente de genotipos para cada ensayo a un corte de similitud de 95%. Para el ensayo REP se encontraron 19 genotipos, con el marcador BOX 20 genotipos y para ERIC 22 genotipos. También, se encontraron diferentes valores de poder de discriminación, para REP se obtuvo un poder de discriminación de 0.953, para BOX el índice de discriminación fue igual a 0.964 y para ERIC de 0.959. Se realizó el análisis de agrupamiento mediante la combinación de estos tres marcadores y el análisis arrojó al mismo nivel de corte, un total de 44 genotipos y un índice de discriminación de 0.984. Los resultados obtenidos de este estudio muestran que los ensayos de amplificación de elementos repetitivos presentan un alto nivel de discriminación entre los aislados de estudio y los patrones de agrupamiento de los dendrogramas generados sugieren que varios de los genotipos de *Salmonella enterica* encontrados tienen una gran capacidad de dispersión por el estado de Michoacán. Estas mismas cepas fueron tipificadas también mediante MLST. Inocencio-Velázquez (2013), encontró 20

secuencias tipo (ST) diferentes y 2 ST no determinadas con una amplia distribución geográfica mundial, así como su persistencia en una amplia variedad de hospederos y contaminando varios alimentos y muestras de medio ambiente. Se logró asignar serotipos a algunos aislados que sólo se encontraban confirmados a nivel de serogrupo y se observó la presencia de un grupo clonal. Tanto los árboles de mínima expansión como los grupos eBG formados con las ST de los aislados de *S. enterica* aquí estudiados, sugieren que la ST19 puede ser la fundadora original de la población estudiada para Michoacán.

Maldonado-Ruiz (2015), realizó la determinación del perfil de virulencia (PV) de dichas cepas, que permitieron conocer el potencial patogénico y tener una idea más clara de las relaciones genéticas entre los aislados de estudio. Se encontraron 8 PV diferentes, los cuales se asignaron con números del 1 al 8, siendo el PV 1 el de mayor potencial patogénico, ya que contiene todos los genes de virulencia analizados y tiene una amplia distribución en el estado. Seguido del PV2. Adicionalmente, se pudieron establecer correlaciones entre la presencia de genes de virulencia en un aislado con su procedencia geográfica, el serotipo o el genotipo, lo cual sería de gran ayuda para entender la dinámica de dispersión de *S. enterica* en alimentos en el estado de Michoacán.

2. JUSTIFICACIÓN

Aunque *Salmonella* ha sido reconocida como causa de enfermedad intestinal 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 así como el responsable de ocasionar brotes. Esta bacteria tiene un impacto importante tanto en la economía como en el sector salud. En México un alto porcentaje de las enfermedades diarreicas son originadas por alimentos contaminados, provocando una alta morbilidad principalmente en la población infantil y en adultos mayores. Uno de los principales patógenos asociados a la transmisión de enfermedades por alimentos contaminados es *S. enterica*. Los estudios realizados sobre *S. enterica* en México generalmente se enfocan en el registro de la incidencia y la identificación de los serotipos. Las herramientas de genética molecular han sido utilizadas ya por más de 20 años para la tipificación, el diagnóstico y el análisis epidemiológico de *S. enterica*. En la actualidad existe una amplia gama de técnicas que permiten la diferenciación de cepas relacionadas con brotes y la relación epidemiológica entre aislados de *S. enterica* (Foley *et al.*, 2009; Wattiau *et al.*, 2011). La tipificación genética de aislados de *S. enterica* provenientes de alimentos permite establecer relaciones con cepas obtenidas de infecciones y brotes, ayudando a una rápida identificación de la fuente de contaminación para el establecimiento de medidas de prevención y control. Si además se combina este tipo de tipificación con la caracterización fenotípica, se posibilita un mejor entendimiento del comportamiento epidemiológico y de la capacidad de dispersión de una bacteria patógena.

Nuestro grupo de trabajo posee una colección de 100 cepas pertenecientes a distintos serotipos que han sido tipificadas mediante MLST y elementos genéticos repetitivos (REP, ERIC, BOX), las cuales aún no están caracterizadas a nivel metabólico y de respuesta a estrés. Es por todo lo anterior que en este proyecto se realiza la caracterización fenotípica de cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos contaminados, dicha tipificación genética previa, junto con el análisis fenotípico este proyecto será de utilidad como guía para la selección de cepas para secuenciación genómica en estudios posteriores.

3. HIPÓTESIS

Las cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium aisladas de alimentos en el estado de Michoacán que tienen una mayor diversidad metabólica, son más resistentes a las condiciones de estrés asociadas a la preservación de alimentos.

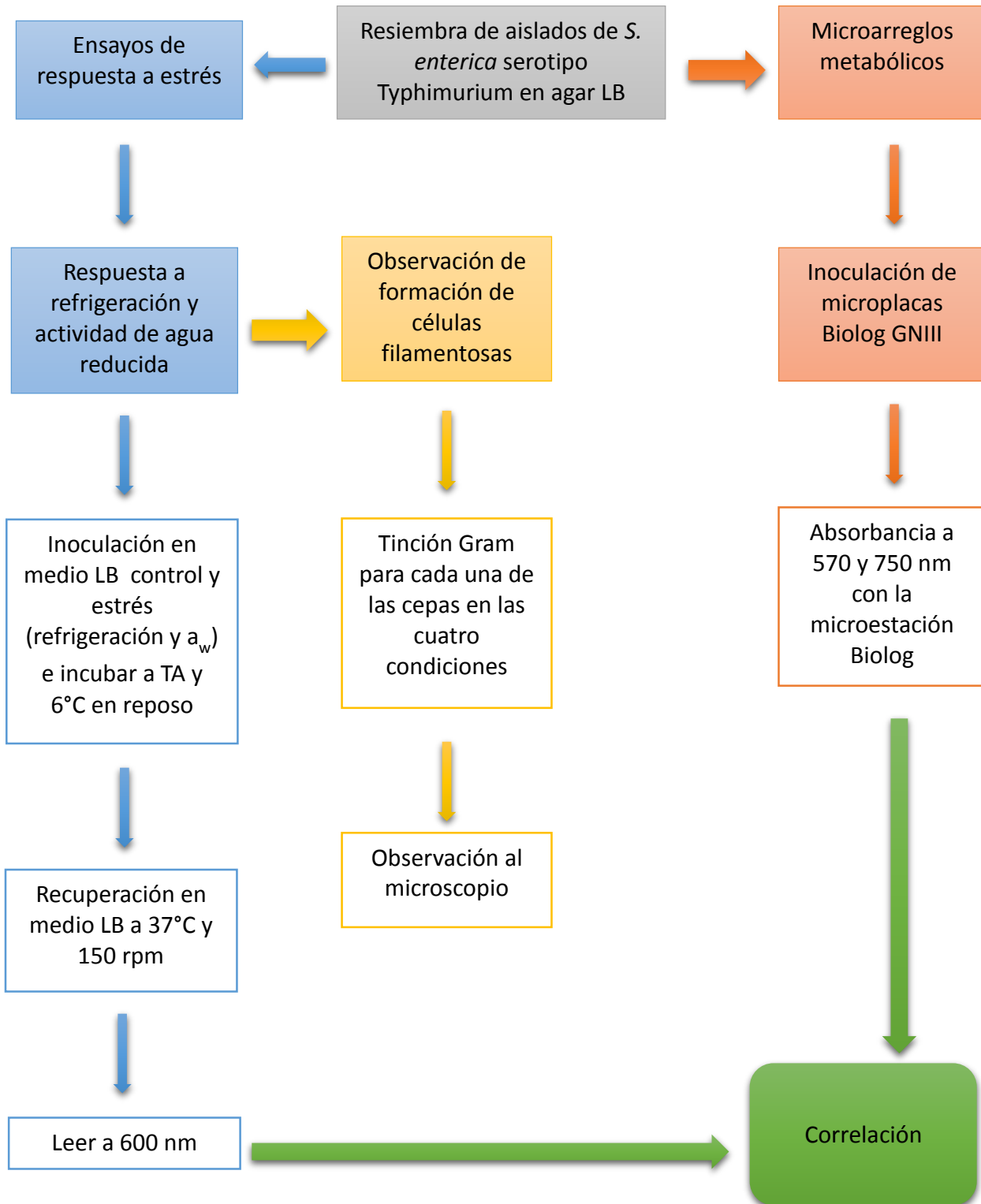
4. OBJETIVOS

Objetivo General. Analizar los perfiles metabólicos y el patrón de resistencia a condiciones de estrés asociadas a la preservación de alimentos, en cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium aisladas de productos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán.

Objetivos Específicos

- Caracterizar la capacidad de las cepas de *S. enterica* para recuperarse de la temperatura de preservación de alimentos.
- Estudiar la capacidad de las cepas de *S. enterica* para recuperarse de una actividad de agua reducida.
- Determinar los patrones de utilización de fuentes de carbono de las cepas de estudio.
- Encontrar las posibles correlaciones entre la diversidad metabólica y la resistencia a estrés en las cepas de estudio.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se utilizaron 16 cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium aisladas de productos cárnicos y lácteos del estado de Michoacán por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Michoacán durante los años del 2008 al 2011 (Tabla 2).

Tabla 2. Aislados de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium utilizados en el presente estudio.

Aislado	ST	PV	MUNICIPIO	AÑO	PRODUCTO
4	19	1	Ciudad Hidalgo	2009	Queso Fresco
16	213	1	Morelia	2009	Carne de Res
21	213	1	Lázaro Cárdenas	2009	Chorizo
24	213	1	Lázaro Cárdenas	2009	Chorizo
28	213	1	Uruapan	2009	Chorizo
39	213	1	Apatzingán	2008	Carne de Res
54	292	1	Tacámbaro	2009	Carne de Res
69	213	1	Lázaro Cárdenas	2009	Carne de Res
89*	213	2	Charo	2008	Chorizo
96	213	1	Zamora	2008	Carne de Res
109	213	1	Zamora	2009	Carne de Res
115	213	1	Tanhuato	2009	Queso Asadero
116	213	1	Tanhuato	2009	Queso de Puerco
127	213	1	La Piedad	2008	Carne de Res
144	213	1	Lázaro Cárdenas	2010	Chorizo
196	213	1	Pátzcuaro	2011	Chorizo

Nota: Todos los productos cárnicos fueron obtenidos de productos crudos, excepto el aislado número 89* que provenía de producto guisado.

De los 16 aislados de *S. Typhimurium* se cuentan con 3 Secuencias Tipo (ST) diferentes, 1 aislado perteneciente a la ST 19, 14 aislados de la ST 213 y 1 aislado de la ST 292 (Fig. 5).

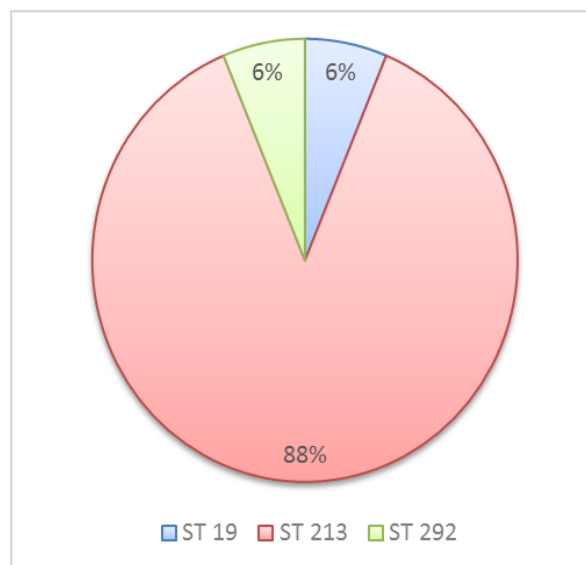


Figura 5. Porcentajes de Secuencias tipo de *S. Typhimurium* utilizadas en el estudio.

6.2 Ensayos de recuperación a condiciones de refrigeración y actividad de agua reducida (a_w)

Para los ensayos de resistencia a estrés se empleó el protocolo empleado por Humphrey *et al.* (2006), el cual se describe a continuación. Las cepas de *S. enterica* se expusieron a condiciones comunes en la producción o preservación de alimentos, particularmente a una actividad de agua (a_w) reducida y condiciones de refrigeración. El medio empleado para los ensayos de resistencia a estrés fue el Luria-Bertani (LB) a pH 7.0 adicionado con NaCl 658 mM para simular condiciones de a_w reducida (LB a_w), lo cual genera un valor de presión de vapor relativa de 0.98 (Mattick *et al.*, 2000). Se utiliza medio LB 170 mM NaCl, pH 7.0 como medio control. Posteriormente se obtienen pre-cultivos de 16 h inoculando 10 mL de LB con tres colonias proveniente de medio LB sólido, incubando a 37°C y 150 rpm. Una vez concluido el tiempo de incubación los cultivos se centrifugan a 1360 g durante 4 min y la pastilla de bacterias resultante se re-suspende en medio LB (control) o medio LB a_w (estrés). Dichos cultivos se incuban de manera estática durante 8 días a temperatura de refrigeración (6°C) y a temperatura ambiente (TA) (22°C). Al término del periodo de incubación los cultivos en LB y LB a_w se diluyen 1: 200 (v/v) en 10 mL de LB a 98% de Transmitancia (T), permitiendo su recuperación a 37°C y 150 rpm

durante 6 h. Se toman alícuotas de 200 μ l de dichos cultivos en recuperación cada 2h, las cuales se diluyen 1:3 (v/v) en buffer salino de fosfato (PBS) para medir la densidad óptica a 600 nm con la finalidad de evaluar la rapidez de recuperación de cada cepa. Se obtienen las cinéticas de crecimiento y velocidades de crecimiento.

6.3 Tratamiento estadístico.

Para determinar si las diferencias entre las velocidades de crecimiento de una misma cepa con respecto a su control eran significativas, se aplicó una ANOVA de dos vías utilizando la prueba de Dunnet con una significancia de $p \leq 0.05$. Para determinar si las diferencias entre las velocidades de crecimiento de todas las cepas en una misma condición eran significativas, se aplicó una ANOVA de dos vías, utilizando la prueba de Tukey con una significancia de $p \leq 0.05$. Se empleó el programa GraphPad Prism 7.0.

6.4 Observación de formación de células filamentosas

A partir de los ensayos de estrés y bajo las mismas condiciones se sometieron las 16 cepas del estudio para visualizar la formación de células filamentosas. Se tomaron alícuotas a las 0 y 4 h de recuperación después de los 8 días de exposición a estrés para realizarles tinción de Gram. Las laminillas teñidas se observan en el microscopio marca Leica ICC50 HD a 100X, que cuenta con el programa Leica Application Suite 3.00 para la obtención de imágenes.

6.5 Ensayos de utilización de sustratos mediante el Sistema Biolog

Se siembran las cepas de interés en medio LBA (Medio Luria-Bertani Agar), estriando por cuadrantes para obtener colonias aisladas y se incuban 24 h a 37°C; posteriormente se resiembra en el medio de crecimiento universal de Biolog, BUG™ (Biolog, Inc.), durante 24 h a 37°C. Se prepara un inóculo líquido, usando el fluido de inoculación (FI) designado por el fabricante como GN/GP-IF, a dicho fluido se le agregan 3 gotas de tioglicolato de sodio concentrado (7.6%) quedando a una concentración final de 5 mM. Para ajustar el inóculo líquido a una T del 61% utilizando el estándar de turbidez GN-ENT & AN. Se humedece un hisopo estéril en el FI y se levantan las colonias bacterianas del agar mediante un desplazamiento por rotación, se sumerge

el hisopo en el FI para resuspender las colonias. Este procedimiento se repite hasta tener una densidad de 61% T (\pm 2%). El inóculo preparado se vierte en un reservorio de pipeta multicanal estéril y se toma por medio de una pipeta de ocho canales colocando 150 μ L en cada uno de los 96 pozos de las microplacas GNIII. Las placas se incuban a 37°C realizando lecturas a 590 y 750nm a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 160 h posteriores a la incubación, en Biolog MicroStation, utilizando el programa Microlog3™ Release 4.20. Los resultados de utilización de sustratos de cada uno de los pozos se reportan como 0 cuando no hay detección de cambio de color en el pozo o como 1 cuando se ve cambio de color. Con estos datos se construye una matriz dicotómica de 0 y 1. Otros datos de utilización son los obtenidos de las absorbancias. Con los datos obtenidos se construye un mapa de calor por medio del programa Multi Experiment Viewer TM4, en el que el rojo indica alta utilización y el verde indica baja utilización del sustrato analizado, para carbohidratos el rango de absorbancia de menor utilización fue de 0.0-0.062 y el rango de mayor utilización fue de 0.063-0.086. Para hexosas el rango de absorbancia de menor utilización fue de 0.0-0.074 y el rango de mayor utilización fue de 0.075-0.084. Para ácido hexosas el rango de absorbancia de menor utilización fue de 0.0-0.047 y el rango de mayor utilización fue de 0.048-0.079. Para aminoácidos el rango de absorbancia de menor utilización fue de 0.0-0.074 y el rango de mayor utilización fue de 0.075-0.115. Para ácidos carboxílicos, ésteres y ácidos grasos el rango de absorbancia de menor utilización fue de 0.0-0.04 y el rango de mayor utilización fue de 0.05-0.084.

6.6 Correlación entre resistencia a estrés y metabolismo

Para saber si existe correlación entre la resistencia a estrés y el metabolismo de *S. Typhimurium* se aplicó una prueba estadística mediante la prueba de Pearson con intervalo de confianza de 95% utilizando el programa Graphad Prism 7.0.

7. RESULTADOS

7.1 Capacidad de recuperación al estrés por refrigeración y actividad de agua reducida (a_w)

Se obtuvieron Cinéticas de Crecimiento en la fase de recuperación de las distintas condiciones de exposición a estrés, siendo estas condiciones a. Temperatura ambiente (TA); b. TA y Actividad de agua reducida (a_w); c. 6°C y d. 6°C y a_w .

Después de someter a TA, las cepas 028, 039, 054, 115, 116, 127, 144 y 196 (50%) se recuperaron más rápidamente que las cepas 004, 016, 021, 024, 069, 089, 096 y 109 (50%) que mostraron un menor crecimiento en la segunda hora comenzando en este tiempo su fase exponencial. Sin embargo, las 16 cepas lograron un crecimiento similar a las seis horas de recuperación (Fig. 6).

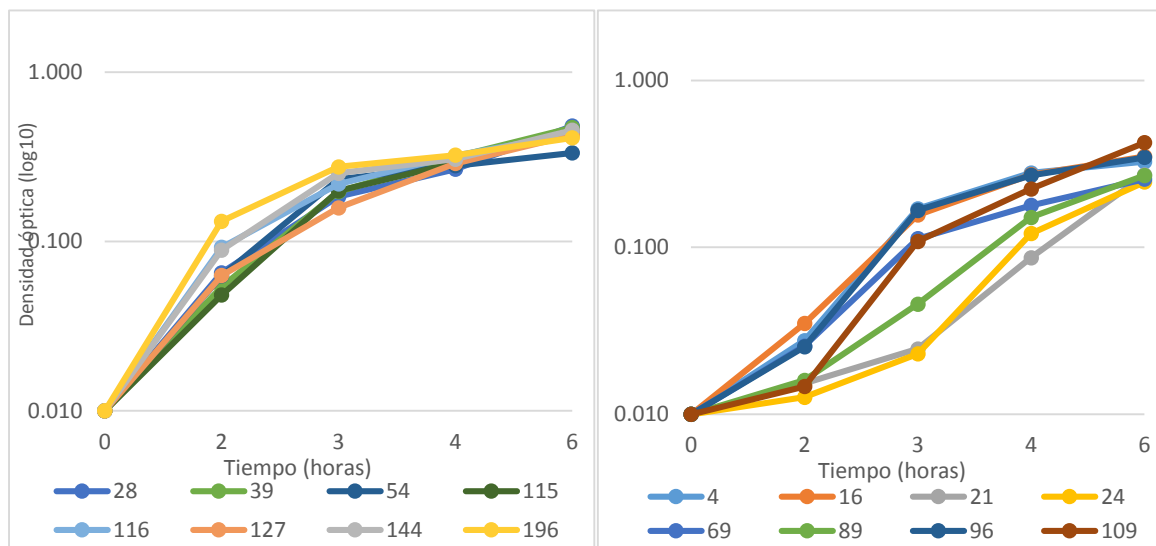


Figura 6. Cinéticas de crecimiento durante la recuperación a TA

En la condición de TA y a_w , las cepas 004, 016, 028, 039, 054, 069, 115, 116, 127, 144 y 196 (68.75%) después de haber sido sometidas a estrés, comenzaron a recuperarse desde el inicio, en cambio las cepas 021, 024, 089, 096 y 109 (31.25%) mostraron una fase lag de 2 horas. Es decir, el 68.75% de las cepas lograron entrar en la fase exponencial del crecimiento bacteriano

más rápido que el 31.25 % del total de las cepas. Sin embargo, todas las cepas lograron un crecimiento similar en la sexta hora de recuperación (Fig. 7).

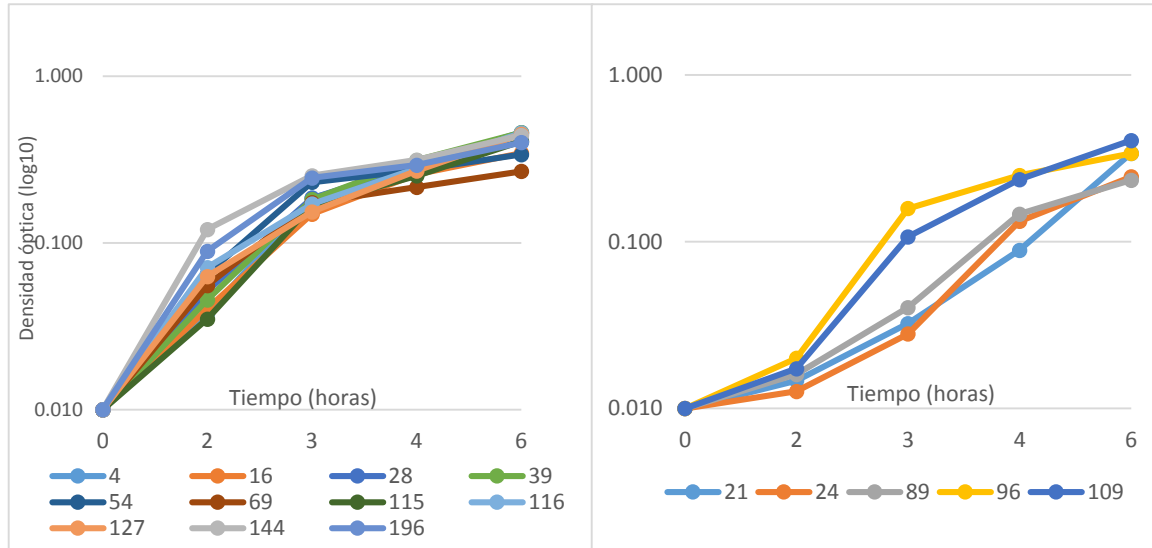


Figura 7. Cinéticas de crecimiento durante el periodo de recuperación al estrés a TA y aw.

A 6°C las cepas 004, 016, 144 y 196 (25%) mostraron un mayor crecimiento a las dos horas del proceso de recuperación y las cepas 021, 024, 028, 039, 054, 069, 089, 096, 109, 115, 116 y 127 (75%) mostraron un ligero retraso, sin embargo todas las cepas mostraron un crecimiento similar en la sexta hora de recuperación. Las cepas 004, 016, 028, 054, 069, 109, 116, 144 y 196 entraron a la fase estacionaria a partir de la tercera hora (Fig. 8).

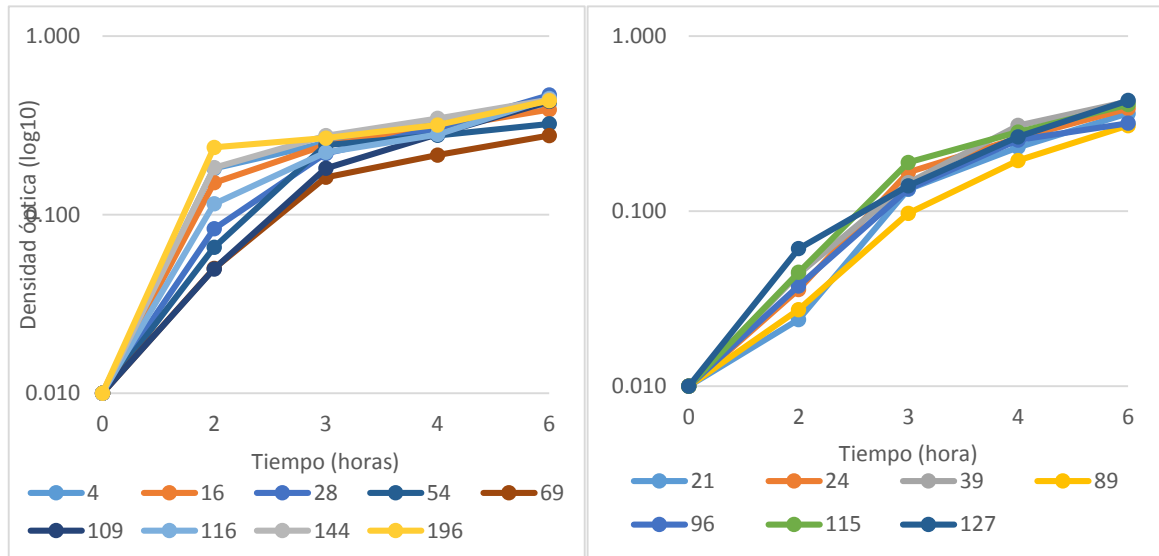


Figura 8. Cinéticas de crecimiento de las cepas durante el periodo de recuperación al estrés a 6°C.

Bajo las condición de 6°C y a_w las cepas 004, 016, 144 y 196 (25%) mostraron una velocidad de crecimiento mayor durante las dos primeras horas de la recuperación, las cepas 021, 024, 028, 039, 054, 069, 089, 096, 109, 115, 116 y 127 (75%) mostraron un ligero retraso durante la segunda hora en el proceso de recuperación, en comparación del 25 % de las cepas restantes. Sin embargo, a la sexta hora todas las cepas mostraron un nivel de recuperación similar (Fig. 9).

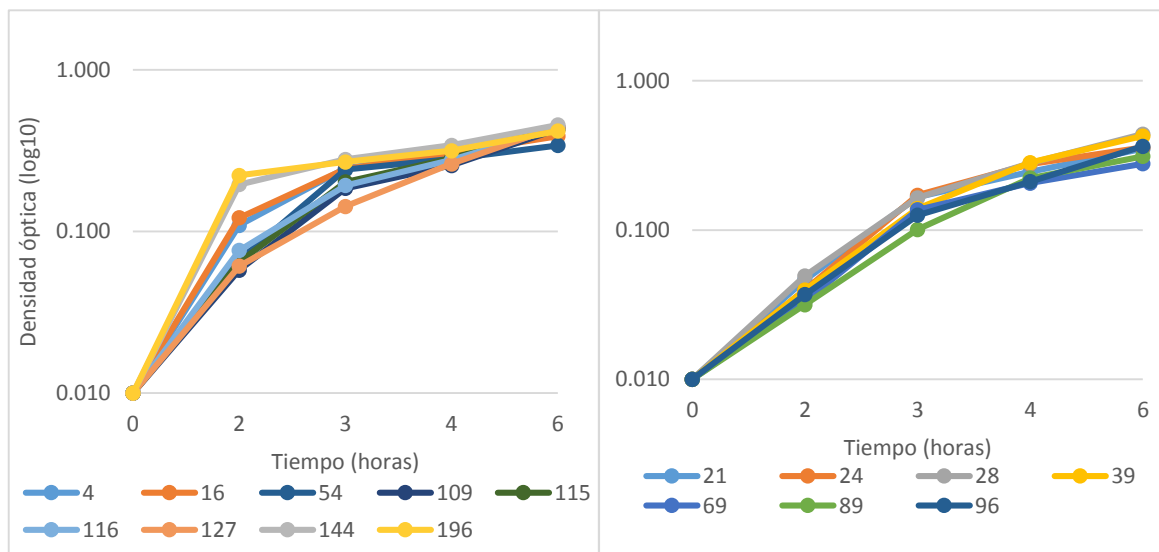


Figura 9. Cinéticas de crecimiento durante el periodo de recuperación al estrés a 6°C y a_w .

En resumen, todas las cepas pueden recuperarse más rápidamente del estrés a 6°C que a TA, ya sea en presencia o en ausencia de a_w ; las cepas 021, 024, 089 y 096 fueron las que presentaron un mayor retraso en el inicio de la fase exponencial en las cuatro condiciones de exposición, sin embargo, lograron un crecimiento similar a las 6 horas de crecimiento durante la recuperación después de haber sido sometidas a estrés.

7.2. Velocidad de crecimiento

Se calculó la velocidad de crecimiento de las cepas a partir de los datos obtenidos de la fase logarítmica de crecimiento, durante la recuperación bajo las condiciones de estrés: TA, TA y a_w , 6°C, 6°C y a_w , todas las cepas fueron comparadas con su correspondiente control sin estrés (SE). Las cepas que mostraron un aumento en la velocidad de crecimiento con respecto al control fueron: la cepa 004 a TA; las cepas 021,096 y 109 a TA y TA con a_w . Por otro lado las cepas que mostraron una disminución en su velocidad de crecimiento fueron: las cepas 016 y 115 a TA con a_w . Todas las condiciones de estrés disminuyeron el crecimiento de la cepa 069 y aumentaron el de la cepa 196. (Fig. 10).

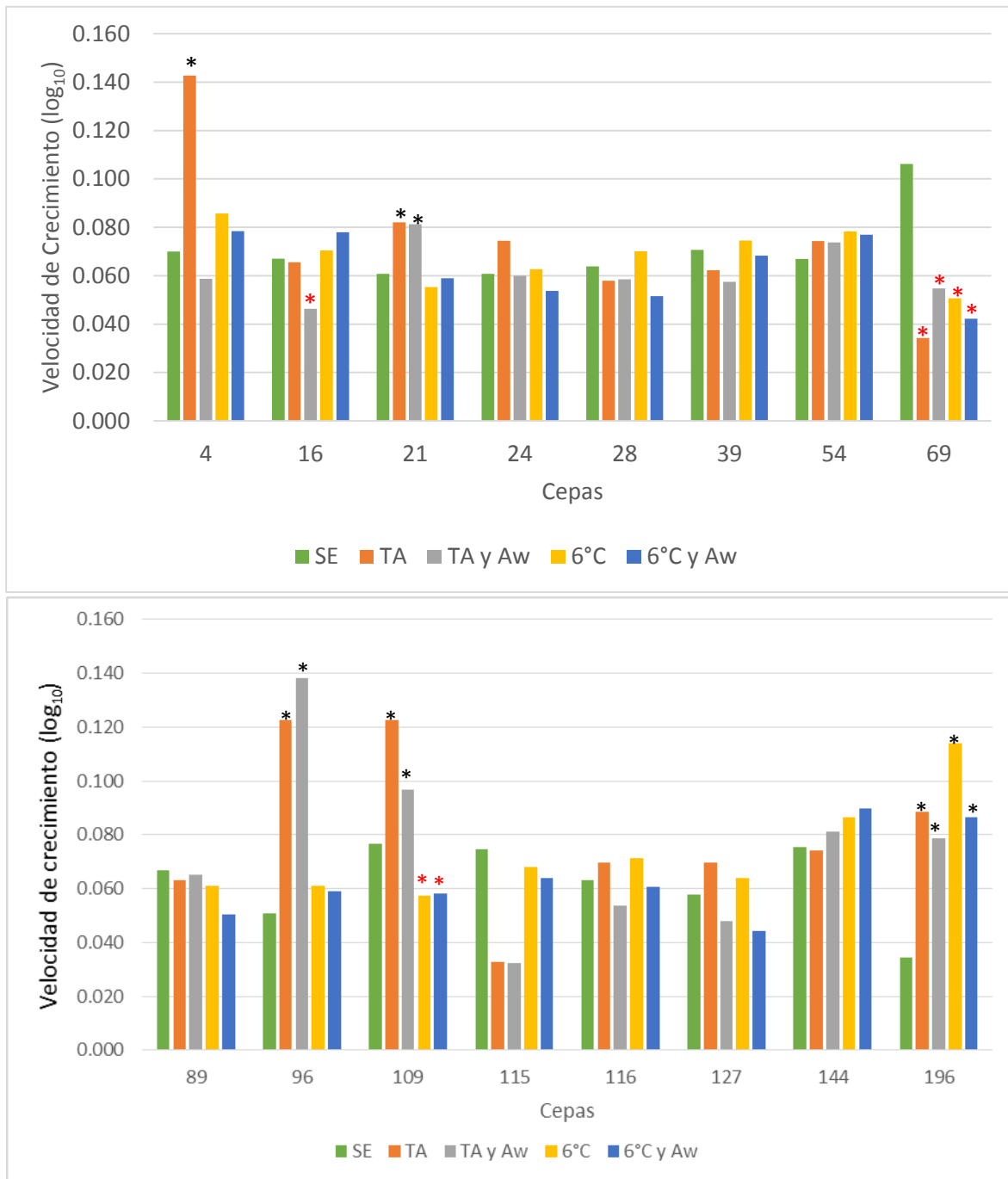


Figura 10. Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio.

ANOVA de dos vías, prueba de Dunnett, * $p \leq 0.05$

Comparando la recuperación de cada cepa en una misma condición de estrés, se observó lo siguiente: sin estrés, la única cepa que mostró una diferencia significativa en su velocidad de crecimiento fue la 069 (Fig.11). Para la condición de TA, las cepas que mostraron

una mayor velocidad de crecimiento fueron la 004, 096 y 109 (Fig. 12). Para la condición de TA y a_w la cepa que presentó una velocidad de crecimiento mayor fue la cepa 096 (Fig. 13). Para la condición de 6°C la cepa que presentó una velocidad de crecimiento mayor fue la cepa 196 (Fig.14). Para la condición de 6°C y a_w las cepas que presentaron un crecimiento con significancia estadística en la velocidad de crecimiento fueron las cepas 144 y 196 (Fig.15).

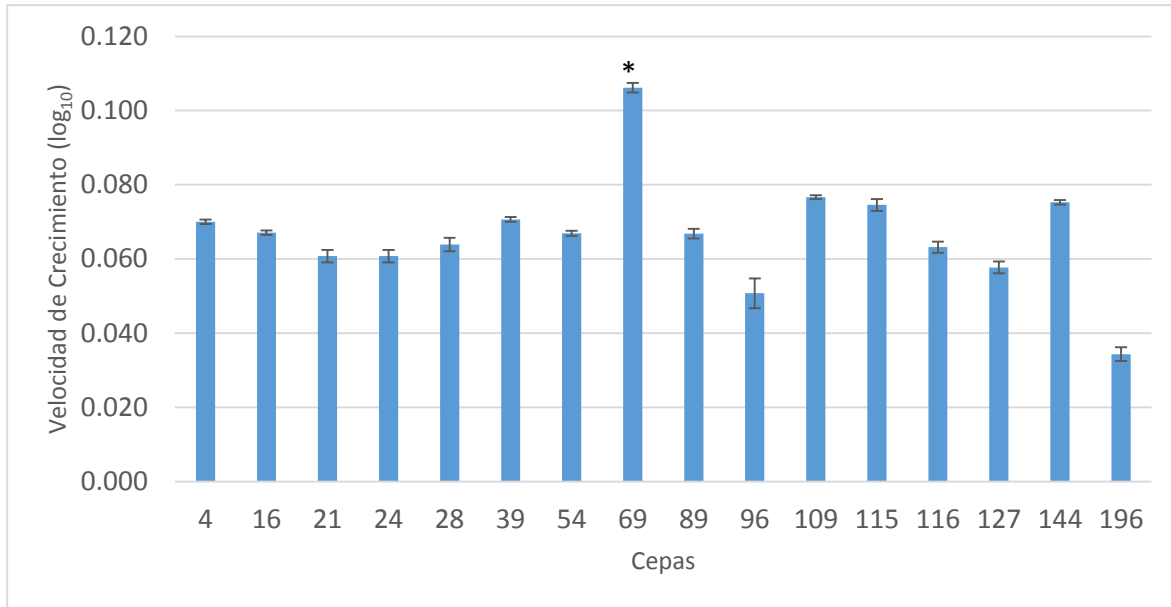


Figura 11. Velocidad de crecimiento de las cepas sin estrés.
ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

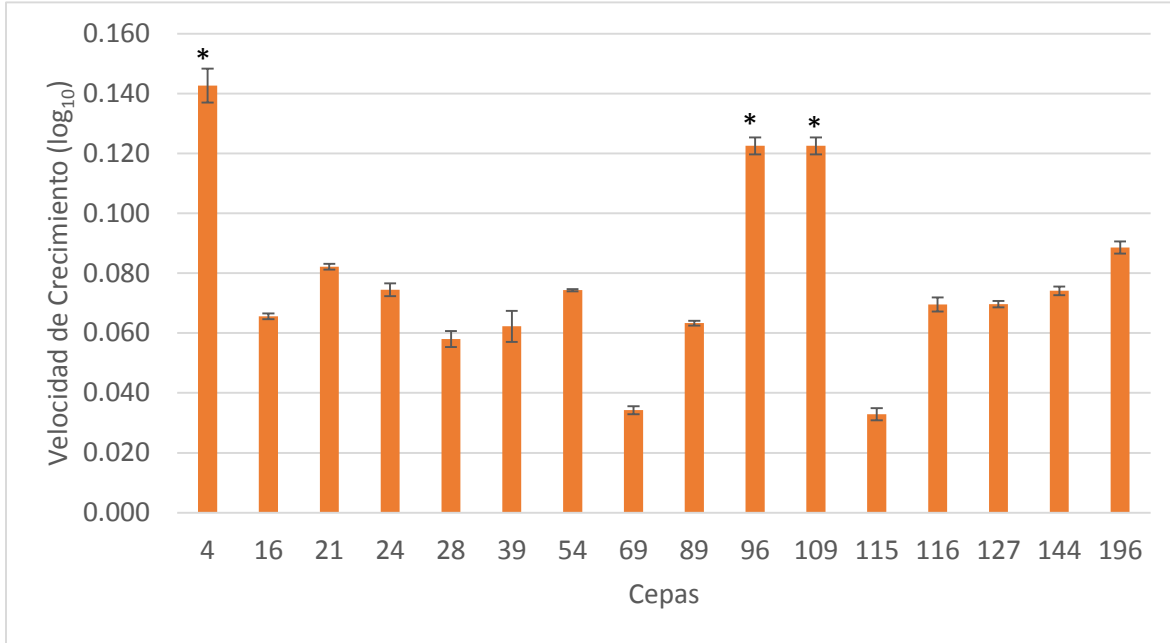


Figura 12. Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio durante su recuperación por estrés a TA. ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

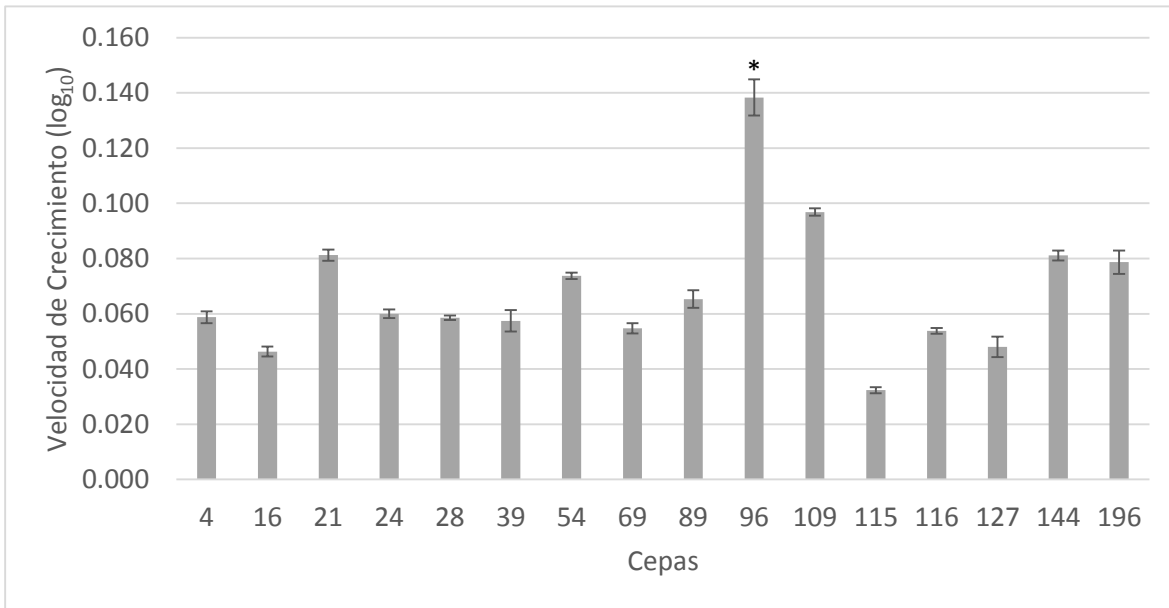


Figura 13. Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio durante su recuperación por estrés a TA y a_w . ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

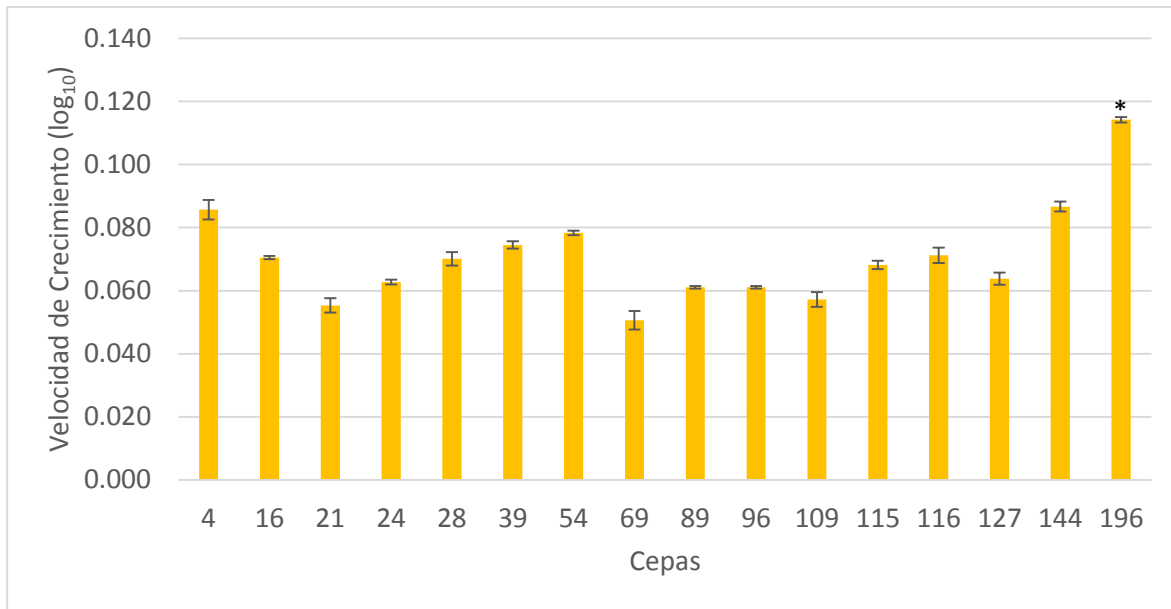


Figura 14. Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio durante su recuperación por estrés a 6°C. ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

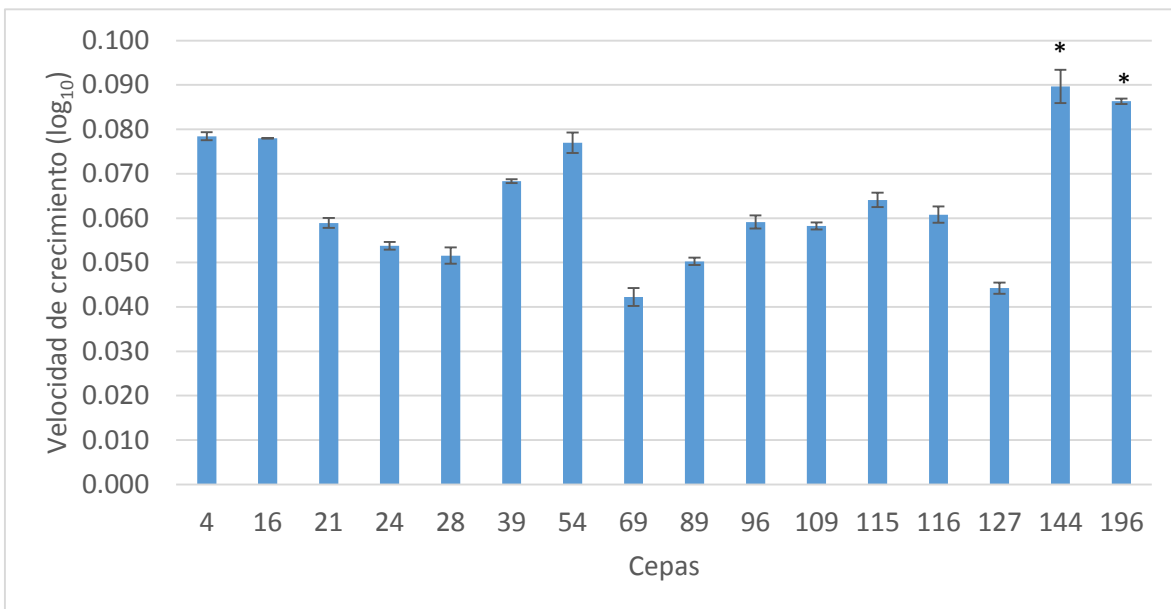


Figura 15. Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio durante su recuperación por estrés a 6°C y a_w . ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

7.3 Formación de células filamentosas

Se analizó la formación de células filamentosas de cada una de las cepas sometidas a estrés obteniéndose 5 diferentes morfologías: a) Distribución celular no agrupada y bacilos definidos sin la formación de filamentos; b) Células agrupadas y abundantes, donde sobresalen filamentos de gran tamaño; c) Agrupamiento de células, sobresalen filamentos aumentados tanto en lo ancho como en lo largo; d) Dispersión de células, sobresalen filamentos celulares delgados pero aumentados en longitud; e) Ligeramente agrupamiento de células, formación de filamentos de diferente longitud (Fig. 16).

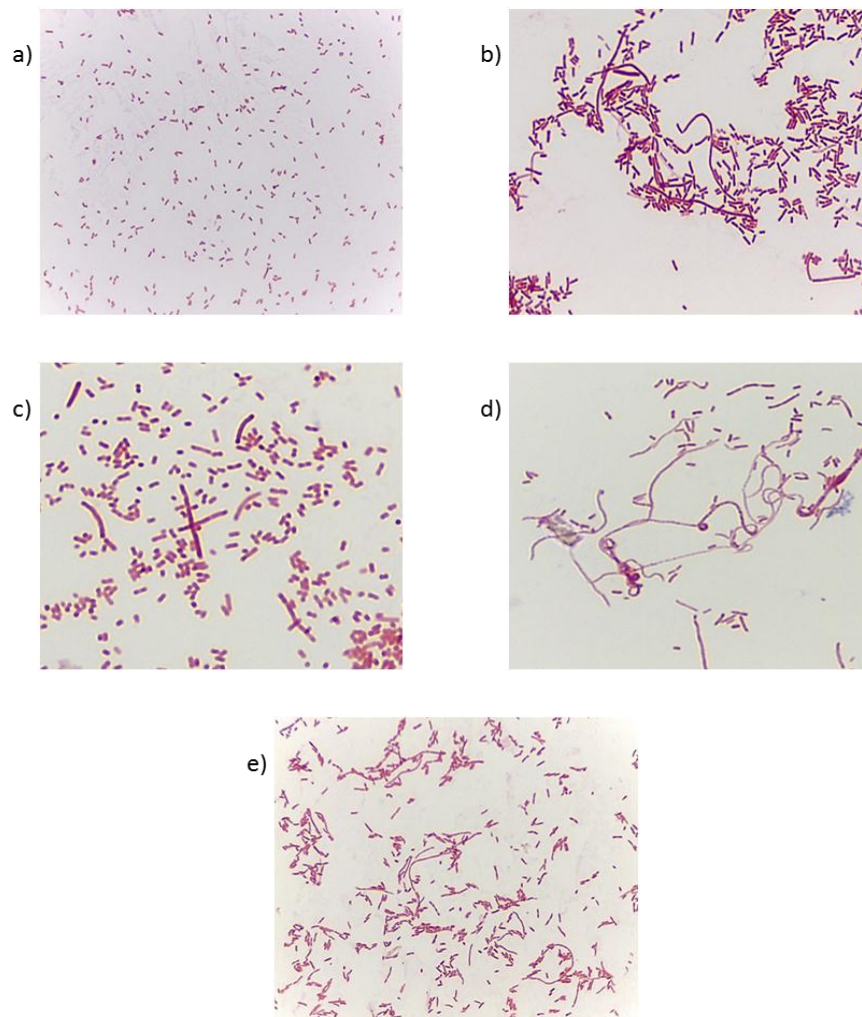


Figura 16. Morfología que presentaron las cepas de estudio durante la exposición a estrés.

Micrografía 100X que muestra: a) Cepa 004 a 6°C; b) Cepa 024 a TA; c) Cepa 024 a TA; d) Cepa 127 a 6°C; e) Cepa 127 a 6°C.

La cepa 004 no desarrolló filamentos en ninguna condición de estrés. En la condición de TA se observó que las cepas 021, 024, 028, 054, 089, 096, 127 y 144 (50%) tuvieron la capacidad de desarrollar filamentos. En la condición de TA y a_w , las cepas 024, 028, 039, 054, 069, 089, 096, 109, 115, 127 y 196 (69%) desarrollaron células filamentosas. Bajo la condición de refrigeración a 6°C las cepas 016, 021, 024, 028, 038, 054, 069, 086, 096, 109, 115, 116, 127, 144 y 196 (94%) presentaron filamentos. Bajo la condición de refrigeración a 6°C y a_w las cepas 016, 021, 024, 028, 038, 054, 069, 086, 096, 109, 115, 116, 127, 144 y 196 (94%) desarrollaron filamentos.

Tabla 3. Cepas que mostraron la capacidad de formar filamentos bajo las condiciones de estrés.

Cepa	Condición de estrés			
	TA	TA y a_w	6°C	6°C y a_w
004				
016			*	*
021	*		*	*
024	*	*	*	*
028	*	*	*	*
039		*	*	*
054	*	*	*	*
069		*	*	*
089	*	*	*	*
096	*	*	*	*
109		*	*	*
115		*	*	*
116			*	*
127	*	*	*	*
144	*		*	*
196		*	*	*

7.4 MICROARREGLOS METABÓLICOS

La determinación del uso de las fuentes presentes en la placa GNIII se realizó para todas las cepas en la condición sin estrés. Las 16 cepas de estudio mostraron distintos patrones metabólicos (Fig. 17).



Figura 17. Mapa de calor que indica el perfil metabólico de las 16 cepas analizadas utilizando las placas GNIII

La cepa 016 fue capaz de metabolizar más del 80% (80 fuentes) de los sustratos presentes en la placa GNIII, seguida por la cepa 004 que metabolizó el 60% de las fuentes (57). En comparación, las siguientes cepas metabolizaron alrededor del 50% de los sustratos: 024 (49 fuentes), 028 (50 fuentes), 039 (47 fuentes), 054 (52 fuentes), 069 (51 fuentes), 096 (53 fuentes) y 115 (49 fuentes). Otro grupo de cepas metabolizó alrededor del 40% de los sustratos, las cepas 021 (41 fuentes), 089 (45 fuentes), 109 (46 fuentes), 127 (44 fuentes) y 144 (40 fuentes), finalmente las cepas 116 (32 fuentes) y 196 (34 fuentes) solo metabolizaron un poco más del 30% de los sustratos presentes en la placa (Fig. 18).

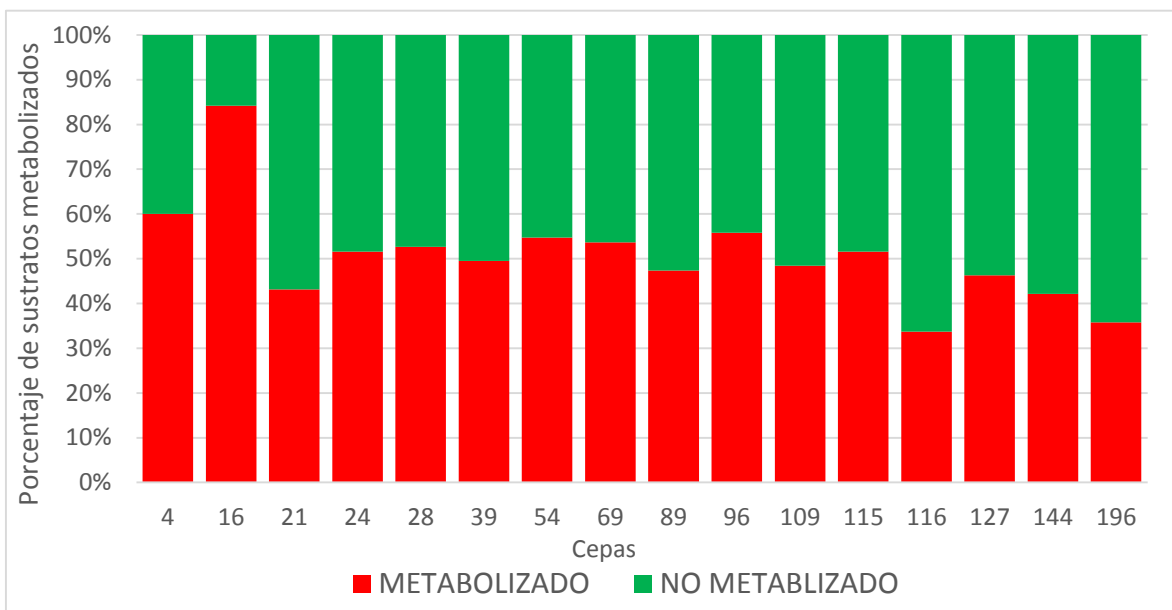


Figura 18. Porcentaje de utilización de sustratos presentado por las cepas de estudio

Analizando por grupo de compuestos, la cepa 016 fue capaz de metabolizar más del 85% de los carbohidratos presentes en la placa, seguida por la cepa 004 con un 60%. La mayoría de las cepas utilizaron el 50 % de los carbohidratos. Las cepas 116 y 196 lograron metabolizar el 20 y 10% de los carbohidratos respectivamente (Fig. 19).

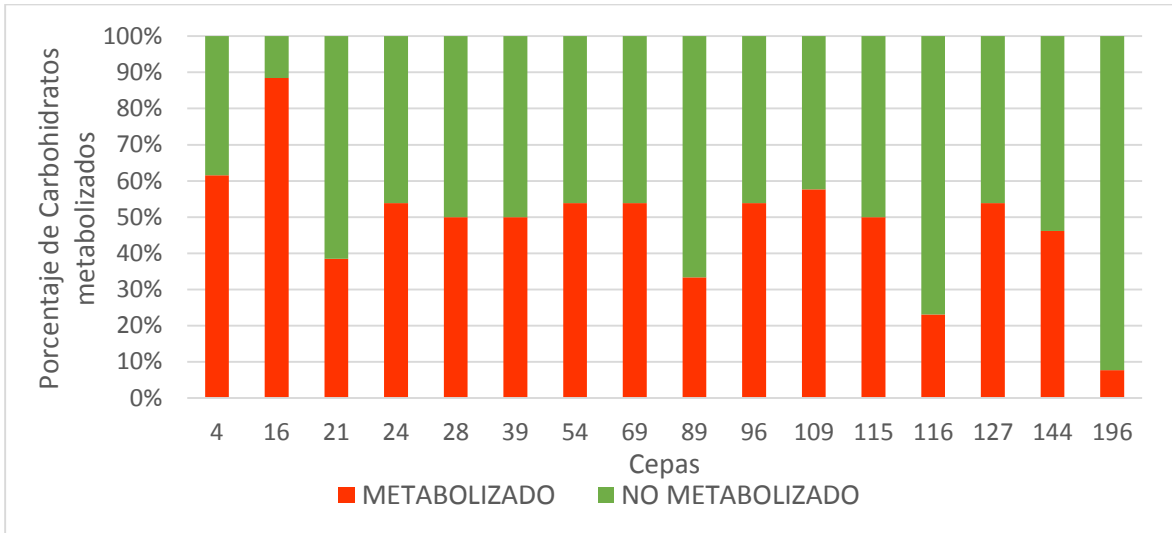


Figura 19. Porcentaje de carbohidratos utilizados por las cepas de estudio.

Se comparó la utilización de cada uno de los carbohidratos por separado para cada una de las cepas de estudio, donde encontramos que la cepa 016 mostró una utilización mayor en comparación con las cepas restantes, en los siguientes carbohidratos: dextrina, D-maltosa, D-celubiosa, D-turanosa, D-rafinosa, D-melibiosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-β-D-manosamina, N-acetil ácido neuraminico, α-D-glucosa, D-galactosa, L-fucosa, L-ramnosa e inosina (Fig. 20).

También se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la utilización de carbohidratos de las cepas analizadas mostrando una amplia diversidad metabólica, observando que las cepas mostraban un mayor o menor aprovechamiento en comparación con otras cepas de estudio (Tabla 4).

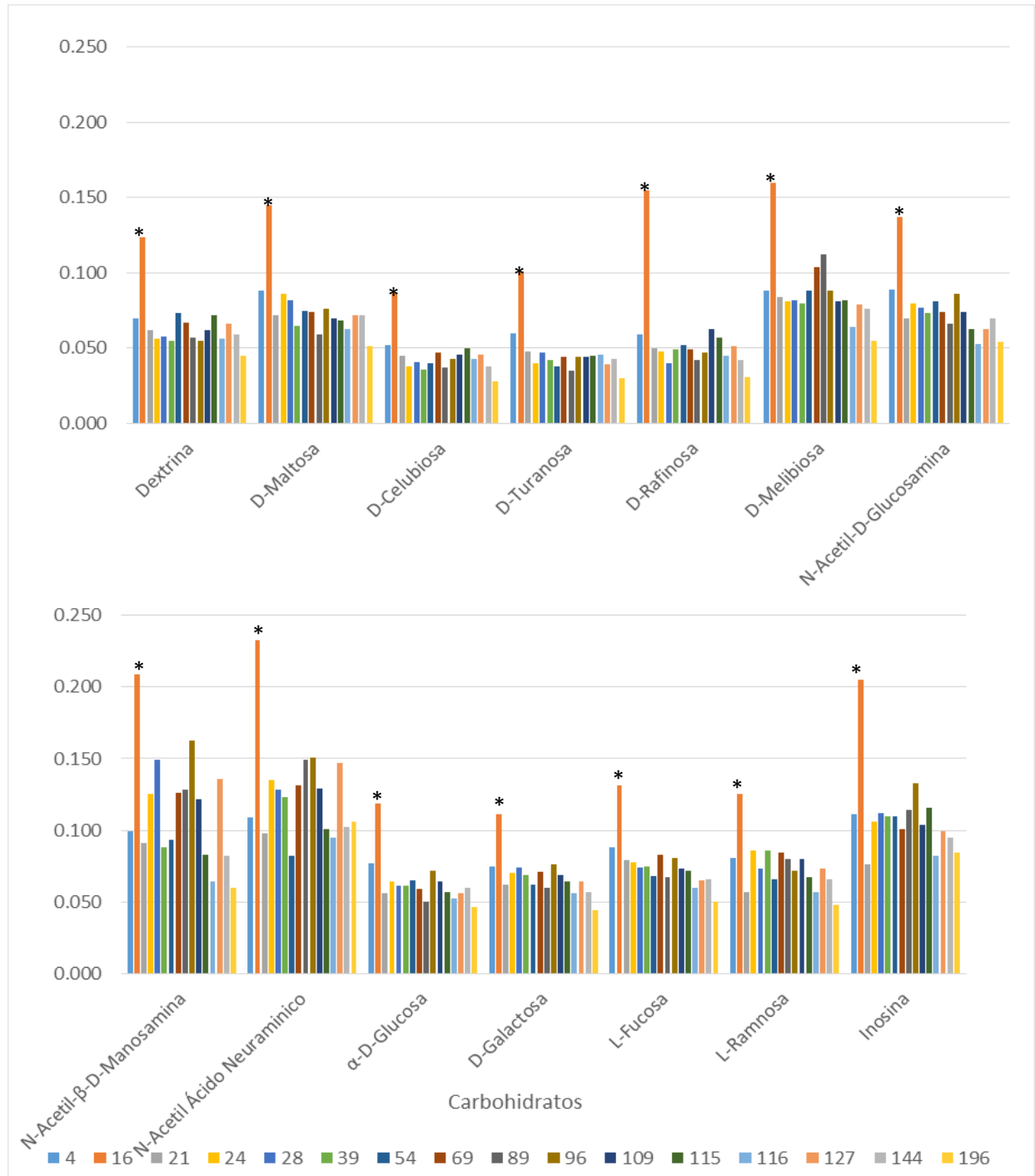


Figura 20. Utilización de carbohidratos por las cepas de estudio.

ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

Tabla 4. Carbohidratos utilizados por las cepas de estudio

Cepa	Metabolito	Aprovechamiento < ó >	Cepa
4	D-rafinosa, D-melibiosa, N-acetil-β-D-manosamina, N-acetil ácido neuraminico, L-ramnosa e inosina	<	16
	N-acetil-β-D-manosamina.	<	96
16	dextrina, D-maltosa, D-rafinosa, D-melibiosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-β-D-manosamina, N-acetil ácido neuraminico, D-celubiosa	>	196
	D-turanosa	>	024, 039, 054, 089, 127 y 196
	α-D-glucosa	>	021, 089, 115, 116, 127, 144 y 196
	D-galactosa	>	196
	L-fucosa	>	054, 089, 115, 116, 127, 144 y 196
	L-ramnosa	>	021, 054, 116, 127, 144 y 196
	inosina	>	Todas
96	N-acetil-β-D-manosamina	>	021, 039, 054, 115, 116, 144 y 196
24		>	116 y 196
28		>	039, 115, 116, 144 y 196
069 y 089		>	116 y 196
109		>	196
127		>	116 y 196
089 y 096		N-acetil ácido neuramínico	>

La columna aprovechamiento indica si la cepa de la primera columna aprovechó más o menos el metabolito o los metabolitos indicados, en comparación con la cepa de la última columna. ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$.

En cuanto a la utilización de hexosas, se pueden distinguir tres grupos de cepas, las cepas 004, 016, 028, 054, 069 y 115 que utilizaron el 100% de estas fuentes; otro conformado por las

cepas 024, 089, 096 y 109 que metabolizaron el 50% de los sustratos; y por último las cepas 021, 039, 116, 127, 144 y 196 que no utilizaron ninguno de estos sustratos (Fig. 21).

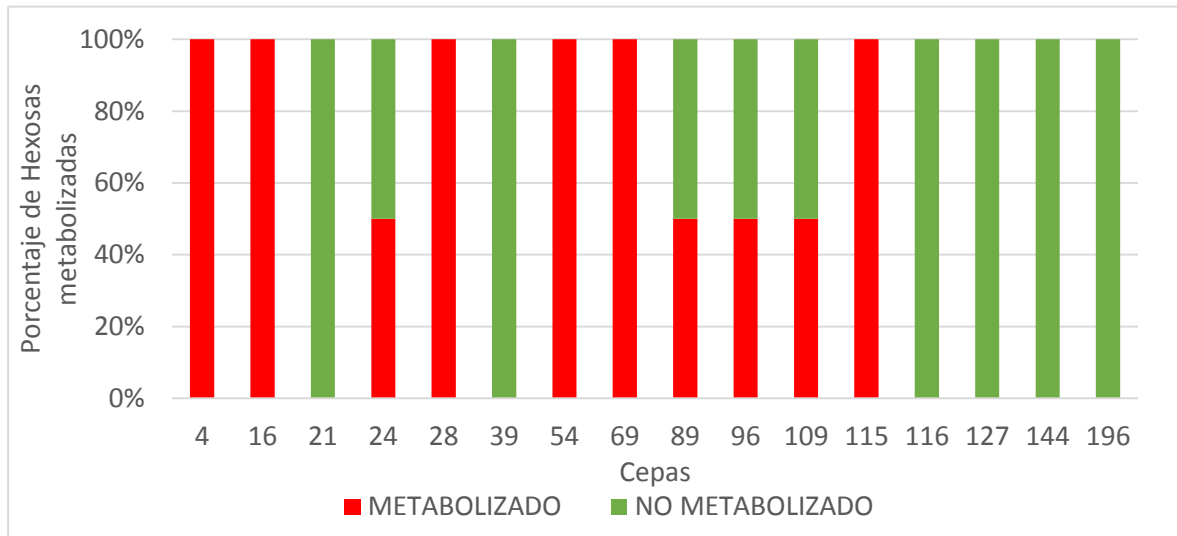


Figura 21. Porcentaje de hexosas utilizadas por las cepas de estudio

Analizando si había diferencia entre la utilización de hexosas entre las cepas de estudio, se encontró que sólo la cepa 016 mostró una diferencia estadísticamente significativa con todas las cepas en la utilización de D-glucosa-6-PO₄. En cambio para la utilización de D-fructosa-6-PO₄, la cepa 016 mostró diferencia estadísticamente significativa en comparación con las cepas 021, 039, 089, 109, 116, 127, 144 y 196 (Fig. 22).

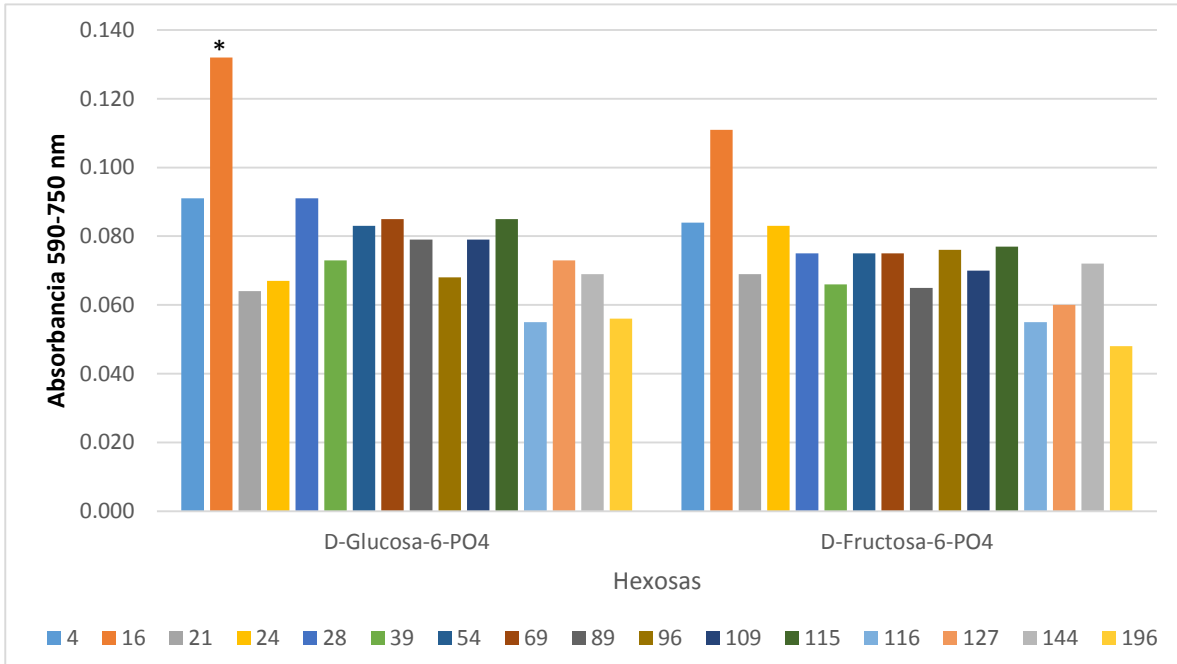
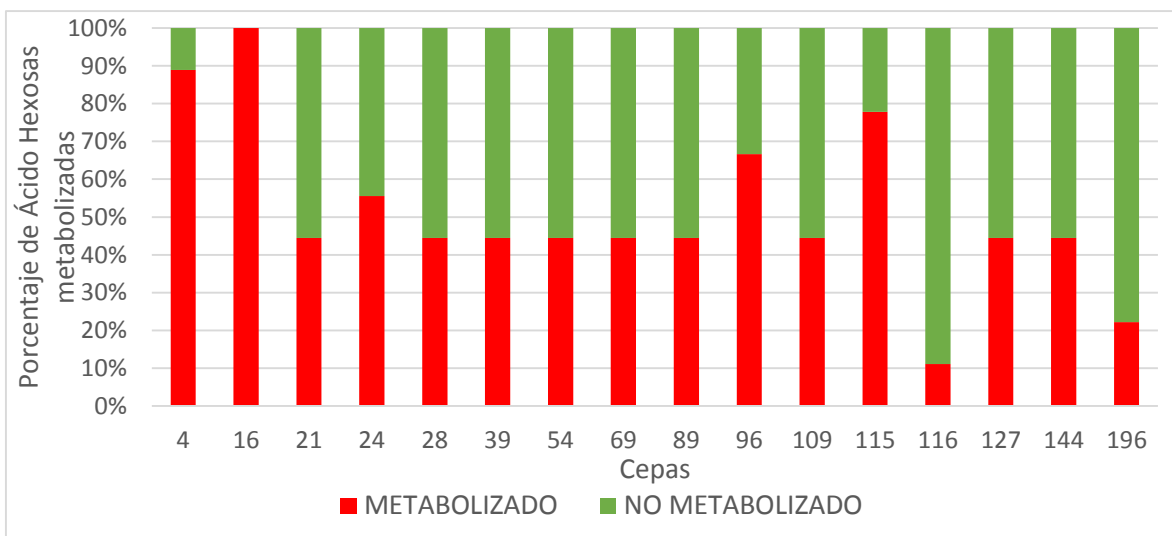


Figura 22. Utilización de hexosas por las cepas de estudio.
ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

Al analizar la utilización de ácido hexosas se observó que la cepa 16 fue capaz de utilizar el 100% de estos sustratos, seguida por las cepa 004 y 115, que utilizaron el 89% y el 78% de los sustratos, respectivamente; la cepa 116 solo metabolizó el 10% de estos sustratos (Fig. 23).

Figura 23. Porcentaje de ácido hexosas utilizados por las cepas de estudio



Comparando entre todas las cepas si habían diferencia significativa entre la utilización de ácido hexosas, se observó que la cepa 016 fue la única que presento mayor utilización de L-ácido lacton galactónico, ácido místico, ácido quinico y D-ácido sacarico con respecto todas las cepas de estudio (Fig. 24).

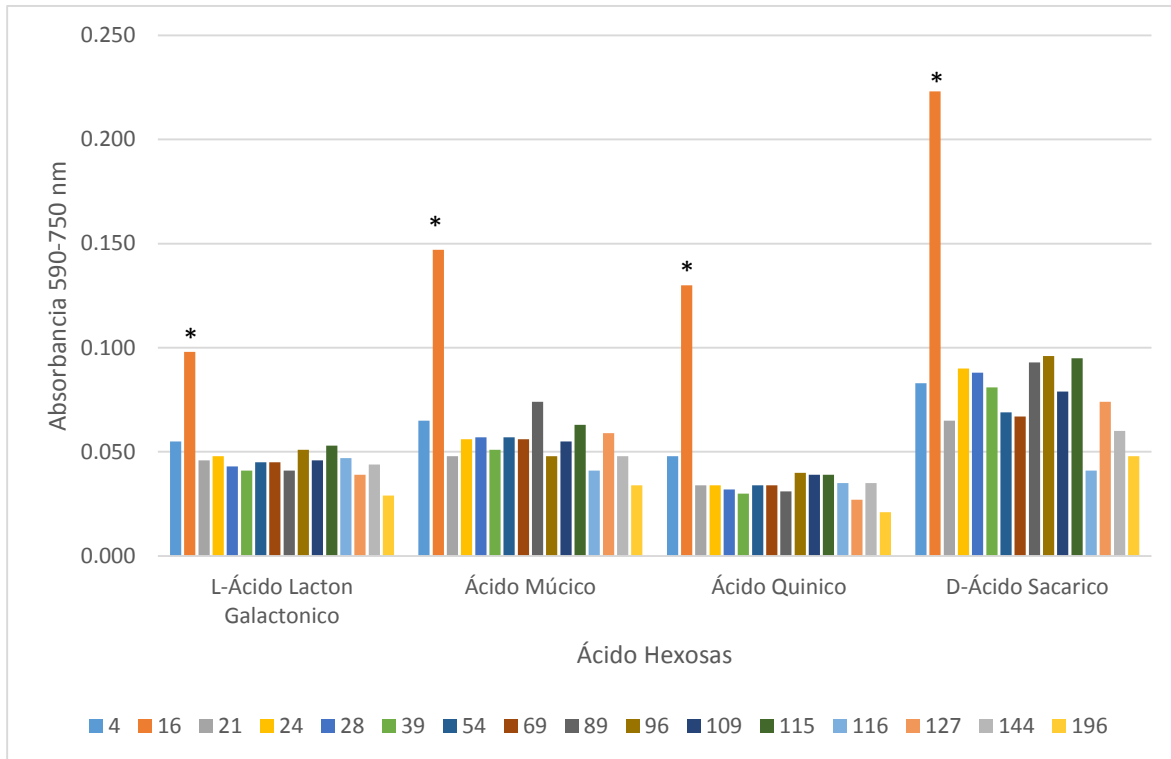


Figura 24. Utilización de ácido hexosas por parte de las cepas de estudio.
ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

La cepa 016 fue capaz de metabolizar el 89% de los aminoácidos presentes en la placa GNIII; el 50% de los sustratos fueron metabolizados por las cepas 004, 024, 039, 054, 069, 089, 096, 109, 115 y 127; las cepas 028 y 144 metabolizaron el 40% de los aminoácidos; las cepas 021 y 198 fueron capaces de metabolizar el 30% y la cepa 116 sólo metabolizó el 10% de estos sustratos (Fig. 25).

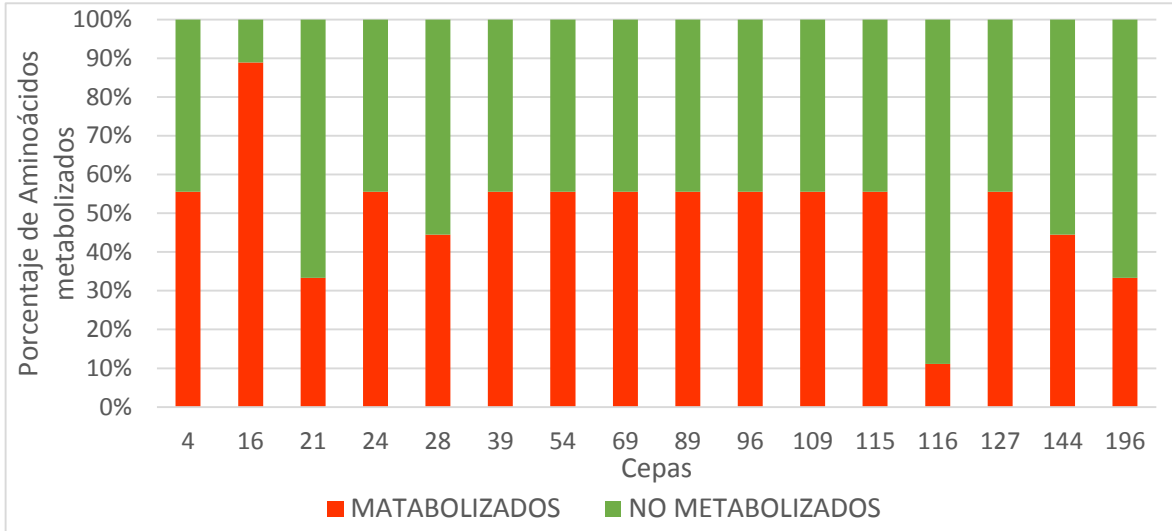


Figura 25. Porcentaje de aminoácidos utilizados por las cepas de estudio

Para los aminoácidos presentes en la placa GNIII, se aplicó de la misma forma una prueba estadística mediante ANOVA de dos vías, utilizando la prueba de Tukey con una significancia de $p \leq 0.05$. La cepa 115 presentó una diferencia significativa en cuanto a la utilización de glicil-L-prolina en comparación con la cepa 116. La cepa 016 mostró una diferencia significativa con respecto a la utilización de L-alanina, L-ácido aspártico, L-glutámico y L-histidina en comparación con todas las cepas de estudio. También se observó que la cepa 016 mostró diferencia significativa en cuanto al uso de L-ácido piroglutámico con respecto a las cepas 021, 024, 028, 039, 089, 116, 127 y 196. Se observó que nuevamente la cepa 016 mostró una utilización mayor de L-serina en comparación con las cepas 021, 054, 069, 089, 109, 115, 116, 127, 144 y 196 (Fig. 26).

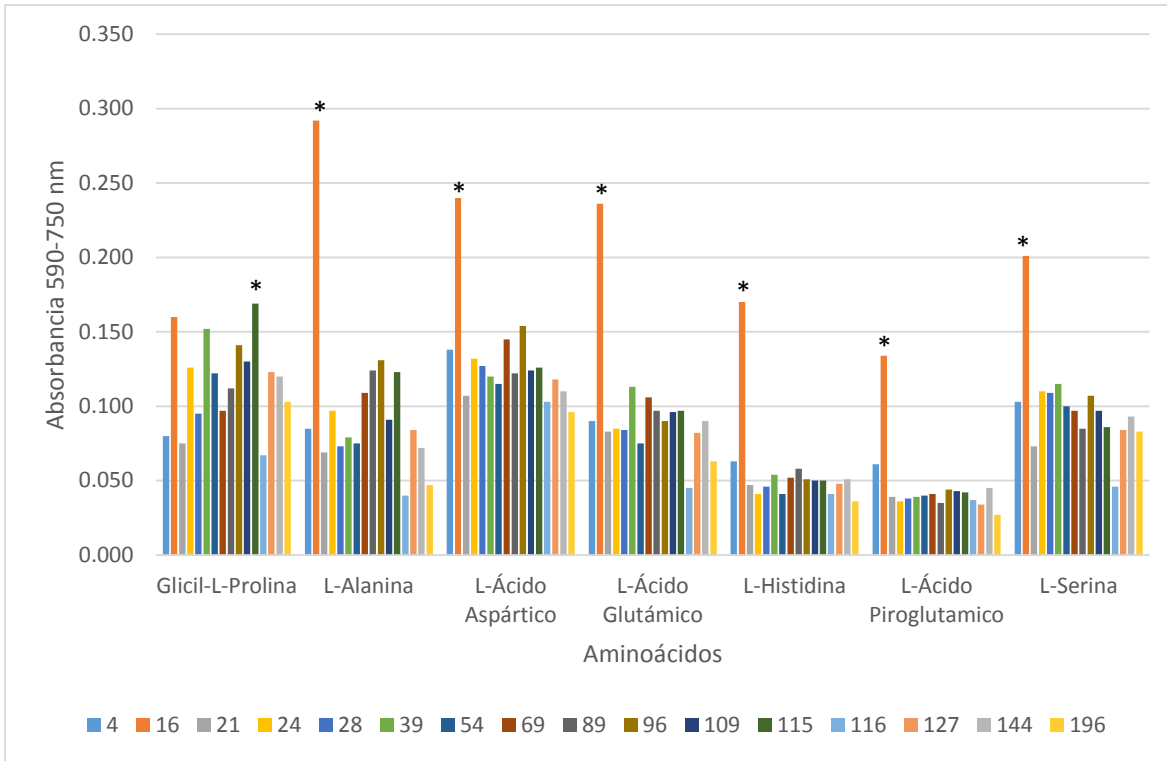


Figura 26. Utilización de aminoácidos por las cepas de estudio.

Se aplicó la prueba ANOVA de dos vías, prueba Tukey, $*p \leq 0.05$

En la utilización de los ácidos carboxílicos, ésteres y ácidos grasos, la cepa 016 fue capaz de metabolizar el 89% de éstos, la cepa 004 metabolizó el 79%, las cepas 096 y 115 metabolizaron el 60%, mientras que el 50% de éstos fueron metabolizados por las cepas 021, 024, 028, 039, 054, 069, 109 y 127. Las cepas 089 y 144 fueron capaces de metabolizar el 30% y las cepas 116 y 196 sólo metabolizaron el 20% de los sustratos (Fig.27).

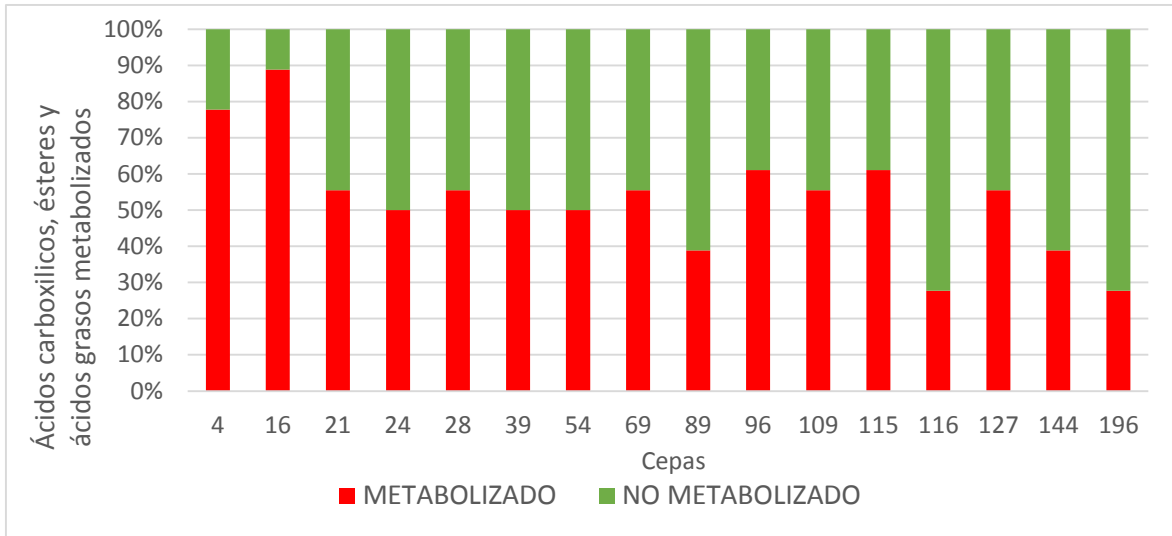


Figura 27. Porcentaje de ácidos carboxílicos, ésteres y ácidos grasos utilizados por las cepas de estudio

En cuanto a la utilización de ácidos carboxílicos, ésteres y ácidos grasos, se observó que la cepa 016 no metabolizó Ácido cítrico pero fue la que mayor utilización de ácido γ -aminobutírico en comparación con todas las cepas de estudio (Fig. 28).

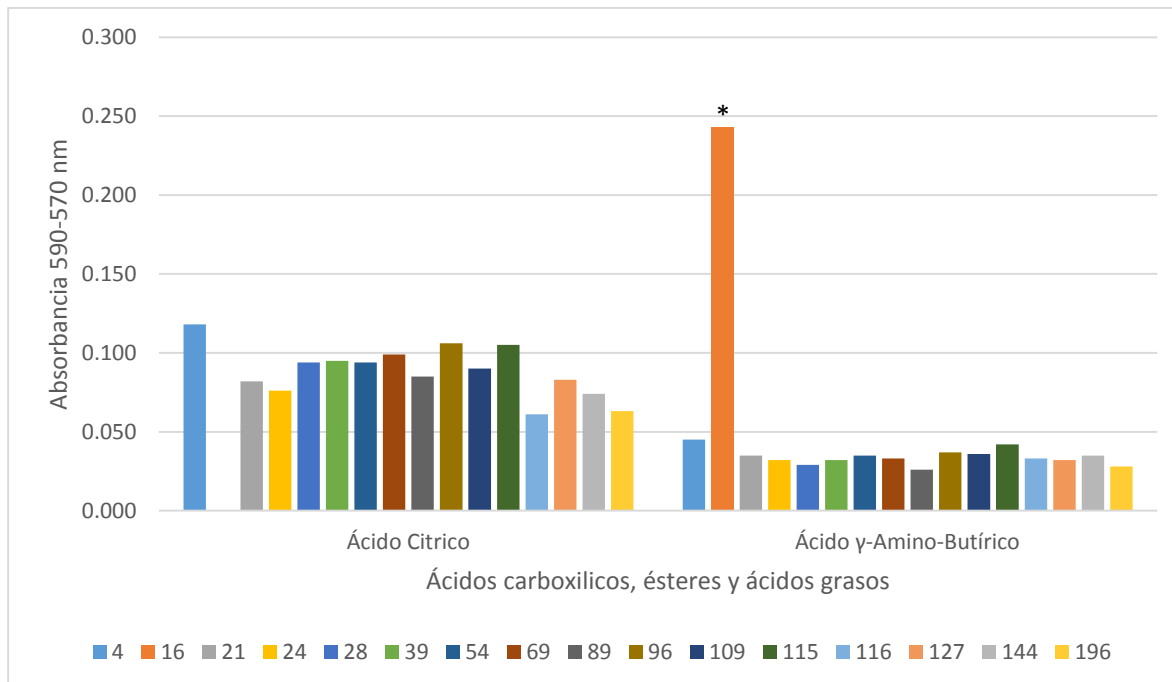


Figura 28. Utilización de ácidos carboxílicos, ésteres y ácidos grasos por las cepas de estudio. ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

En cuanto a la capacidad de crecer en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, siendo estas al 1%, 4% y 8%, sólo la cepa 016 fue capaz de crecer en las tres concentraciones de NaCl probadas, las cepas 004, 021, 089, 096 y 115 metabolizaron el 70% de las 3 concentraciones. Mientras que las cepas 024, 028, 039, 054, 069, 109, 116, 127, 144 y 196 sólo mostraron metabolismo en el 30% de las concentraciones (Fig. 29).

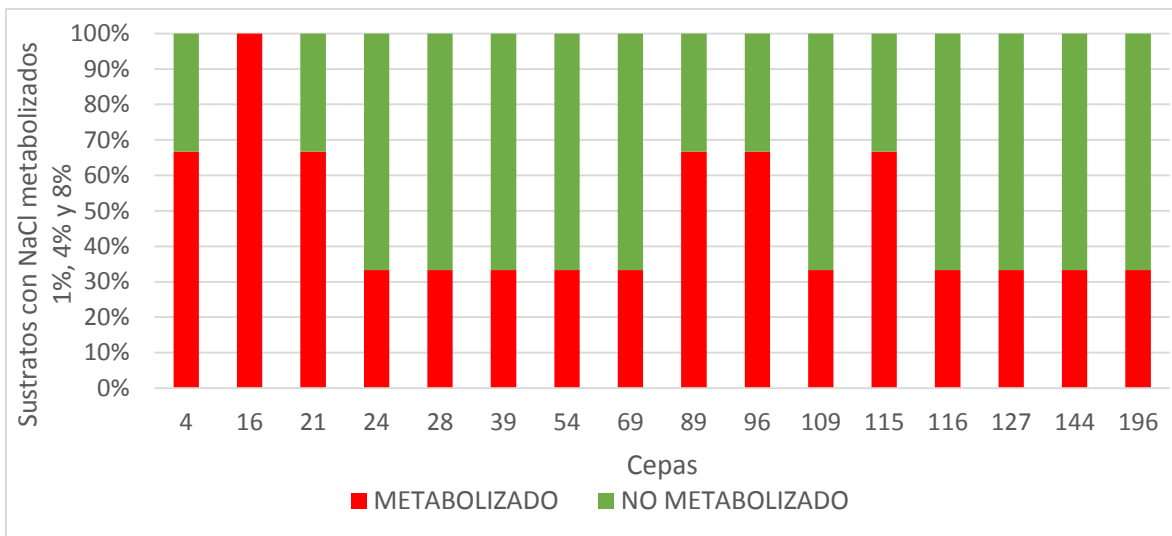


Figura 29. Porcentaje de NaCl utilizados por las cepas de estudio.

ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

En la utilización de las distintas concentraciones de NaCl, se aplicó nuevamente una prueba estadística mediante ANOVA de dos vías, utilizando la prueba de Tukey con una significancia de $p \leq 0.05$. En presencia de NaCl 8%, sólo la cepa 016 mostró una diferencia significativa en su crecimiento (Fig. 30).

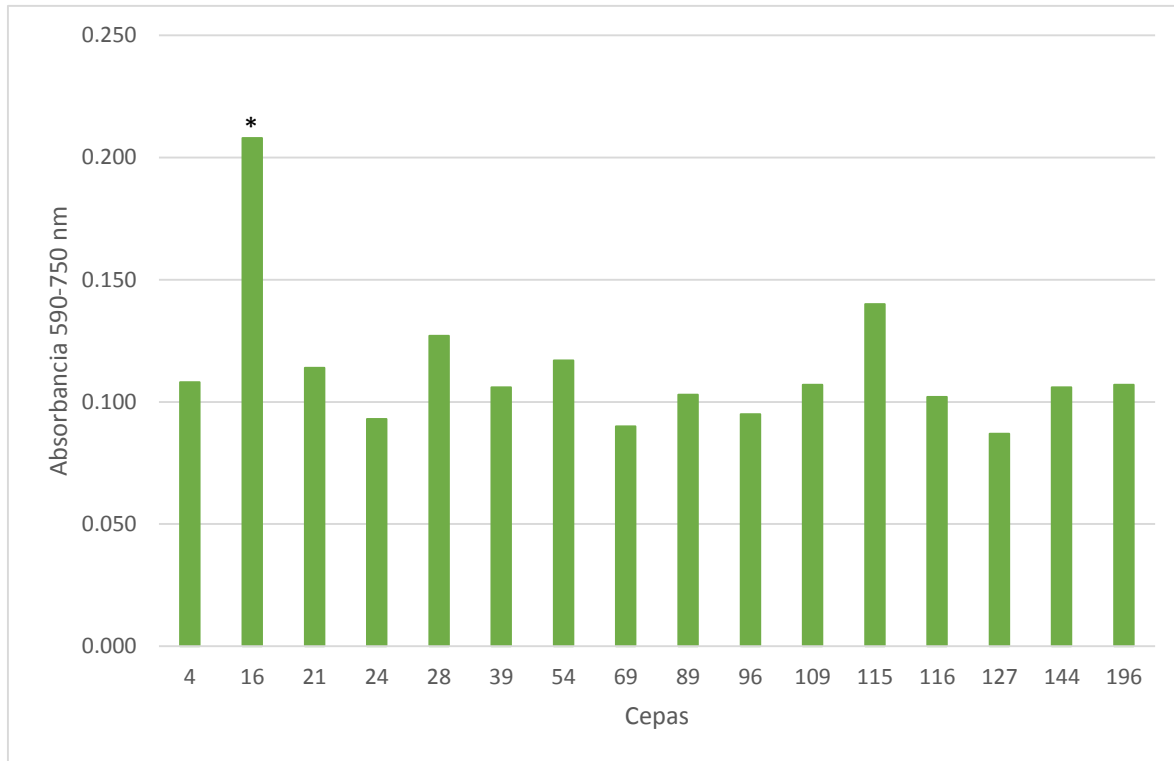


Figura 30. Velocidad de crecimiento de las cepas de estudio bajo la concentración de NaCl 8%
ANOVA de dos vías, prueba Tukey, * $p \leq 0.05$

7.5 Asociación entre Resistencia a estrés y Metabolismo.

Se analizó la correlación entre la Resistencia a estrés utilizando los datos obtenidos de las velocidades de crecimiento de las cepas de estudio bajo las condiciones SE, TA, TA y a_w , 6°C, 6°C y a_w y el Metabolismo de los sustratos presentes en la placa GNII.

Sólo se encontró correlación directa entre el crecimiento en la condición sin estrés y el metabolismo en presencia de β -metil-D-glucósido, NaCl al 1%, ácido-D-glucorónico (ácido hexosa) y ácido propiónico (ácido carboxílico) (Fig. 31).

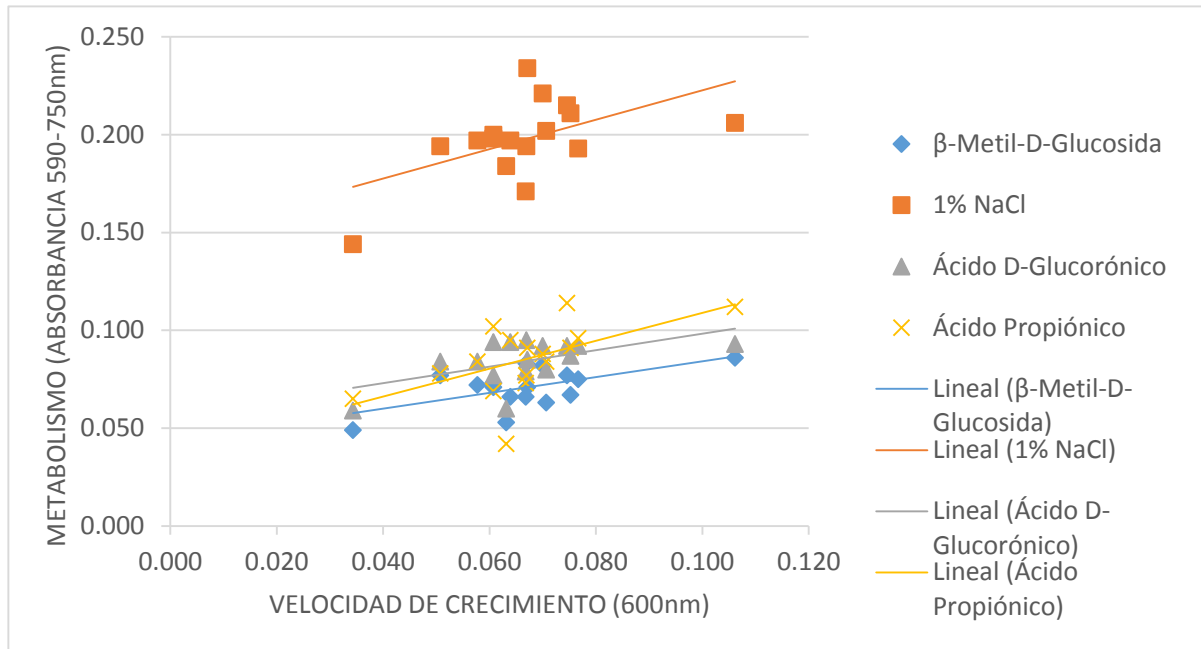


Figura 31. Correlación entre velocidad de crecimiento sin estrés y el metabolismo en las cepas de estudio. Correlación de Pearson con 95% de confiabilidad.

Al analizar la correlación entre la velocidad de crecimiento en las diferentes condiciones de estrés con la utilización de metabolitos, sólo se observó correlación inversa con β -metil-D-glucósido (carbohidrato) bajo la condición de 6°C. No se encontró correlación entre el metabolismo y la velocidad de crecimiento en las condiciones de TA, TA con a_w y 6°C con a_w (Fig. 32).

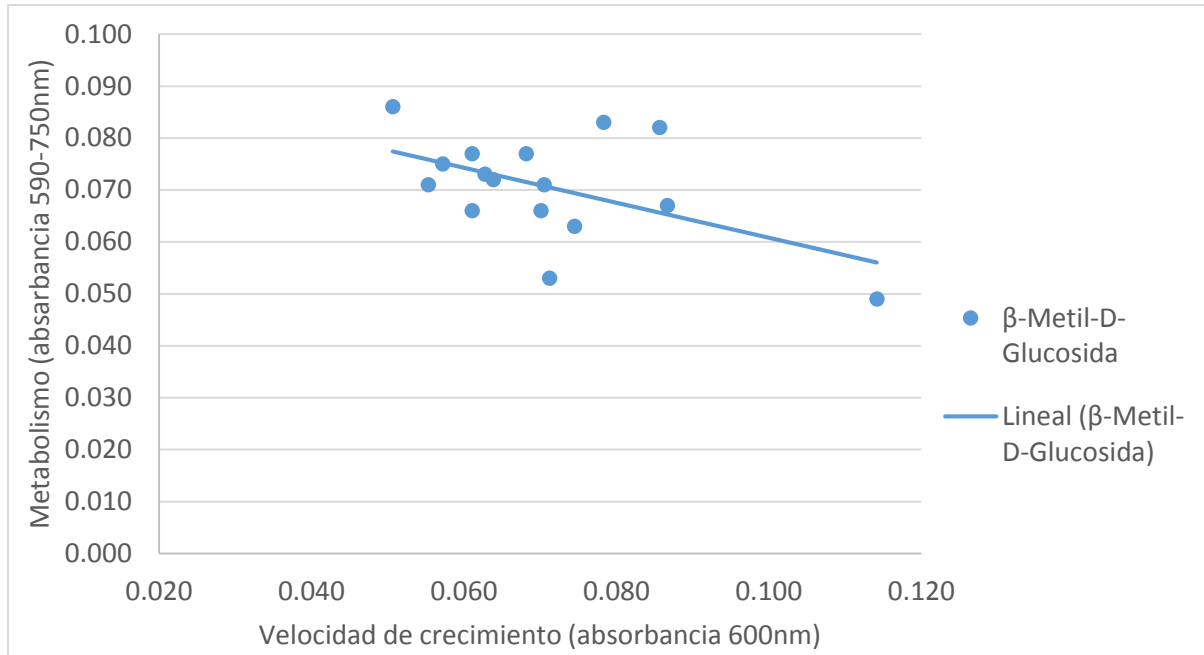


Figura 32. Correlación entre el crecimiento de las cepas de estudio en la condición de 6°C y el metabolismo en β -metil-D-glucósido. Correlación de Pearson con 95% de confiabilidad.

8. DISCUSIÓN

Las técnicas de conservación intentan producir un entorno perjudicial para el crecimiento bacteriano en los productos alimenticios (Humphrey *et al.*, 2011). Las células bacterianas pueden adaptarse normalmente a condiciones desfavorables para su crecimiento tras una breve exposición a estrés leve como lo es un choque térmico o la exposición a un medio ácido (Gahan y Hill, 1999). La habilidad de *Salmonella* para sobrevivir en la cadena agroalimentaria se debe en parte a su capacidad para responder efectivamente a los cambios medioambientales (Humphrey, 2004). Dado que *S. Typhimurium* es el serotipo que mayoritariamente se encuentra contaminando alimentos en el estado de Michoacán (Regalado-Pineda, 2011), en el presente estudio se analizó la capacidad que tenían 16 cepas de *S. Typhimurium*, obtenidas de muestras de alimentos en el estado de Michoacán, de recuperarse a la exposición a diferentes condiciones utilizadas para la preservación de alimentos (refrigeración a 6°C y actividad de agua reducida). Analizando sólo los casos en que las diferencias en el crecimiento fueron significativas con respecto al control sin estrés, se encontraron dos extremos, la cepa 196 que fue capaz de recuperarse a todos los tipos de estrés y la cepa 069 que se vio afectada por todas las condiciones. Sin embargo, todas las cepas lograron adaptarse a un cambio en la temperatura, a pesar de no ser la temperatura óptima de crecimiento para esta bacteria. En un estudio de recuperación y viabilidad bacteriana, el 85% de cepas de *Salmonella* spp. se mostró viable después de 12 años de conservación a temperatura ambiente, lo cual se le atribuye al mantenimiento de características fenotípicas por la influencia de factores externos como luz, humedad, temperatura y condiciones de almacenamiento que condicionan el mantenimiento de células viables (Weng-Aleman *et al.*, 2005). Las cepas analizadas provienen de diferentes municipios del estado de Michoacán, fueron colectadas en los años 2008-2011, poseen distinta ST, presentan diferente PV y fueron recolectados de distintos productos (carne de res, chorizo y queso). En este sentido, probablemente las condiciones ambientales de cada municipio o región de Michoacán, así como el año en que fueron recolectadas, hayan influido para que las cepas se recuperaran de diferente manera del estrés prolongado. Aunque la cepa 196 y la 69 son de secuencia tipo 213, la cepa 196 proviene de Pátzcuaro, región de clima más frío que Lázaro Cárdenas de donde proviene la cepa 69; además, la cepa 69 fue aislada de chorizo, alimento con

baja a_w , lo que parece indicar que el lugar de procedencia y el tipo de alimento influyen en la capacidad de resistir al estrés de las bacterias aisladas.

Por otro lado están las cepas 21, 96 y 109, las cuales provienen de Lázaro Cárdenas y Zamora, respectivamente, se pudieron recuperar del estrés a temperatura ambiente con o sin a_w . Existe evidencia de que la temperatura extrema y la precipitación están relacionados con eventos de infecciones por *Salmonella*, ya que aumentan el riesgo de adquirir la enfermedad causada por este microorganismo, esto se ve más pronunciado en comunidades costeras, ya que estas condiciones pueden ser más intensas en estas áreas (Jiang *et al.*, 2015). No obstante, la temperatura de almacenamiento es uno de los parámetros más importantes que regulan las actividades de los microorganismos en los sistemas alimentarios. Debido al impacto de la temperatura sobre todas las reacciones de la célula, la adaptación a las fluctuaciones de temperatura es posiblemente la respuesta más comúnmente investigada; sin embargo, la sensibilidad de las células al estrés por frío depende de varios factores, incluyendo la temperatura, la velocidad de refrigeración/congelación, el medio de cultivo, la cepa microbiana y la duración del almacenamiento. (Palumbo 1986; Gounot 1991; Berry y Foegeding 1997).

Estos resultados se contraponen con lo reportado para dos cepas de *S. Typhimurium* de genotipos DT104 y SL1344, cuya exposición prolongada a NaCl al 4% y a temperatura ambiente resultó ser bacteriostática para ambas cepas aunque el crecimiento fue aún menor en el estrés por refrigeración. Lo que sugieren que la baja temperatura, por sí misma como en combinación con otros tipos de estresantes, resulta ligeramente bactericida para ambas cepas (Humphrey *et al.*, 2011). También se sabe que la exposición de *Salmonella* a NaCl y KCl provoca cambios en la regulación de los sistemas de transporte de osmoprotectores (PROP, ProU, OSMU) y biosíntesis de la trealosa (Finn *et al.*, 2015). Está bien documentado que el condicionamiento transitorio de estrés puede llegar a inducir una tolerancia a situaciones de estrés más extremas y por lo tanto llevar a *Salmonella* a generar una protección cruzada a otras situaciones de estrés que puedan ejercer una presión en las células; la disminución de la tolerancia a temperaturas no óptimas después de una incubación prolongada a baja a_w puede estar relacionada con el gasto energético requerido en el mantenimiento de la homeostasis celular, ésta adaptación tal vez pueda hacer

que las proteínas celulares existentes pueden modificar su estructura y función cuando cambian las condiciones ambientales (Mattik *et al.*, 2000).

La capacidad de las células bacterianas para estabilizar y reforzar la estructura de la membrana es clave para la supervivencia cuando ésta se encuentra en un medio donde la presión osmótica sea alta. Si la bacteria es incapaz de hacer frente a la presión se puede encontrar con lisis y muerte celular. Cambios asociados a la membrana por la expresión génica pueden ser ejercidos con el fin de combatir las alteraciones en la osmolaridad debido a la presencia de humectantes como el NaCl y la reducción de agua intracelular (Finn *et al.*, 2015). Las técnicas de conservación de alimentos se basan en la producción de un entorno perjudicial para el crecimiento de microorganismos. Tradicionalmente, el salado, el escabechado y la refrigeración se han considerado como técnicas eficaces para reducir el deterioro microbiano de los alimentos mediante el uso de componentes bacteriostáticos y bactericidas (Humphrey *et al.*, 2011). Una vez que *Salmonella* ha contaminado un ambiente de producción de alimentos, su eliminación puede resultar difícil. Uno de los factores de riesgo más importantes para la contaminación por *Salmonella* en procesadoras de alimentos es la presencia de agua, ya que ésta permite el crecimiento y propagación del microorganismo en el ambiente y de esta manera eleva el riesgo de contaminación de los productos alimenticios (Finn *et al.*, 2013). Sin embargo, estos datos sugieren que cuando *Salmonella* está debilitada por lesiones inducidas por la exposición a estrés es capaz de reparar rápidamente los daños en la membrana tras la eliminación de los estresantes y las condiciones que resultan ser bacteriostáticas no puedan ser totalmente suficientes para evitar que se produzca la enfermedad causada por este microorganismo.

El 94% de las cepas formaron células filamentosas en condiciones de estrés prolongado, siendo más evidente en las condiciones de refrigeración a 6°C y a 6°C con a_w . Esta morfología en ocasiones se mostró demasiado prominente, ya que sufrieron un alargamiento físico excesivo, de igual manera se podía observar que algunas células sufrían un ligero alargamiento; estas morfologías fueron observadas tanto en la fase estacionaria como en la fase exponencial después de haber sido recuperadas en caldo LB a 37°C. El crecimiento filamentosos durante el estrés osmótico en la fase estacionaria y exponencial, ya se ha reportado para *S. enterica* serotipo

Typhimurium. (Prat *et al.*, 2012). En nuestro estudio la cepa 004, con ST 19 y PV 1, no desarrolló filamentos como el resto de cepas de estudio. Esto ya se ha reportado para *S. Typhimurium* y se ha asociado con un codón de inicio poco común para *rpoS*, el cual reprime la expresión de su proteína RpoS propiciando una menor frecuencia de filamentos en comparación de las demás cepas que fueron estudiadas; la formación de células filamentosas es el resultado del continuo aumento de la biomasa en ausencia de la división celular durante la exposición a estrés osmótico (Mattick *et al.*, 2000). También se ha encontrado que la exposición de *Salmonella* a bajas temperaturas o elevada concentración de NaCl a baja temperatura provoca una disminución en la filamentación durante las primeras 2 horas de recuperación, lo que sugiere que el crecimiento exponencial observado en las cepas de estudio es debido a la reanudación del crecimiento y no a la división de células filamentosas y que el desarrollo morfológico que presentan las bacterias puede llegar a tener gran importancia para el seguimiento microbiano de los alimentos, ya que la biomasa puede aumentar en ausencia de UFC dentro de un rango de 2 h durante la recuperación (Humphrey *et al.*, 2011).

Estas observaciones se suman a la evidencia de que la presencia de microorganismos filamentosos en los productos alimenticios tiene implicaciones importantes para la estimación de éstos (Humphrey *et al.*, 2011). Se cree que el estrés en condiciones de a_w reducida provoca una inhibición de proteínas asociadas a la división celular en *Salmonella*, esta condición bloquea la división; sin embargo, permite a las proteínas implicadas en el aumento de biomasa funcionar, lo que permite la formación de filamentos. Se cree que una baja a_w , afecta el grado de enrollamiento del DNA, que a su vez afecta la regulación de genes del control osmótico y puede interferir con la regulación de los genes de la división celular, provocando de esta manera la formación de filamentos (Mattick *et al.*, 2000). Se sabe que el crecimiento de filamentos en bacterias se produce en condiciones subóptimas, donde la división se inhibe, pero no se inhibe el crecimiento. Diferentes serotipos de *S. enterica* son capaces de desarrollar el crecimiento de filamentos en ambientes hiperosmóticos, ácidos, alcalinos y durante la refrigeración. Fenómeno que se ha observado en *E. coli* y *L. monocytogenes* en similares condiciones (Pratt *et al.*, 2012). Cuando este microorganismo se desplaza a un entorno de baja o alta presión osmótica, aumenta la presión osmótica interna para disminuir la turgencia celular, ya que esto ocurre cuando existe

una acumulación citoplasmática de solutos, los cuales son tolerados por toda la maquinaria celular (Rychlik *et al.*, 2005). El desarrollo de filamentos que se forman durante el estrés osmótico en presencia de humectantes adicionales, genera la formación de septos y su división en células individuales, lo que puede llegar a dificultar el análisis de las dosis infectivas y su evaluación, así como aumentar el riesgo de contraer una infección producida por *Salmonella* spp.

En este estudio se encontraron patrones metabólicos distintos para las 16 cepas de estudio, sólo una de ellas logró metabolizar 80 metabolitos presentes en la placa GNIII, el resto de las cepas logró metabolizar entre 32 y 57 metabolitos; esto nos indica que la cepa 016 tiene una mayor capacidad metabólica en comparación con el resto. En cuestión de los carbohidratos se encontró que la cepa 016 logra metabolizar el 85% de éstos, seguida de la cepa 004 con la utilización del 60%; el resto logra metabolizar el 50% y solo las cepas 116 y 196 metabolizaron el 20% y 10%, respectivamente. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la utilización de carbohidratos por nuestras cepas de estudios, donde encontramos que existe utilización de mayor importancia de dextrina, D-maltosa, D-celubiosa, D-turanosa, D-rafinosa, D-melibiosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil- β -D-manosamina, N-acetil ácido neuraminico, α -D-glucosa, D-galactosa, L-fucosa, L-ramnosa e Inosina. Utilizando otra metodología, se han reportado diferencias metabólicas de dos cepas de *S. Typhimurium*, ambas mostraron resultados idénticos con respecto a la utilización de L-ramnosa el cual es un azúcar glicoconjugado constituyente común de la mucosa intestinal y de las paredes celulares de las plantas (Staib y Fuchs, 2015), así como la utilización de D-melibiosa, se sabe que el 95% de las especies de *Salmonella* son fermentadoras de este azúcar, el cual está presente en plantas especialmente en leguminosas y se ha encontrado que una pérdida en la capacidad de utilizar este azúcar está fuertemente asociado con brotes de *S. Entitidis* (Yang *et al.*, 2015). Se ha observado, mediante la utilización de microplacas PM de Biolog™, la utilización de distintos sustratos comparando a dos cepas distintas de *Salmonella* spp. donde los azúcares que lograron metabolizar fueron D-melibiosa, D-galactosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil- β -D-manosamina, D-maltosa; estos son azúcares fáciles de utilizar, en los alimentos derivados de porcinos es ampliamente utilizado y por lo tanto puede estar presente abundantemente en el tracto gastrointestinal. Se propone que la diferencia en la utilización de distintos metabolitos dentro de una misma especie, puede

conferir ventaja competitiva en entornos y condiciones adecuadas, es decir, a temperaturas de 25°C y en el alimento que se le proporciona al animal; se sabe que las enterobacterias son capaces de metabolizar α -D-glucosa y generar el metabolismo secundario de N-acetil-D-glucosamina para su posterior paso a la glucólisis (Hayward *et al.*, 2015).

Para las hexosas utilizadas la cepa 016 mostró una mayor capacidad para metabolizar tanto D-glucosa-6-PO₄ y D-fructosa-6-PO₄; sin embargo las cepas 004, 028, 054, 069 y 115 lograron metabolizar ambas hexosas y las cepas 024, 089, 096 y 109 sólo metabolizaron una de éstas.

Para la utilización de Ácido Hexosas de nuevo la cepa 016 mostró una capacidad mayor para metabolizar L-ácido lacton galactónico, ácido místico, ácido quinico y D-ácido sacárico en contraste con todas las cepas de estudio. Se sabe que es característica de la mayoría de las enterobacterias. *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli* fermentan hexosas a través del piruvato, después de haber sido obtenido por la vía de Entner-Doudoroff, a ácido láctico, ácido acético, ácido succínico y ácido fórmico (García y Ponce, 2003). Para la utilización de aminoácidos la cepa 115 mostró una capacidad mayor para metabolizar glicil-L-prolina que el resto de las cepas, sin embargo la cepa 016 nuevamente muestra una capacidad mayor de metabolismo al utilizar, L-alanina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-histidina, L-ácido piroglutámico, L-serina. Para la utilización de ácidos carboxílicos se observó un mayor aprovechamiento del ácido γ -aminobutírico (GABA) por parte de la cepa 016. El ácido γ -aminobutírico puede ser encontrado en plantas, especialmente en el tomate y se piensa que puede jugar un papel importante en la señalización de enterobacterias (Watanabe *et al.*, 2002). Se sabe que la mayor parte de los miembros del grupo de las enterobacterias pueden utilizar un número considerable de sustancias orgánicas sencillas como substratos para su metabolismo respiratorio como es el caso de los aminoácidos. La regulación de la síntesis de aminoácidos ha sido estudiada en muchas de las bacterias entéricas (Stanier *et al.*, 1996) y se ha observado que la función principal de la vía de Entner-Doudoroff es aportar piruvato, el cual es un intermediario metabólico utilizado para la biosíntesis de aminoácidos (García y Ponce, 2003).

Para la utilización de NaCl, pudimos observar una diferencia estadística bajo la concentración del 8%, donde la cepa 016 fue la que mayor capacidad metabólica mostró bajo

esta condición. Se ha observado que esta concentración suele ser bacteriostático (Mattik *et al.*, 2000).

La vía de Entner-Doudoroff fue descubierta primero en *Pseudomonas saccharophila* y años después se encontró en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium. Este intermediario metabólico es muy importante, puesto que gran parte del piruvato formado es utilizado para la biosíntesis de aminoácidos, los cuales están involucrados en procesos anabólicos (García y Ponce, 2003). Estudios previos con los serotipos Agona, Enteritidis, Dar, Hvittingfoss, Infantis, Newport y Typhimurium utilizando la tecnología de microensayos fenotípicos encontraron pocas diferencias en la actividad metabólica entre los serotipos; sin embargo, algunos de los rasgos metabólicos se asociaron a los años de aislamiento de las cepas (Hayward *et al.*, 2015). Las placas de microarreglos fenotípicos pueden ser utilizadas para analizar la relación entre genotipo y fenotipo. Los aminoácidos se pueden utilizar como fuentes de nitrógeno ya que en muchos casos sólo necesitan una sola enzima tal como una transaminasa o desaminasa para liberar el amoníaco. Algunos aminoácidos también se pueden utilizar como fuente de carbono cuando éstos son desnaturalizados y pueden revelar la pérdida de funciones de transporte o enzimas catabólicas. (Tracy *et al.*, 2002).

Los enteropatógenos se caracterizan por tener capacidades metabólicas flexibles, como es el caso de *S. enterica*, ya que posee una ventaja selectiva durante la colonización de los tejidos del hospedero. Durante su ciclo de vida, puede adaptarse a una variedad muy amplia de nichos ambientales tanto dentro como fuera del hospedero, haciendo que su disponibilidad de nutrientes sea variable. Cuando éstos entran en el tracto gastrointestinal, pueden encontrarse con competidores de nutrientes presentes en la microbiota del hospedero. Esta limitación de nutrientes puede ser superada por adaptaciones metabólicas específicas que contribuyen a la proliferación dentro del anfitrión. La observación adicional de que algunas cepas han ganado capacidades metabólicas es consistente con reportes donde se concluye que las presiones ambientales pueden inducir cambios en vías metabólicas (Yang *et al.*, 2015).

Encontramos que la cepa 16 logró tener una mayor capacidad metabólica pero no mostró diferencia significativa en cuanto a velocidad de crecimiento. Observamos menor capacidad metabólica en la cepa 196 pero mostró una diferencia significativa en la velocidad de

crecimiento. Esto se puede deber a que las células de *Salmonella* pueden entrar en un estado fisiológico de latencia en la que siguen siendo activas metabólicamente y por lo tanto pueden presentar una fase de crecimiento exponencial posterior en menor o mayor grado (Habimana *et al.*, 2014).

En cuanto a la correlación entre la resistencia a estrés utilizando las velocidades de crecimiento obtenidas de las condiciones de exposición con respecto al metabolismo de los sustratos presentes en la placa GNII, se pudo observar correlación en la condición SE en los siguientes metabolitos β -metil-D-glucosido, ácido-D-glucorónico, ácido propionico y para el metabolismo en condición de NaCl al 1%. Esto resulta lógico ya que el análisis de la utilización de metabolitos solo se hizo en cepas no sometidas a estrés. Se ha reportado que cepas del serotipo Enteritidis afectadas en genes de virulencia, pueden crecer más fácilmente dentro del hospedero porque son capaces de aprovechar una gran variedad de sustratos como fuentes de C (Bochner *et al.*, 2008). También cepas del serotipo Typhimurium DT104 multi-resistentes a antibióticos y que están asociadas a epidemias, usan histidina y glioxilato como fuente de C; sin embargo, las cepas LT2 del mismo serotipo, no utilizan estas fuentes de C. Se ha visto que de dos cepas del serotipo Enteritidis las cuales son 99.9% idénticas en su genoma, solo la cepa metabólicamente más activa podía infectar huevos y presentaba mayor resistencia a antibióticos (Morales *et al.*, 2012). En este sentido resulta interesante analizar las capacidades de infección de las cepas aquí analizadas así como analizar sus capacidades metabólicas pero en condiciones de estrés.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- I. Las cepas de *S. Typhimurium* analizadas en este estudio poseen diferentes capacidades para recuperarse a la exposición de condiciones de preservación de alimentos (refrigeración y reducción de a_w). Aunque algunas cepas de estudio mostraron un retraso en el crecimiento después de haber sido expuestas a estrés prolongado, éstas lograron una recuperación en la sexta hora similar a las que no presentaron tal atraso.
- II. Sin estrés, la cepa que mostro una mayor velocidad de crecimiento fue la 069.
- III. Bajo la condición de TA las cepas 004, 089 y 109 mostraron una mayor velocidad de crecimiento f.
- IV. Bajo las condiciones de TA y a_w la cepa que mostró una mayor velocidad de crecimiento fue la cepa 096.
- V. En condición de 6°C la cepa que logró una mayor velocidad de crecimiento fue la cepa 196.
- VI. Bajo las condiciones de 6°C y a_w las cepas que lograron una mayor velocidad de crecimiento fueron las cepas 144 y 196.
- VII. Bajo estrés la mayoría de las cepas de estudio formaron células filamentosas, siendo estas más visibles cuando se someten a refrigeración y reducción de a_w . La cepa 004 no formó filamentos bajo ninguna condición de estrés.
- VIII. Las cepas de estudio mostraron una gran diversidad metabólica siendo la cepa 016 la metabólicamente más activa y la cepa 196 fue la que menor capacidad metabólica mostró.
- IX. No se encontró correlación entre el uso de los metabolitos analizados con la velocidad de crecimiento de las cepas expuestas a estrés.
- X. Se encontró correlación directa entre el crecimiento sin estrés y el metabolismo en presencia de β -metil-D-glucósido, NaCl al 1%, ácido-D-glucorónico y ácido propiónico. Así como una correlación inversa con β -metil-D-glucósido bajo la condición de 6°C.
- XI. Sabiendo que *Salmonella* es un enteropatógeno que puede estar presente en productos cárnicos y derivados lácteos, las medidas de seguridad e inocuidad alimentaria podrán reforzarse y mejorarse en base a los resultados obtenidos en este trabajo, para que este

microorganismo no logre sobrevivir a las bajas temperaturas y a las técnicas de salado, y de esta manera evitar futuros brotes de Salmonelosis.

- XII. Por otro lado determinadas cepas aquí analizadas tienen la capacidad de metabolizar una gran cantidad de sustratos, lo que sugiere que tienen una gran capacidad de sobrevivir a diversos ambientes y de esta manera poder llegar a un hospedero y lograr provocar una enfermedad.

10. CONCLUSIÓN

En general no hay una asociación entre la diversidad metabólica de las cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium aisladas de alimentos en el estado de Michoacán, con la resistencia a las condiciones a estrés asociadas a la preservación de alimentos. Esta asociación solo se presenta de manera particular para algunas cepas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altier C. 2005. Genetic and Environmental Control of *Salmonella* Invasion. The Journal of Microbiology. 43: 85-92.
2. Álvarez-Ordóñez A, Prieto M, Bernardo A, Hill C, López M. 2012. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. Food Research International 45: 482–492.
3. Appia-Ayme C, Patrick E, Sullivan MJ, Alston MJ, Field SJ, AbuOun M, Anjum MF, Rowley G. 2011. Novel Inducers of the Envelope Stress Response BaeSR in *Salmonella* Typhimurium: BaeR Is Critically Required for Tungstate Waste Disposal. Disponible en URL: www.plosone.org. Fecha de revisión: 26 de Noviembre 2014.
4. Bearson BL, Wilson L, Foster JW. 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-Dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. Journal of bacteriology. 180: 2409-2417.
5. Benenson AS and Chin J. 1995. Control of communicable diseases manual. American Public Health Association. Washington, DC.
6. Bergey DH and Hotl JG. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a Edición. pp 186-187.
7. Biolog. 2013. Part# 00P 185, Rev C. Revisado de: www.biolog.com. Fecha de revision: 10 de Noviembre del 2015.
8. Bochner B. 2009. Global phenotypic characterization of bacteria. FEMS Microbiololy Review. 33: 191–205.
9. Bochner BR, Giovannetti L and Viti C. 2008. Important discoveries from analysing bacterial phenotypes. *Molecular Microbiology*. 70: 274–280.
10. Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J and Bartkus JM. 2007. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis pulsed field gel electrophoresis and phagotyping for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. Journal of Clinical Microbiology. 45: 536-543.

11. Burr MD, Josephson KL, and Pepper IL. 1998. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Letters in Applied Microbiology*. 27: 24-30.
12. CAE, COMITÉ CIENTÍFICO DE SEGURIDAD AGROALIMENTARIA. 2008. Evaluación Del Riesgo Asociado a la presencia de los serovares zoonóticos de *Salmonella* en huevo fresco producido en la CAE.
13. Chaudhuri RR, Morgan E, Peters SE, Pleasance SJ, Hudson DL, Davies HM, Wang J, Van-Diemen M, Buckley AM, Bowen AJ, Pullinger GD, Turner DJ, Langridge GC, Turner AK, Parkhill J, Charles IG, Maskell DJ, Stevens MP. 2013. Comprehensive Assignment of Roles for *Salmonella Typhimurium* Genes in Intestinal Colonization of Food-Producing Animals. Disponible en URL: www.plosgenet.com. Fecha de consulta: 30 de septiembre del 2014.
14. Chauhan AK, Kang AC. 2014. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella ser. Typhimurium* in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. *Research in Microbiology*. 165: 559-565.
15. Cimon M. 2000. Rapid food-borne pathogen ID system is making a difference. *American Society for Microbiology News*. 66: 617-619.
16. Clements M, Eriksson S, Thompson A, Lucchini S, Hinton J, Normark S. 2002. Polynucleotide phosphorylase is a global regulator of virulence and persistency in *Salmonella enterica*. *PNAS*. 99:8784-8789.
17. Clements M, Eriksson S, Tezcan-Merdol D, Hinton JC, Rhen M. 2001. Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. *Annals of Medicine*. 33: 178-185.
18. Cohen JI, Bartlett JA, and Corey GR. 1987. Extra-intestinal manifestations of *Salmonella* infections. *Medicine (Baltimore)*. 66: 349-388.
19. Darwin KH, and Miller VL. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiological Reviews*. 12: 405-428.
20. Finn S, Condell O, McClure P, Amézquita P, Fanning S. 2013. Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in Microbiology*. 4: 331.

21. Finn S, Rogers L, Händler K, McClure P, Amézquita A, Hinton JC, Fanning S. 2015. Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to three humectants used in the food industry induces different osmo-adaptation systems. *Applied Environmental Microbiology*. 19: 6800-11.
22. Foley SL, White DG, McDermott PF, Walker RD, Rhodes B, Fedorka-Cray PJ, Simjee S, and Zhao S. 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:3569–3577.
23. García AM, Ponce E. 2003. Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. *Biología Aplicada*. 20: 85-94.
24. Gahan CGM y Hill C. 1999. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 50: 93–100.
25. George SM, Métris A, Baranyi J. 2015. Integrated Kinetic and Probabilistic Modeling of the Growth Potential of Bacterial Populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 81: 3228-3234.
26. Giammanco GM, Mammina C, Romani C, Luzzi I, Dionisi AM, Nastasi A. 2007. Evaluation of a modified single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) technique for subtyping *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Research in Microbiology*. 158: 10-17.
27. 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.
28. Habimana O, Nesse LL, Møretrø T, Berg K, Heir E, Vestby LK, Langsrud S. 2014. The persistence of *Salmonella* following desiccation under feed processing environmental conditions: a subject of relevance. *Letters in Applied Microbiology*. 59: 464-470.
29. Hawley, L, Ruebush, M. 2004. *Microbiology and Immunology Notes*. Editorial kaplan Medical. USA. pp 67-69.

30. Hayward MR, AbuOun M, Woodward MJ, Jansen VA. 2015. Temperature and Oxygen Dependent Metabolite Utilization by *Salmonella enterica* Serovars Derby and Mbandaka. PLOS ONE 23:1-10.
31. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DMA, Jensen AB, Wegener HC, AArestrup FM. 2011. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 8: 887-900.
32. Humphrey TJ. 1999. Aerosol route of experimental infection enhances the contamination of intact eggs and muscle of experimentally laying hens by *Salmonella typhimurium* DT 104. FEMS Microbiology Letters. 171: 203-207.
33. Humphrey TJ. 2004. *Salmonella*, stress responses and food safety. Nature Reviews Microbiology. 2: 504-509.
34. Humphrey S. Clark LF. Humphrey TJ. Jepson MA. 2011. Enhanced recovery of *Salmonella Typhimurium* DT104 from exposure to stress at low temperature. Microbiology. 157:1103–1114.
35. Insunza BM, Soto CM. 1998. Salmonellosis: Una enfermedad que se transmite por alimentos. Un nuevo desafío. Tecnovet. 4:2.
36. Jiang C. Shawa KS. Upperman CR. Blythe D. Mitchell CM. Murtugudde R. Sapkota AR. 2015. Climate change, extreme events and increased risk of salmonellosis in Maryland, USA: Evidence for coastal vulnerability. Environment International 83:58–62.
37. Jørgensen F, Leach S, Wilde SJ, Davies A, Stewart G, Humphrey T. 2000. Invasiveness in chickens, stress resistance and RpoS status of wild-type *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 and serovar Enteritidis phage type 4 strains. Microbiology. 146: 3227- 3235.
38. Justice SS, Hunstad DA, Cegelski L, Hultgren SJ. 2008. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. Nature Reviews Microbiology. 6: 162-168.
39. Kauko T. Haukka K. AbuOun M. 2010. Phenotype Microarray™ In The Metabolic Characterisation Of *Salmonella* Serotypes Agona, Enteritidis, Give, Hvittingfoss, Infantis,

- Newport And Typhimurium. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 29:311–317
40. Kenyon WJ, Spector MP. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*. 45: 455–481
41. Klingler JM, Stowe RP, Obenhuber DC, Groves TO, Mishra SK, Pierson DL. 1992. Evaluation of the Biolog Automated Microbial Identification System. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 2089–2092.
42. Knudsen GM, Nielsen M-B, Thomsen LE, Aabo S, Rychlik I, Olsen JE. 2014. The role of ClpP, RpoS and CsrA in growth and filament formation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at low temperature. *BMC Microbiology*. 14:208.
43. Lavalett L, Sánchez MM, Muñoz N, Moreno J, Cardona-Castro N. 2009. Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2, D y E de *Salmonella enterica*. *Biomédica*. 29:244-252.
44. Leyer GJ, Johnson EA. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:1842-1847.
45. Liebana E, Garcia-Migura L, Guard-Petter J, McDowell SWJ, Rankin S, Opitz HM, Clifton-Hadley FA, and Davies RH. 2002. *Salmonella enterica* serovar enteritidis phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29, and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 196-209.
46. Margas E, Meneses N, Conde-Petit B, Dodd CER, Holah J. 2014. Survival and death kinetics of *Salmonella* strains at low relative humidity, attached to stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology* 187:33–40.
47. Matches JR y Liston J. 1968. Low Temperature Growth of *Salmonella*. *Journal of Food Science*. 33: 641-645.
48. Mattick KL, Jørgensen L, Legan JD., Cole MB, Porter J, Lappin-Scott HM, Humphrey TJ. 2000. Survival and Filamentation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 at Low Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 1274–1279.

49. Mattick KL, Jørgensen F, Legan JD, Lappin-Scott HM, Humphrey TJ. 2000. Habituation of *Salmonella spp* at Reduced Water Activity and Its Effect on Heat Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4921-4925.
50. Mattick KL, Phillips LE, Jørgensen F, Lappin-Scott HM, Humphrey TJ. 2003. Filament Formation by *Salmonella spp* Inoculated into Liquid Food Matrices at Refrigeration Temperatures, and Growth Patterns When Warmed. *Journal of Food Protection*. 2: 175-340.
51. McMahon MAS, McDowell DA, Blair IS. 2007. The pattern of pleiomorphism in stressed *Salmonella* Virchow populations is nutrient and growth phase dependent. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 276-281.
52. Morales CA, Guard J, Sanchez-Ingunza R, Shah DH, Harrison M. 2012. Virulence and Metabolic Characteristics of *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis Strains with Different *sefD* Variants in Hens. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 6405-6412.
53. Morgan RW, Christman MF, Jacobson FS, Storz G, Ames BN. 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella* Typhimurium overlap with heat shock and other stress proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 83:8059-8063.
54. Ortega-Cabrera R. 2007. Epidemiología y caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos en aislamientos clínicos de *Salmonella spp* Tesis de Doctoral. Universidad de Barcelona.
55. Pachón-Cubillos DA, 2009. Aislamiento, Identificación Y Serotipificación De Enterobacterias Del Género *Salmonella* En Una Población De *Crocodylus Intermedius* Y Testudinos Mantenidos En Cautiverio En La Estación De Biología Tropical Roberto Franco E.B.T.R.B De La Facultad De Ciencias –Universidad Nacional De Colombia En Villavicencio– Meta. Trabajo De Grado. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Básicas Programa Profesional De Microbiología Agrícola Y Veterinaria Bogotá D.C
56. Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E and Vaca S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhea in Mexican children. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 6:17.

57. Pegues DA, Ohi ME, and Miller SI 2005. *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. En Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Sixth Edition, G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin, eds. (Philadelphia: Elsevier), pp. 2636–2654.
58. Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW, and Gheeling LL. 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. 152: 907-909.
59. Pratt ZL, Chen B, Czuprynski CJ, Wong AC, Kaspara CW. 2012. Characterization of Osmotically Induced Filaments of *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 78. 18. pp. 6704–6713
60. Regalado-Pineda ID, 2011. Aislamiento y Caracterización Bioquímica y Genética de *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* en productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán, México. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
61. Rychlik I, Barrow A. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonization and infection. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 1021–1040
62. Rodríguez S, Santos G. 2014. Detección de *Salmonella* spp en muestras de carcasas porcinas obtenidas en camales de Lima. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
63. Ruby T, McLaughlin L, Gopinath S, Monack D. 2012. *Salmonella's* long-term relationship with its host. *FEMS Microbiology Reviews*. 36:600–615
64. Rychlik I, Barrow PA. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonization and infection. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 1021-1040.
65. Sangal V, Harbottle H, Mazzoni CJ, Helmuth R, Guerra B, Didelot X, Paglietti B, Rabsch W, Brisse S, Weill FX, Roumagnac P, Achtman M. 2010. Evolution and population structure of *Salmonella enterica* serovar Newport. *Journal of Bacteriology*. 192:6465–6476.
66. Scaramelli A, Citti R, González I, Páez L, Tromp J. 1999. Investigación de *Salmonella* sp. En muestras de queso blanco duro" tipo llanero" del distrito sanitario 1 del estado Aragua, Venezuela. *Revista Científica*. 9:003.

67. Staib L, Fuchs TM. 2015. Regulation of fucose and 1,2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1-11.
68. Stanier RY, Igraham JL, Wheelis ML, Painter PR. 1996. Propiedades communes del grupo entérico. *Microbiology*. Editorial Reverté. Pp: 471.
69. SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales. 2010.
70. Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, and Euzéby JP. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 521-524.
71. Tracy BS, Edwards KK, Eisenstark A. 2002. Carbon and nitrogen substrate utilization by archival *Salmonella Typhimurium* LT2 cells. *BMC Evolutionary Biology*. 2: 2-14.
72. 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 en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
73. Voogt N, Wannet WJ, Nagelkerke NJ, and Henken AM. 2002. Differences between national references laboratories of the European community in their ability to serotype *Salmonella* species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 21: 204-208.
74. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H (2002). «GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International Review of Cytology*. 213. pp. 1-47.
75. Wattiau P, Boland C, Bertrand S. 2011. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 7877-7885.
76. Weng-Aleman Z, Junco-Díaz R, Díaz-Rosa OE, Álvarez-Molina I, Beltrán-Díaz JR, Rodríguez-Salazar MC. 2005. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 43: 23-28.

77. WHO. 2002. *Foodborne diseases, emerging*. Geneva, World Health Organization. Fact Sheet N°124.
78. WHO. 2008. *Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control*. Geneva, World Health Organization.
79. WHO. 2013. *Enfermedades Diarreicas*. Centro de Prensa.
80. Winfield MD, Groisman EA. 2003. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 3687-3694.
81. Yang J, Barrila J, Roland LK, Kilbourne J, Ott CM, Forsyth RJ, Nickerson CA. 2015. Characterization of the Invasive, Multidrug Resistant Non-typhoidal *Salmonella* Strain D23580 in a Murine Model of Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. DOI:10.1371/journal.pntd.0003839
82. Yanga Y, Kumara A, Zhenga Q, Yuka H-G. 2015. Preacclimation alters *Salmonella* Enteritidis surface properties and its initial attachment to food contact surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 128:577–585
83. Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-García MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott Zhao S, McDermott P, and Tollefson L. 2008. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella spp* in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. 14: 429-4353.