



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

TESIS:

**PERFIL DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Salmonella enterica* AISLADAS DE ALIMENTOS DE  
MICHOACÁN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

PRESENTA:

**CONSUELO ACOSTA MARTINEZ**

DIRECTORA DE TESIS:

**D. EN C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS**

CO-DIRECTOR:

**D. EN C. ADRIÁN GÓMEZ BALTAZAR**

**MORELIA MICHOACÁN, NOVIEMBRE 2019**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y la co-asesoría del D. en C. Adrián Gómez Baltazar.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres y abuelos por el apoyo moral y económico que no solo este proyecto implicó, sino también mi formación durante los cinco años de carrera. A quienes les debo cada uno de mis logros por darme las bases y argumentos para formar a la persona que soy el día de hoy. A mi madre especialmente por su apoyo incondicional porque ha sido mi mayor motivación e inspiración en esta vida tanto en lo profesional como en lo personal.

A mi directora de tesis D.C Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas, por permitirme ser parte del equipo de trabajo del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, el cual fue una maravillosa experiencia no solo en cuanto al aprendizaje, sino también en convivencia.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, de los cuales me llevo grandes conocimientos. Especialmente a mi co-director D.C Adrián Gómez Baltazar, por contribuir en este proyecto y ser parte de mi formación en este campo.

Al M. C. Marco Iván Valle Maldonado por su apoyo en cuanto a la cuantificación del ADN de las muestras.

Al QFB Alan Michel Pérez Espino persona clave anímicamente en la fase más importante de mi proyecto, de quien aprendí grandes cosas que contribuyeron a mejorar mi persona, y ver siempre lo positivo de los momentos negativos.

A César Xavier Rueda Suárez, por lo compartido en cuanto a conocimientos en algunas de las técnicas de biología molecular.

A cada una de las personas, infinitas gracias, hicieron de este proyecto la mejor experiencia de mi vida, me llevo una gran satisfacción pues no solo exploté mi conocimiento, adquirí capacidades nuevas, aprendí a tomar de los momentos malos lo bueno y de los momentos buenos, mejorarlos para hacerlos increíbles.

*“Fue el tiempo que pasaste con tu rosa lo que la hizo tan importante “*

*El Principito*

## CONTENIDO

Índice general.....	i
Índice de tablas.....	ii
Índice de figuras.....	iii
Abreviaturas.....	iv
Resumen.....	vi
Abstract.....	viii

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Salmonelosis.....	1
1.2 Taxonomía.....	2
1.3 Características morfológicas de <i>Salmonella enterica</i> .....	3
1.4 Características bioquímicas de <i>Salmonella enterica</i> .....	3
1.5 Serotipificación de <i>Salmonella</i> .....	3
1.6 Patogenicidad de <i>Salmonella enterica</i> .....	4
1.7 Mecanismo de invasión de <i>Salmonella</i> .....	5
1.8 Islas de patogenicidad.....	7
1.9 Tipificación genético molecular de <i>Salmonella</i> .....	10
1.9.1 Virulotipificación.....	10
1.10 Resistencia a antibióticos.....	11
1.11 Antecedentes del grupo de trabajo.....	14
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>4. OBJETIVO</b> .....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
<b>5. ESTRATEGIA</b> .....	19
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
6.1 Cepas bacterianas analizadas en este estudio.....	20
6.2 Extracción de ADN.....	23
6.3 Amplificación por PCR de los genes de virulencia.....	23
6.4 Construcción de dendrogramas de similitud.....	24
<b>7. RESULTADOS</b> .....	25
7.1 Amplificación por PCR de los genes de estudio en las cepas de referencia y en las cepas de estudio.....	23
7.2 Resistencia a antimicrobianos.....	44
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	50
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	54
<b>10. ANEXOS</b> .....	55
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

No.	DESCRPCIÓN	Pag.
1	Situación epidemiológica internacional Diciembre 2015, según el Centro de Dirección Ministerial de Salud Pública de La Habana, Cuba.....	1
2	Condiciones para el crecimiento de <i>Salmonella</i> de acuerdo con la Red Nacional de Protección de Alimentos (RENAPRA).....	3
3	Relación cantidad-porcentaje respecto al serotipo vs. tipo de muestra.....	21
4	Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	23
5	Condiciones para las amplificaciones de PCR de acuerdo al gen.....	24
6	Resultados obtenidos en la amplificación por PCR punto final (1: presencia del gen, 0: ausencia del gen).....	26
7	Perfiles de virulencia encontrados en los 134 cepas analizados.....	26
8	Relación cantidad-porcentaje de presencia de gen de virulencia por cada serotipo analizado.....	28
9	Relación de cantidad-porcentaje de cada uno de los PV encontrados en los serotipos analizados.....	30
10	Relación de cantidad-porcentaje en cada uno de los genes de virulencia analizados por municipio.....	33
11	Relación cantidad-porcentaje de cada uno de los 5 PV encontrados por municipio.....	35
12	Relación de cantidad-porcentaje de cada uno de los genes de virulencia analizados por tipo de muestra.....	37
13	Relación de cantidad-porcentaje de cada uno de los 5 PV encontrados en el estudio por tipo de muestra analizada.....	38
14	Relación cantidad-porcentaje de genes de virulencia por mes de ingreso.....	40
15	Cantidad (porcentaje) de cada PV por mes de obtención.....	41
16	Resultados del antibiograma realizados a las cepas analizadas.....	44
17	Asociación de resistencia a antimicrobianos respecto al PV1.....	47
18	Asociación de resistencia a antimicrobianos respecto al PV2.....	48
19	Asociación de resistencia a antimicrobianos respecto al PV3.....	49
20	Asociación de resistencia a antimicrobianos respecto al PV5.....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Descripción	Pag.
1	Clasificación del género <i>Salmonella</i> .....	1
2	Mecanismos de invasión de <i>Salmonella enterica</i> .....	6
3	Inducción de la enfermedad intestinal causada por <i>Salmonella enterica</i> .....	7
4	Composición estructural de una isla de patogenicidad.....	8
5	Relación cantidad-porcentaje de serotipos analizados .....	20
6	Relación cantidad –porcentaje por municipio analizado .....	21
7	Relación cantidad –porcentaje por cada tipo de muestra analizado.....	22
8	Amplificación gen <i>ssaQ</i> .....	25
9	Amplificación de gen <i>rmbA</i> .....	25
10	Amplificación de gen <i>spi4-F</i> .....	25
11	Dendrograma de similitud entre los genes <i>ssaQ</i> , <i>rmbA</i> y <i>spi4-F</i> analizados basados en los PV .....	27
12	Cantidad de genes analizado con respecto a los serotipos.....	29
13	Dendrograma de similitud entre los serotipos analizados con basa a la presencia de los genes de virulencia .....	30
14	Relación de cantidad de PV por cada serotipo analizado.....	32
15	Dendrograma de similitud entre los 38 serotipos analizados con base en los PV.....	33
16	Cantidad de gen de virulencia por municipios.....	34
17	Cantidad de PV por municipio.....	36
18	Dendrograma de similitud entre los municipios de origen de las cepas con base en los PV.....	37
19	Cantidad de cada uno de los genes de virulencia analizados por tipo de muestra.....	38
20	Relación de cantidad de cada uno de los 5 PV encontrados por cada tipo de muestra.....	39
21	Dendrogramas de similitud construida con tipo de muestra analizada con base en la presencia de los PV.....	39
22	Relación cantidad de gen de virulencia por mes de incidencia.....	40
23	Cantidad de cada uno de los 5 PV por mes de ingreso.....	42
24	Dendrograma de similitud empleando perfil de virulencia con base en el mes de ingreso.....	43
25	Mapa de distribución de los 5 PV encontrados en este estudio.....	43

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AK</b>	Amikacina
<b>AM</b>	Ampicilina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CB</b>	Carbenicilina
<b>CF</b>	Cefalotina
<b>CL</b>	Cloranfenicol
<b>CRO</b>	Ceftriaxona
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>dATP</b>	Deoxinucleósido Trifosfato de Adenina
<b>dCTP</b>	Deoxinucleósido Trifosfato de Citocina
<b>dGTP</b>	Deoxinucleósido Trifosfato de Guanina
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleósido trifosfato
<b>dTTP</b>	Deoxinucleósido Trifosfato de Timina
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiamino Tetraacético
<b>G-C</b>	Guanina-Citocina
<b>GE</b>	Gentamicina
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>LBA</b>	Agar Luria-Bertani
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Ion de magnesio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NET</b>	Netilmicina
<b>NF</b>	Nitrofurantoina
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NOF</b>	Norfloxacina

<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PEF</b>	Cefepime
<b>PV</b>	Perfil de Virulencia
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>S</b>	Sensible
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de Sodio
<b>seg</b>	Segundos
<b>SPI</b>	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>
<b>SST3</b>	Sistema de Secreción Tipo 3
<b>SVC</b>	Vacuola que contiene <i>Salmonella</i>
<b>SXT</b>	Sulfametoxazol/Trimetroprim
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar

## RESUMEN

*Salmonella enterica* es a nivel mundial uno de los 4 principales organismos responsables de provocar enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos contaminados. La virulotipificación (perfil de virulencia o PV) basada en la detección de genes de virulencia, localizados en las islas de patogenicidad (SPI), ha demostrado ser una herramienta eficiente para la identificación y agrupación de cepas/clonas de *S. enterica*. Se han identificado 21 islas de patogenicidad, los genes localizados en la SPI-2 son los responsables de regular la replicación y supervivencia de *Salmonella enterica* al interior de células epiteliales y fagocíticas, los que se encuentran en la SPI-3 están implicados en la supervivencia intracelular en macrófagos y su crecimiento en condiciones limitadas de  $Mg^{2+}$ , y los que se encuentran en la SPI-4 llevan a cabo la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos. Los genes *ssaQ*, *rmbA* y *spi4-F*, están localizados en las SPI-2, SPI-3 y SPI-4 respectivamente. En este trabajo se evaluó la asociación entre la resistencia a antimicrobianos y el PV. Se extrajo por el método del fenol-cloroformo el ADN de 134 cepas de *S. enterica* provenientes de productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán. Se amplificaron por PCR los genes *ssaQ*, *rmbA* y *spi4-F* y de acuerdo a las combinaciones de presencia o ausencia se construyeron dendrogramas. Se encontraron cinco PV: PV1 (*ssaQ*, *rmbA*, *spi4-F*), PV2 (*ssaQ*, *rmbA*), PV3 (*rmbA*, *spi4-F*), PV4 (*ssaQ*, *spi4-F*), PV5 (*ssaQ*). Se encontró prevalencia del PV1 en los serotipos Newport, Derby y Panama; para el PV2 en los serotipos Mbandaka, Morganii y Muenster; El PV3 se encontró con mayor incidencia en Derby y Enteritidis; y para el caso de PV4 y PV5 solo se encontraron en los serotipos Oranienburg y Montevideo respectivamente. Se detectó la incidencia del PV1 en los municipios de Morelia, Lázaro Cárdenas y Uruapan; el PV2 se detectó en Morelia y Uruapan; el PV3 se detectó en José Sixto Verduzco y Morelia; PV4 se encontró en Lázaro Cárdenas, así como el PV5 solo en José Sixto Verduzco. El análisis de los dendrogramas arrojó que los serotipos Give, Braenderup, Bovismorbificans, Azteca, anatum, Albany, Agona, Adelaide, Havana, Infantis, Lockleaze, London, Muenchen, Newport, Panama, Poona, Saintpaul, Sandiego, Seftenberg, serogrupo B, Serogrupo C1, Serogrupo D, Serogrupo E1, Serogrupo E4, Sintorf, Typhimurium, Vejle, Vismorbifica y Weltrevrden, se agrupan en un mismo clado mientras que el serotipo Derby y Enteritidis se encuentran en otro; Mbandaka, Morganii y Muenster son diferentes a Oranienburg y Montevideo. Se encontró correlación entre el PV y la procedencia geográfica de La Piedad, Jacona, Huetamo, Gabriel Zamora, Ciudad Hidalgo, Churumuco, Apatzingán, Angamacutiro, Angangueo, Los Reyes, Mújica, Ocampo, Pátzcuaro, Tlazazalca, Tuzantla, Yurécuaro, Zamora y Zitácuaro. Los municipios de Lázaro Cárdenas, Morelia, Uruapan y José Sixto Verduzco fueron los que presentaron mayor diversidad de PV. Se encontraron las siguientes correlaciones: entre el PV1 y la resistencia a Amikacina, Ampicilina, Carbenicilina, Cloranfenicol y Sulfametoxazol/Trimetroprim; entre el PV2 y PV3 y la resistencia a Sulfametoxazol/Trimetroprim, Nitrofurantoina y Cloranfenicol; entre el PV4 y las resistencias a Carbenicilina y por último entre el PV5 y la resistencia a Gentamicina, Amikacina, Carbenicilina y Netilmicina.

**Palabras clave:** Genotipificación, Virulencia, Resistencia a antibióticos, Isla de Patogenicidad, PCR.

## ABSTRACT

*Salmonella enterica* is one of the 4 main organisms responsible for causing gastrointestinal diseases transmitted by contaminated food worldwide. The virulotype (virulence profile or PV) based on the detection of virulence genes, located in the pathogenicity islands (SPI), has proven to be an efficient tool for the identification and grouping of *S. enterica* strains/clones. 21 islands of pathogenicity have been identified, the genes located in SPI-2 are responsible for regulating the replication and survival of *Salmonella enterica* within epithelial and phagocytic cells, those found in SPI-3 are involved in survival intracellular macrophages and their growth under limited conditions of Mg<sup>2+</sup>, and those found in SPI-4 carry out the secretion of toxins and it is believed that it participates in the adaptation of *Salmonella* to the intracellular environment in macrophages. The *ssaQ* genes, *rmbA* and *spi4-F*, are located in SPI-2, SPI-3 and SPI-4 respectively. In this work the association between antimicrobial resistance and PV was evaluated. The DNA of 134 strains of *S. enterica* from meat products and dairy products from Michoacán was extracted by the phenol-chloroform method. The *ssaQ*, *rmbA* and *spi4-F* genes were amplified by PCR and dendrograms were constructed according to the presence or absence combinations. Five PVs were found: PV1 (*ssaQ*, *rmbA*, *spi4-F*), PV2 (*ssaQ*, *rmbA*), PV3 (*rmbA*, *spi4-F*), PV4 (*ssaQ*, *spi4-F*), PV5 (*ssaQ*). PV1 prevalence was found in the Newport, Derby and Panama serotypes; for PV2 in the serotypes Mbandaka, Morganii and Muenster; PV3 was found with a higher incidence in Derby and Enteritidis; and in the case of PV4 and PV5 they were only found in the Oranienburg and Montevideo serotypes respectively. The incidence of PV1 was detected in the municipalities of Morelia, Lázaro Cárdenas and Uruapan; PV2 was detected in Morelia and Uruapan; PV3 was detected in José Sixto Verduzco and Morelia; PV4 was found in Lázaro Cárdenas, as well as PV5 only in José Sixto Verduzco. The analysis of the dendrograms showed that the serotypes Give, Braenderup, Bovismorbificans, Aztec, anatum, Albany, Agona, Adelaide, Havana, Infantis, Lockleaze, London, Muenchen, Newport, Panama, Poona, Saintpaul, Sandiego, Seftenberg, serogroup B, Serogroup C1, Serogroup D, Serogroup E1, Serogroup E4, Sintorf, Typhimurium, Vejle, Vismorbifica and Weltrevrden, are grouped in the same clade while the Derby and Enteritidis serotype are in another; Mbandaka, Morganii and Muenster are different from Oranienburg and Montevideo. A correlation was found between the PV and the geographical origin of La Piedad, Jacona, Huetamo, Gabriel Zamora, Ciudad Hidalgo, Churumuco, Apatzingán, Angamacutiro, Angangueo, Los Reyes, Mújica, Ocampo, Pátzcuaro, Tlazalca, Tuzantla, Yurécuaro, Zamora and Zitácuaro. The municipalities of Lázaro Cárdenas, Morelia, Uruapan and José Sixto Verduzco were the ones that presented the greatest diversity of PV. The following correlations were found: between PV1 and resistance to Amikacin, Ampicillin, Carbenicillin, Chloramphenicol and Sulfamethoxazole / Trimetroprim; between PV2 and PV3 and resistance to Sulfamethoxazole / Trimetroprim, Nitrofurantoin

and Chloramphenicol; between PV4 and Carbenicillin resistance and finally between PV5 and resistance to Gentamicin, Amikacin, Carbenicillin and Netylmicin.

**Key words:** Genotyping, Virulence, Resistance, *Salmonella* pathogenicity islands, amplification

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Salmonelosis

*Salmonella* es responsable de causar una de las enfermedades de transmisión alimentaria más común en el mundo debido a su amplia distribución, según la OMS se estima que anualmente ocurren alrededor de 1300 millones de casos de Salmonelosis no tifoidea y 16.6 millones de casos de fiebre tifoidea (OMS, 2018).

*Salmonella* ocupa el primer lugar por intoxicación alimentaria en diversos países como son Reino Unido, España y EUA. En EUA se estima que *Salmonella* puede causar aproximadamente 1,028 millones de enfermedades anualmente, ya que en el 2008, de 1200 hospitalizaciones el 62% fue debido a *Salmonella* (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, 2011). Por lo que en los últimos años ha generado un impacto en la salud pública, pues es responsable de diversos brotes a nivel mundial. En México, la Secretaría de Salud reporta anualmente un promedio de 68,000 casos de infecciones. Según la OMS (2018), una de cada diez personas contrae la enfermedad, de 550 millones de personas, 220 millones suelen ser niños.

El problema de la salmonelosis es el resultado de la globalización y apertura económica, puesto que cada vez es más normal que las personas ingieran alimentos fuera de casa aumentando su riesgo de contacto con *Salmonella* (OMS, 2011). En 2015 el Centro de Dirección Ministerial de Salud Pública de la Habana, realizó estadísticas Salmonella enterica en las diferentes regiones del mundo (Tabla 1).

**Tabla 1.** Situación epidemiológica internacional de la salmonelosis (Centro de Dirección Ministerial de Salud Pública de la Habana, Cuba, diciembre, 2015).

<i>Continentes</i>	<i>Cifras epidemiológicas</i>
<i>Región África</i>	Causa 32,000 muertes por año.
<i>Región América</i>	77 millones de personas enferman y mueren 9000 al año, 31 millones son menores y de ellos mueren 2000 al año.
<i>Región del mediterráneo</i>	100 millones de personas contraen la enfermedad, 32 millones de las personas afectadas son niños menores de 5 años.
<i>Europa</i>	23 millones de personas se enferman cada año.
<i>Región Asia</i>	150 millones de casos y 175000 muertes al año de los cuales cerca del 60 millones son niños menores de 5 años y 50000 mueren al año.
<i>Pacífico</i>	125 millones enferman al año y mueren más de 50000 personas de los cuales 40 millones son niños menores de 5 años y mueren 7000 al año.

Presenta una distribución tanto en humanos como en animales (ganado bovino, porcino, aves) encontrándose por ende en alimentos como lo son leche cruda, queso, chorizo, carne, pollo, huevo, y en hortalizas ya que estas pueden ser regadas con aguas negras (Jurado, Arenas, Doblas, Torre, 2010).

*Salmonella* tiene una incidencia estacional, presenta aumento de casos a partir de mayo, con un pico máximo en julio y agosto, y una declinación a partir de septiembre. Esto se debe a que en verano suele incrementarse la ingesta de alimentos crudos o alimentos elaborados con huevo (Guitierrez et al., 2000). Un alimento que es susceptible a una contaminación de origen fecal en cada una de sus fases de producción, almacenamiento, distribución y preparación puede transmitir la infección, esta situación involucra dos variantes, la primera comprende directamente al alimento o bebida, la segunda variante está relacionada con el hospedero, esto involucra la virulencia de la cepa, la dosis infectiva y su sistema inmunológico.

## 1.2. Taxonomía

El género *Salmonella*, está formado por bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, se caracteriza por presentar un tamaño de 2 a 3 x 0.4 a 0.6 micras. *Salmonella* se encuentra dividida actualmente en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*; esta última dividida en 6 subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtanae* e *indica*) (Figura 1). La Organización Mundial de Salud (OMS) contabiliza más de 30 serogrupos y más de 2500 serotipos de *Salmonella* (Toro, 2013). Estos serogrupos están divididos de esta forma de acuerdo a su respuesta serológica (de acuerdo a la propuesta de Kaufmann y modificaciones recientes de acuerdo a los hallazgos genéticos del *Who collaborating center for reference and research on Salmonella*).

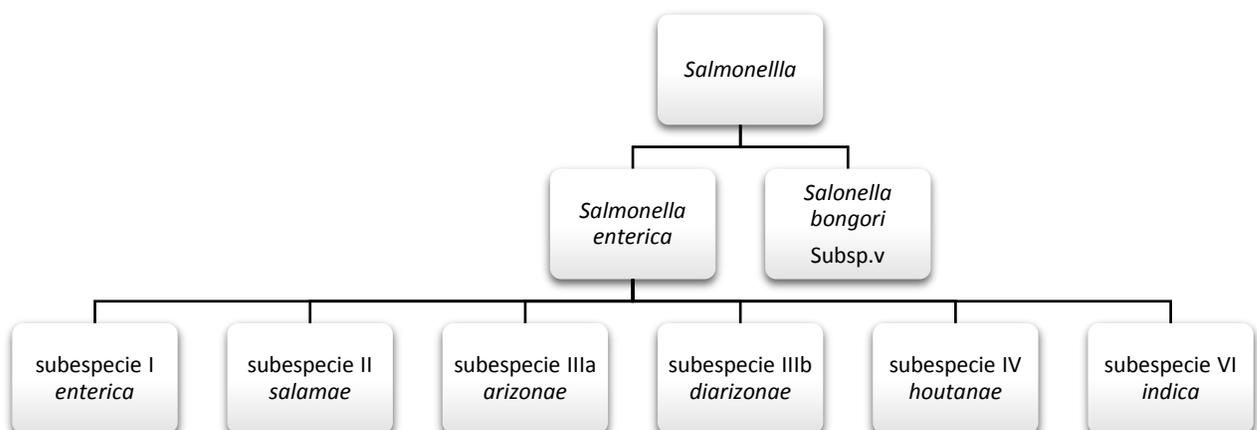


Figura 1. Clasificación del género *Salmonella*.

### 1.3. Características morfológicas de *Salmonella enterica*

*Salmonella enterica* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulado, su tamaño oscila entre 0.3 a 1 micrómetro x 1.0 a 6.0 micrómetro, presentan colonias de 2 a 3 milímetros en un tiempo de crecimiento de 18 a 24 horas, a excepción de algunos serotipos que presentan colonias de menor tamaño (Parra et al., 2002).

### 1.4 Características bioquímicas de *Salmonella enterica*

Bioquímicamente se caracterizan por tener metabolismo oxidativo y fermentativo, reducen nitritos y nitratos, utilizan el citrato como única fuente de carbono produciendo H<sub>2</sub>S, ureasa negativa, tetrionato reductasas, no desaminan fenilalanina, en la fermentación de la glucosa u otros hidratos de carbono producen ácido y gas (excepto *Salmonella typhi*), son oxidasas negativas. No fermentan lactosa (excepto *Salmonella enterica* subespecie *arizonae* y *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae*) (Toro, 2013).

Para su crecimiento óptimo requiere de un pH entre 6.6 y 8.2, no tolera grandes concentraciones de sal, se destruye a temperatura de pasteurización de la leche. Es sensible al calor y a desinfectantes como cloro y formaldehído. La dosis infectiva es de 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/g, aunque puede ser de 1 UFC/g dependiendo de la virulencia de la cepa, sistema inmunológico y edad del hospedero (Red Nacional de Protección de Alimentos, 2016) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Condiciones para el crecimiento de *Salmonella* de acuerdo con la Red Nacional de Protección de Alimentos (RENAPRA).

Condiciones	Mínimo	Optimo	Máximo
Temperatura	5.2 (la mayoría de los serotipos no crecen a temperaturas menores de 7 °C)	35-43 °C	46.2 °C
pH	3.8	7-7.5	9.5
Actividad acuosa (a <sub>w</sub> )	0.94	0.99	Mayor de 0.99

### 1.5 Serotipificación de *Salmonella enterica*

*Salmonella enterica* presenta más de 2435 serotipos (de acuerdo con el esquema de Kauffman White), siendo los más frecuentes *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium. Esta clasificación de serotipos se deriva de la composición de antígenos que presenta la bacteria, los cuales son tres: un antígeno somático (O) presente en la pared bacteriana, siendo un polisacárido termostable de tipo específico; antígeno flagelar (H) el

cual es proteínico termolábil que se encuentra constituido por flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado (Granda, 2015); y el antígeno capsular (k) el cual es un antígeno termolábil, el cual solo se encuentra en *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi y *Salmonella* Dublin siendo el responsable de que no ocurra una aglutinación de sueros anti O, este antígeno es también llamado como Ag (Vi) (Pérez y Cardozo, 2014).

Algunos serotipos de *Salmonella* tienen especificidad por ciertos hospederos, por ejemplo, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi y *Salmonella* Sendai están adaptados solo a hospederos humanos; en el caso de *Salmonella* Gallinarum es específica para aves. *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis se encuentran tanto en animales y humanos, ya que los animales funcionan para algunos serotipos como reservorios de la infección humana (Parraet al., 2002).

### **1.6 Patogenia de *Salmonella enterica***

*Salmonella* se encuentra en el tracto gastrointestinal de ganado porcino, bovino, roedores, mascotas incluyendo iguanas y serpiente, así como en personas. La principal vía de entrada de *Salmonella* es por contacto oral-fecal, ya que se ubica y multiplica en intestino, y es eliminada en la materia fecal. *Salmonella* causa dos tipos de padecimientos, gastroenteritis y fiebre tifoidea. La gastroenteritis es causada por *Salmonella* no tifoidea, la cual se caracteriza por provocar náuseas, vómito, cólico abdominal y diarrea, los cuales se presenta entre 6 y 72 h después de su ingesta a través de alimentos o bebidas contaminadas y tienen una evolución de 4 a 7 días. Los síntomas se observan severos en niños, ancianos y personas con sistema inmune comprometido. Después de que los síntomas desaparecen se pueden tener evacuaciones en las cuales se encuentre presencia bacteriana, posterior a los tres meses del contacto con ella. No suele producir muerte o complicaciones, solamente en personas con un sistema inmunológico deprimido, niños y ancianos. No está recomendada la terapia con antibióticos ya que es autolimitada y solo se recomienda la hidratación para reponer los electrolitos perdidos por la diarrea y vómito. Mientras que la fiebre tifoidea, causada con mayor frecuencia por *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi y *Salmonella* Sendai (únicamente afectan al ser humano). Puede oscilar entre 3 y 60 días el periodo de incubación siendo generalmente de una semana y teniendo la característica de ser subclínico. Se caracteriza por su sintomatología: fiebre alta prolongada, cansancio, cefaleas, náuseas, dolor abdominal y estreñimiento o diarrea, algunos pacientes presentan erupciones cutáneas, los casos graves pueden complicarse seriamente y causar la muerte. El tratamiento recomendado son el uso de cefalosporinas y azitromicina (esporádicamente), antes se usaba las fluoroquinolonas pero existen regiones que presentan resistencia (Jurado, Arenas, Doblas, Torre, 2010).

### **1.7 Mecanismo de invasión de *Salmonella enterica***

Una vez que *Salmonella enterica* ingresa al organismo lleva a cabo una serie de cambios moleculares en el hospedero para lograr colonizar, sobrevivir y provocar la infección del mismo. El inoculo logra superar la barrera gástrica, se adhiere a las microvellosidades del intestino delgado (sitio anatómico de la infección) a través de receptores específicos (fimbrias) para lograr atravesar las mucosas y adherirse a linfocitos de las Placas de Peyer, a través de las células de Microfold o células M, células cuya función es muestrear la cara externa de la mucosa intestinal en busca de antígenos, internalizándolos por pinocitosis y transportándolos hacia los órganos linfoides en la submucosa (Figuroa y Verdugo, 2005).

*Salmonella* utiliza un mecanismo especializado denominado sistema de secreción tipo III (similar a una jeringa) para atravesar la membrana plasmática e inyectar proteínas al citoplasma de la célula hospedera, estas proteínas inyectadas tienen la capacidad de provocar un reacomodo (efecto ruffling) en la membrana, dando como resultado el englobamiento de la bacteria en forma de vacuola (SVC del inglés *Salmonella*-containing vacuole) fabricada por la misma célula. Esta vacuola es arrastrada al interior de la célula por filamentos de actina, en este momento el sistema de secreción tipo III inyecta proteínas para evadir los componentes lisosomales (estrés oxidativo, péptidos antimicrobianos y pH ácido lisosomal) producidos por la célula hospedera como respuesta inmune, de manera que resiste a las condiciones ambientales intracelulares para poder dividirse y propagarse (Cardona y Sánchez, 2003).

*Salmonella enterica* es la única especie que presenta dos sistemas de secreción tipo III (SST3), el cual está codificado por las islas de patogenicidad I y la isla de patogenicidad II. El SST3 codificado en SPI-1 funciona durante el contacto de la bacteria con la célula hospedera y transloca efectores a través de la membrana plasmática de la misma, el SST3 codificado por SPI-2 es expresado dentro del fagosoma y translocan proteínas a través de la membrana de la vacuola. Se ha demostrado que la expresión del SST3 codificado en SPI-1 es esencial para inducir la internalización bacteriana por células no fagocíticas, para inducir inflamación a nivel intestinal y cuadro diarreico; mientras que el codificado por SPI-2 es fundamental para la persistencia intracelular en macrófagos y para el establecimiento de infección sistémica, ambos sistemas actúan de forma coordinada por si solos no pueden llevar a cabo sus funciones (Figura 2). El SST3 media la transferencia de proteínas efectoras de virulencia bacteriana hacia las células del hospedador, las cuales una vez adentro del citoplasma de las células eucariotas, alteran funciones como la estructura del citoesqueleto, transducción de señales, expresión de citoquinas para promover la supervivencia y replicación bacteriana. El SST3 está compuesto por más de 20 proteínas estructurales que conforman una estructura

conocida como complejo de aguja que atraviesa la pared bacteriana desde la membrana interna a la externa y otra estructura denominada translocón responsable de formar un poro en la membrana de la célula eucariota para el ingreso de los factores de virulencia. Estos efectores poseen señales de secreción y sitios de unión a chaperonas específicas para asegurar la correcta conformación molecular y adecuado tráfico intracelular para el pasaje a través del complejo de aguja (Betancor y Yim, 2012) (Figura 3).

Los serotipos pertenecientes a *Salmonella* tifoidea son fagocitados por células dendríticas CD18+ (macrófagos intestinales) asociándose con escasa respuesta inflamatoria local, lo que podría explicar su mayor frecuencia de diseminación sistémica; mientras que los serotipos de *Salmonella* no tifoidea, inducen una respuesta inflamatoria localizada en la mucosa intestinal en individuos inmunocompetentes, provocando una afluencia masiva de leucocitos polimorfonucleares al lumen intestinal lo que explica el cuadro diarreico, proceso debido a la captación por las células M (Betancor y Yim, 2012).

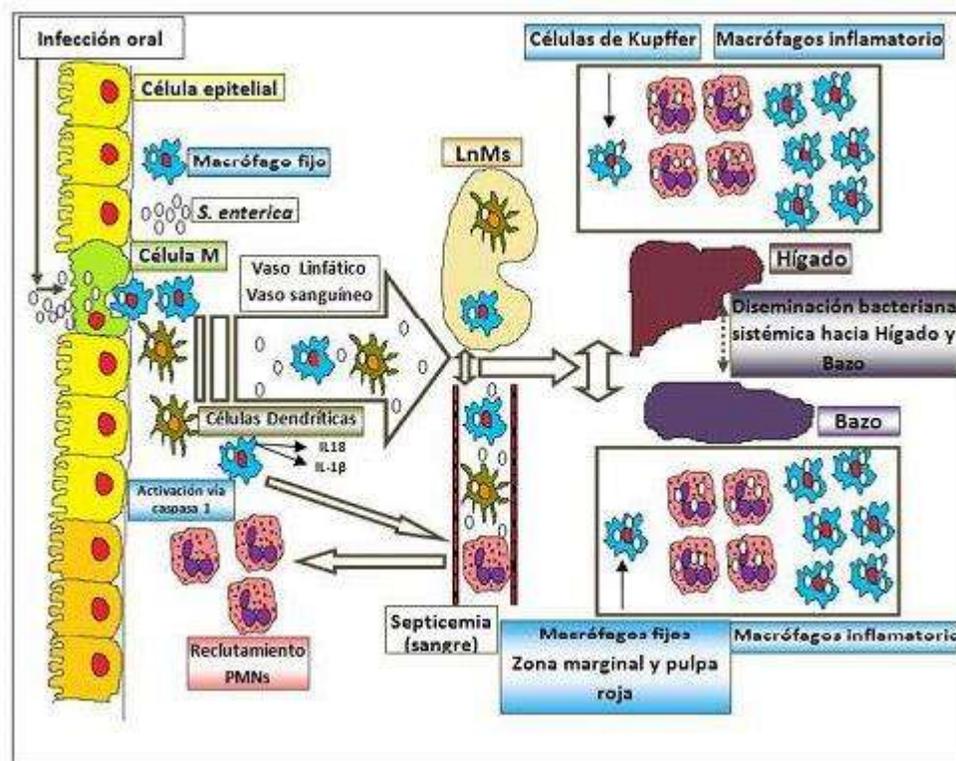
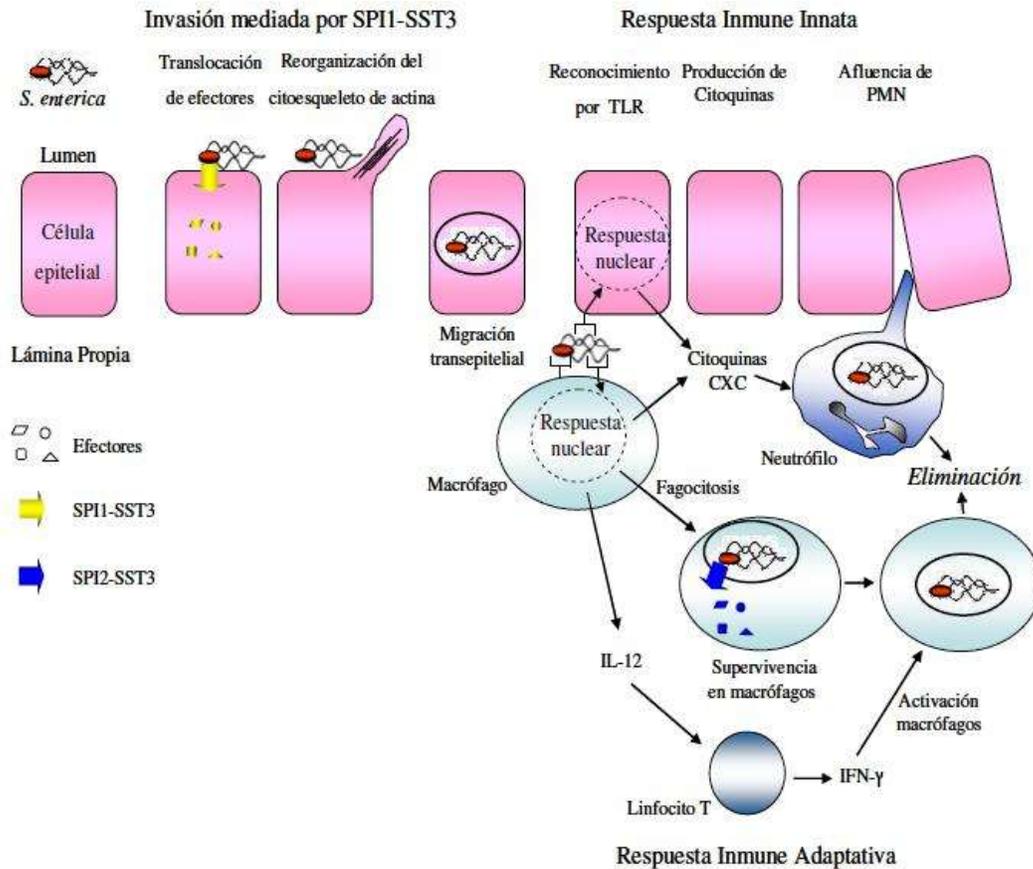


Figura 2. Mecanismos de invasión de *Salmonella enterica* (Silva y López, 2011).

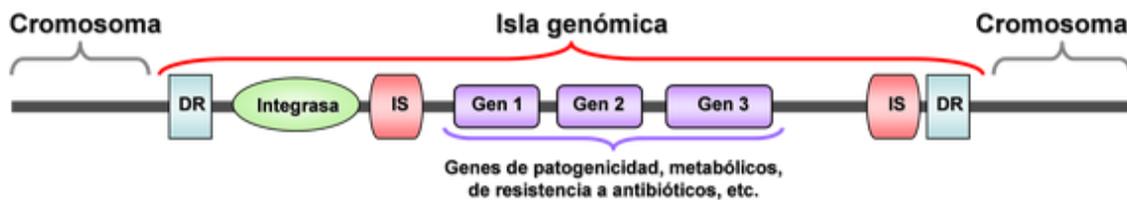


**Figura 3.** Inducción de la enfermedad intestinal causada por *Salmonella enterica* (Martínez, 2007).

### 1.8 Islas de patogenicidad

Las bacterias al estar en constante estrés, se encuentran sometidas a presión selectiva a causa de factores como: competencia con la microbiota normal, disponibilidad de nutrientes y la respuesta inmune del hospedero; provocando así la adquisición de nuevos genes (por transferencia horizontal de una bacteria a otra) o bloqueo de ciertos genes con el objetivo de mejorar su adaptación. Una isla genómica es el conjunto de genes en el genoma que traducen a alguna función, pero cuando esta función involucra su virulencia se les denomina islas de patogenicidad (SPI del inglés *Salmonella* pathogenicity islands), las cuales determinan estrategias diferenciales entre distintos serotipos modificando la epidemiología y patogénesis de las cepas. Caracterizar los genes asociados a la virulencia de *Salmonella* es importante para su patogenicidad, comprensión de los posibles mecanismos de transferencia y el desarrollo de un método de detección eficiente en el control de enfermedades epidémicas (Fernández *et al.*, 2004).

Los genes de virulencia aumentan la aptitud de los patógenos al fomentar la replicación, ya que proporcionan protección contra el hospedero y la supervivencia del patógeno en sitios específicos. Las islas de patogenicidad se encuentran en el cromosoma bacteriano o en plásmidos y llevan genes funcionales para la recombinación de ADN, como la integrasa, la transposasa o parte de un elemento de inserción. Se caracterizan por tener contenido de G+C diferente al resto del genoma y representa una región del ADN inestable que puede moverse desde un locus de ARNt a otro, o ser eliminado. La mayoría de las islas de patogenicidad presentan pseudogenes (genes genéticamente similares al gen funcional original pero que han perdido su capacidad de codificación de proteínas y frecuentemente contienen numerosas mutaciones) (Martínez, 2007) (Figura 4).



**Figura 4.** Composición estructural de una Isla de patogenicidad (Gonn, 2009).

A pesar de que en el género *Salmonella* se han identificado 21 islas de patogenicidad, las más estudiadas son cinco de ellas:

SPI-1 se encuentra localizada en el centisoma 63. Presenta tamaño de 35-40kb conteniendo 31 genes que codifican proteínas involucradas en la translocación de moléculas efectoras y sus chaperonas. Esta isla se encuentra relacionada con la invasión de células no fagocíticas mediante modificación del citoesqueleto de la célula (Figuerola y Verdugo, 2005).

SPI-2 está localizada en el centisoma 31, presenta un tamaño de 40 kb, se encuentra al lado del *vaI* (gen que codifica el ARNt<sup>val</sup>). Esta isla se encuentra dividida en dos segmentos; una porción pequeña de 14,5 kb con %G-C de 54% (segmento no relacionada con virulencia), esta porción pequeña codifica la tetrionato reductasa la cual interviene en la respiración anaeróbica; y una porción grande de 25,3 kb con %G-C de 43% la cual codifica para un SST3 que se activa cuando la bacteria está en el interior de la célula hospedadora, translocando proteínas efectoras a través de la membrana de la SCV. La SPI-2 está conformada por los genes: *ssaU*, *ssaT*, *ssaS*, *ssaR*, *ssaQ*, *ssaP*, *ssaO*, *ssaN*, *ssaV*, *ssaM*, *ssaL*, *ssaK*, *ssaJ*, *ssaI*, *ssaH*, *ssaG*, *sseG*, *sseF*, *sscB*, *sseE*, *sseD*, *sseC*, *sscA*, *sseB*, *sseA*, *ssaE*, *ssaD*, *ssaC*, *ssaB*, *ssrA* y *ssrB*. La primera región, presenta un grupo de genes *ttr* implicados en la respiración anaeróbica (reducción de tetrionato), además de diferentes pautas de lectura abierta (ORF) de función

desconocida, la segunda región presenta al menos cuatro operones diferentes, *ssa* (aparato del sistema de secreción), *sse* (proteínas del translocón, efectoras, chaperonas) *ssc* (chaperonas) y *ssr* (reguladores del sistema de secreción) (Martínez, 2007).

El gen *ssaQ*, se encuentra compuesto por dos proteínas: una proteína larga formada por 322 aminoácidos y una proteína corta formada por 106 aminoácidos. El gen *ssaQ* se encuentra en el cromosoma en una zona descrita como conservada de la SPI-2 y forma parte del SST3 (Silca, 2009). Actualmente se han realizado estudios de resistencia a antibióticos basados en el establecimiento de PV en diversas zonas geográficas en el mundo, por lo que el gen *ssaQ* se encuentra relacionado con resistencia a lincomicina, estreptomina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametazol, esto en compañía de otros genes de virulencia mostrando diversos patrones de resistencia y se ha observado que es uno de los genes que se encuentra en la mayoría de los aislados estudiados provenientes de muestras humanas como diversos alimentos (Osman y Maroufy 2013).

Estas dos primeras islas codifican para el sistema de secreción tipo 3 (SST3) y las denominadas proteínas efectoras de dicho sistema. Los sistemas de secreción son claves para el fenotipo invasivo y la persistencia. Las proteínas secretadas por la isla de patogenicidad II tienen un papel importante en la fusión fagosoma-lisosoma y en la protección de la SCV de enzimas de defensa fagocítica como el NADPH oxidasa y la sintetasa de óxido nítrico. Las cepas que son portadoras de mutaciones dentro de los genes SPI-2 muestran la importancia de cada uno de estos genes en las diferentes etapas de la infección para la supervivencia de la bacteria dentro del huésped (Cabañas y Huerta, 2014).

SPI-3 se encuentra en el centisoma 82, su tamaño es de 17 kb en el *locus selC* y tiene un porcentaje de G-C del 39.8-49.3 %. Esta isla presenta 30 genes distintos los cuales están implicados en la supervivencia intracelular en macrófagos y su crecimiento en condiciones limitadas de  $Mg^{2+}$  debido a que se encuentra codificado por el operón *mgtCB* (un sistema de afinidad por  $Mg^{2+}$ ) dicho operón está regulado por *pop/Q* que se ubica en una isleta intrafagosómica (Yean, Ling, Suriawati, Yuryev y Alam, 2010). Codifica un transportador de magnesio involucrado en la adaptación de *Salmonella*. En esta isla se encuentran los genes: *sugR*, *rhuM*, *rmbA*, *misL*, *fidL*, *marT*, *slsA*, *cigR*, *mgtB* y *mgtC*. Codifica proteínas MarT y MisL, que podrían participar en procesos de patogenicidad como la infección crónica y la especificidad del hospedador (Martínez, 2007). El gen *rmbA* se encuentra localizado en SPI-3, presenta 205 aminoácidos y es requerido para la colonización ya que tiene función de una hipotética proteína citoplasmática, se encuentra ubicado en una zona descrita como inestable (Martínez, 2007).

SPI-4 localizada en el centisoma 92, tiene un tamaño de 27kb. Presenta 18 genes entre los cuales se encuentra *spi4-F* que se cree que codifica un supuesto sistema de secreción de tipo

1 que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos. Esta isla de patogenicidad codifica una proteína de sustrato afín (SiiE) y un sistema de secreción tipo I responsable de su transporte. SiiE es una adhesina gigante no fimbrial involucrada en la adhesión de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Gerlach, Jäckel, Geymeier y Hansel, 2007).

SPI-5 se encuentra en el centisoma 20, presenta tamaño de 7.5 kb con un %G-C de 43.6. Es responsable de codificar proteínas efectoras involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal como SopB que además de estimular la secreción de cloro se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos, para su secreción utiliza el SST3 de la SPI-1 (Figuroa y Verdugo, 2005).

En la actualidad el avance biotecnológico nos ha llevado al desarrollo de técnicas moleculares para el estudio del genoma bacteriano, ya que varios serotipos muestran comportamiento diferente a antibióticos como lo son las sulfonamidas (*Salmonella* Enteritidis) estreptomina y tetraciclinas (*Salmonella* Typhimurium). De acuerdo con CDC identifica a ceftriaxona y ciprofloxacino como las resistencias de preocupación, sumado a esto han surgido cepas multiresistentes (Cruz, 2017).

### **1.9 Tipificación genético molecular de *Salmonella***

Dado que los métodos de identificación bioquímica y serológicos carecen de una diferenciación más específica debido a que no todas las cepas de una misma especie muestran los mismos patrones en ensayos repetidos, los métodos moleculares han surgido como un complemento a la identificación de un agente patógeno. Dado que *Salmonella* es un patógeno de importancia mundial, al provocar enfermedades de transmisión alimentaria, se ha implementado su estudio epidemiológico empleando diversos métodos de tipificación molecular con la finalidad de obtener mejoras en la información de brotes, programas de prevención y control. La tipificación es una discriminación genética entre aislados de *Salmonella*, identificando genes o secuencias de ADN polimórficas para determinar variabilidad y delinear relaciones (Granda, 2015).

Las técnicas de PCR se usan para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente y se pueden combinar con otros métodos moleculares como son la restricción enzimática, hibridación con sondas específicas o la secuencia de ácidos nucleicos. La técnica de electroforesis en gel en campos pulsados (PFGE) se emplea para diferenciar grupos de cepas relacionadas clonalmente, el cual consiste en digerir el genoma de la bacteria con una enzima que produzca un fragmento grande y uno pequeño de ADN (mayores a 20 kb), separando dichos fragmentos bajo un campo eléctrico pulsado, lo que hace que el ADN tome diferentes orientaciones alternas durante la migración; Sin embargo, es muy poco discriminatorio para

el caso de serotipos altamente clonales como *Salmonella* Enteritidis. Existe el análisis VNTR Multi-Locus (MLVA) el cual es un método de tipificación molecular para aislados microbianos, se basa en el número variable de repeticiones en tándem (VNTR). El VNTR típicamente exhibe una gran variedad de número de repeticiones incluso entre cepas bacterianas altamente relacionadas, para un conjunto seleccionado de repeticiones en tándem, el análisis del número de copias revela información sobre las relaciones a nivel microevolutivo, este método de tipificación muestra mayor poder discriminatorio que PFGE, aunque algunas cepas que muestran el mismo tipado por MLVA se resuelven por PFGE. Electroforesis multilocus de enzimas se utiliza para caracterizar diferentes cepas bacterianas, los componentes del extracto celular se separan por electroforesis. Las variaciones en el genoma de la bacteria pueden reflejarse en alteraciones en la migración de alguna o más enzimas (que representan varios loci o genes) obteniendo electroferotipos o patrones de migración distinguiendo así una cepa de otra. El análisis de plásmidos o las huellas genéticas de las bacterias a partir de hibridación de fragmentos de ADN con sondas o genes repetidos en el genoma marcados radioactivamente son también metodologías usadas (Alvarado, 2007; Granda, 2015).

### **1.9.1 Virulotipificación**

La virulotipificación (Virulotyping) es un método de genotipificación en el que el ADN bacteriano que se va a detectar o caracterizar, contiene genes de virulencia. Esto requiere un conocimiento previo de los genes que determinan la virulencia de un patógeno dado, esto es un enfoque genómico desarrollado recientemente para la epidemiología molecular bacteriana. Esta caracterización se basa en la presencia o ausencia de ciertos genes encontrados en las diversas SPI por lo que se han realizado estudios a partir de diferentes serotipos de *Salmonella enterica* detectando 10 posibles factores de virulencia (*avrA*, *ssaQ*, *mgtC*, *siiD*, *sopB*, *gipA*, *sodC1*, *sopE1*, *spvC* y *bcfC*) mediante PCR y con base a las posibles combinaciones establecer perfiles de virulencia (Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella*, Instituto Federal de Evaluación de Riesgos, 2010). Por lo que se ha utilizado para la detección y el perfilado en bacterias patógenas, aumentando la comprensión del posible riesgo de infecciones humanas y animales, lo cual lo hace una herramienta valiosa para la caracterización de aislamientos de *Salmonella* (Liaquat et al., 2018).

### **1.10 Resistencia a antibióticos**

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen la proliferación de otros gérmenes. Sin embargo, el uso común a menudo ha ampliado el término de antibiótico de modo que incluya antibacterianos sintéticos como las sulfonamidas, y las quinolonas que no son sintetizados por microbios (Patiño, 2003). La resistencia bacteriana se define como la

capacidad de un microorganismo para desarrollar mecanismos de defensa contra la acción de los antibióticos, esta puede formar parte de la arquitectura normal de la bacteria o adquirida debido al intercambio de ADN, por alteraciones que sufre el microorganismo resultado de mutaciones cromosómicas o por mecanismo de transferencia de genes. Se han identificado varios elementos que participan en la transferencia de genes de resistencia, de los cuales los más conocidos son transposones, bacteriófagos, plásmidos, integrones y casetes genéticos de resistencia. Se sabe que la resistencia ejercida por las cepas de *Salmonella* está ligada a 3 mecanismos, uno de estos mecanismos es la producción de enzimas que inactivan los antibióticos como las betalactamasas, aminoglucósidos fosfotransferasas, aminoglucósidos acetiltransferasas y adeniltransferasas, los cuales funcionan mediante la fosforilación, acetilación y adenilación de aminoglucósidos, así como también la producción de la enzima cloranfenicol O-acetil-transferasa, o la producción de topoisomerasas IV inhibiendo a las quinolonas, alterando el antimicrobiano de tal forma que ya no tiene un adecuado modo de acción. El segundo mecanismo son las modificaciones bacterianas que impide la llegada del antibiótico al punto diana, también conocido como modificación del receptor, como es el caso de las sulfonamidas y del Trimetropim. El tercer mecanismo de resistencia es la bomba de flujo que bombea activamente al antimicrobiano, de manera que las sustancias quedan confinadas a la penetración a través de proteínas transmembrana con función de porinas, disminuyendo la expresión de dichas porinas que pueden disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico de la bacteria, como es el caso de las tetraciclinas, quinolonas y cloranfenicol (Cruz 2017).

El uso de antibióticos en las granjas es una de las causas por las que algunas bacterias se vuelven resistentes a estos medicamentos. Al darles antibióticos a los animales se muere la mayoría de las bacterias, pero las resistentes pueden sobrevivir y multiplicarse. Estas bacterias también pueden pasar al medio ambiente y propagarse en las frutas, verduras u otros productos agrícolas que se rieguen con agua contaminada. Las personas pueden quedar expuestas a las bacterias resistentes al entrar en contacto con ellos. Esto es importante, ya que las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos que se contraen por los alimentos, como *Salmonella*, pueden provocar resultados para la salud más graves que las infecciones que no son resistentes a los antibióticos (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas, División de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, el Agua y el Medioambiente, 2015).

Las fluoroquinolonas se consideran ampliamente como el antimicrobiano de elección para el tratamiento de la salmonelosis en los adultos, mientras que la tercera generación de cefalosporinas se utiliza para tratar niños. Cuando las cefalosporinas fueron usadas por primera vez en terapia humana se observaron efectos muy pequeños en la ocurrencia de

resistencia en las infecciones de *Salmonella enterica* transmitida por alimentos. En los países donde las fluoroquinolonas posteriormente se autorizaron para uso en los animales destinados al consumo humano, aumentó rápidamente la aparición de *Salmonella* resistente a la fluoroquinolona en los animales y los alimentos, y luego posteriormente en las infecciones humanas. Las cepas multiresistentes de *Salmonella* ahora se encuentran con frecuencia. La ocurrencia de multiresistencia ha aumentado considerablemente en años recientes debido a la propagación mundial de la cepa multiresistente *Salmonella* Typhimurium DT104 (Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los alimentos, 2005).

Los mecanismos bacterianos implicados tanto en la resistencia antimicrobiana como en la virulencia son en la actualidad objeto de numerosos estudios en el ámbito de la microbiología infecciosa. Pero es difícil localizar trabajos en los que se estudien conjuntamente ambos aspectos, que son esenciales para entender el comportamiento de los patógenos bacterianos y diseñar adecuadas estrategias terapéuticas para combatirlos de una manera eficaz.

Aunque la adquisición de resistencia a los antimicrobianos no es específicamente un factor de virulencia, ambos aspectos guardan entre sí una estrecha relación, por ejemplo, los factores de resistencia ofrecen al microorganismo la capacidad de continuar replicándose en un individuo tratado con antimicrobianos, desplazando al resto de microorganismos sensibles y expresando así su carga genética de patogenicidad. Los fenómenos de virulencia y resistencia presentan bastantes características en común, y entre las más importantes se encuentran los mecanismos de transferencia horizontal que pueden existir entre diferentes especies. Los plásmidos son posiblemente los principales vehículos de transmisión de los elementos genéticos que codifican los factores de virulencia y resistencia. Tanto la virulencia como la resistencia son mecanismos adaptativos similares que cumplen su función bajo condiciones de estrés, tales como el proceso de infección o colonización y la presión antibiótica, respectivamente. A menudo la resistencia antimicrobiana se encuentra también asociada a la infección y por tanto también vinculada a virulencia, como en el caso de microorganismos productores de biofilm o en infecciones intracelulares. Otras características que presentan en común virulencia y resistencia son la implicación directa de bombas de expulsión, porinas, alteraciones de la pared celular o los sistemas de dos componentes, sensor-receptor, que en función de las condiciones del ambiente pueden activar o reprimir la expresión de diferentes genes, entre ellos genes implicados en resistencia y virulencia (Beceiro, Tomás y Bou, 2012).

### 1.11 Antecedentes del grupo de trabajo

En estudios realizados previamente por el equipo de trabajo, se evaluó la resistencia a antimicrobianos e identificación de integrones clase 1 en 127 cepas de *Salmonella enterica*, en las cuales se encontró que el 39% de las cepas analizadas fueron resistentes a Carbenicilina, un 27% a Cloranfenicol, un 26% a Ampicilina y un 25% a Trimetoprim/sulfametoxazol; se encontró que el 30% del total de los aislados analizados presentaron multirresistencia a los antibióticos probados. Las cepas pertenecientes a los siguientes serotipos fueron las que presentaron mayor multiresistencia: Typhimurium con un 69%, seguido por Anatum con un 53% y Panama con un 50%. El integrón clase 1 se encontró en un 65% de 119 cepas estudiadas. Encontrándose con mayor frecuencia en serotipos tales como: Derby, Vejle, Anatum, Tiphymurium, Give, Panama y c1. Haciendo correlación entre ambos análisis se encontró que solo el 71% de las cepas multirresistentes mostraron la presencia del integrón clase 1 (Inocencio, Tesis de licenciatura).

En otro estudio, se realizó la búsqueda de genes *sul*, *tet* e integrones clase 2 en 120 cepas. Se encontró el gen *sul* en 34 cepas, el gen *tet* en 19 cepas; al realizar una relación fenotípica a SXT y genes *sul* se encontró en 21 cepas; para el caso del integrón clase 2, de las 120 cepas solo 2 presentaron el gen. Entre las cepas resistentes a SXT y que presentaban genes *sul*, 18 presentaron el integrón de clase 1, y dentro de estos, solamente en 2 se detectaron el integrón de clase 1 y 2 al mismo tiempo. Cabe resaltar que en 8 de las cepas resistentes a SXT, no se detectaron genes *sul* pero sí el integrón de clase 1. Los serotipos más frecuentes con presencia simultánea de integrones, genes *sul* y resistentes a SXT fueron: Typhimurium (28%), seguido de Anatum (17%), serogrupo B (11%) y Sinstorf (11%) (Hernández 2015, Tesis de licenciatura).

En el estudio denominado “Elementos repetitivos para el análisis de diversidad genética de cepas de *Salmonella enterica*”, se analizaron 102 cepas, donde los patrones de agrupamiento generados mostraron 19, 20 y 22 genotipos para los ensayos REP, BOX y ERIC, respectivamente. La combinación de los resultados de los tres tipos de marcadores mostró 44 genotipos en el estado de Michoacán (Vázquez 2011, Tesis de maestría).

En otro estudio, en el cual se caracterizaron 72 cepas de *Salmonella enterica* por Multi Locus Sequence Typing (MLST), el análisis de secuencias para cada uno de los siete *loci* analizados por MLST arrojó diferentes números de alelos, encontrando mayor diversidad de alelos para los *loci*: *hisD* (20), *purE* (19) y *dnaN* (18). Se encontraron 20 Secuencias tipo (ST) diferentes para todo el conjunto de 72 cepas analizadas. La mayoría de éstas ST se encuentran registradas en la base de datos, por lo que se realizó la comparación de las ST que se encontraron, con las registradas. Se encontró que la ST predominante era ST-40 con un total de 17 cepas distribuidas entre los Serogrupos B y E1, así como en cepas serotipificadas como

Anatum y Agona. La mayoría de las cepas dentro de la ST-40 fueron obtenidos de productos cárnicos y sólo una cepa fue obtenida de queso fresco, la importancia de la ST-40 se debe a que puede ocasionar brotes, lo cual resalta la importancia de la caracterización por distribución geográfica de esta ST en el estado de Michoacán (Inocencio 2013, Tesis de maestría).

En el estudio en el cual se realizó el aislamiento y caracterización de cepas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* se determinaron 34 serotipos distintos en varios tipos de alimentos. Encontrando 27 serotipos distintos y 7 serogrupos de *S. enterica* contaminando carne de res cruda, chorizo, quesos, ostiones y algunos productos cárnicos cocidos en el estado de Michoacán durante el periodo 2008 – 2009. Se encontró que los serotipos Typhimurium, Anatum y Agona fueron los serotipos mayoritarios en este tipo de alimentos para el estado. La mayoría de las cepas de *Salmonella enterica* se pudieron serotipificar. Sólo 20 cepas se definieron a nivel de serogrupo, debido a que no expresaron una o ninguna de las dos fases flagelares. No se encontró una relación entre el serotipo y el tipo de muestra o jurisdicción de donde se obtuvieron las cepas aisladas. Los patrones de amplificación RAPD generaron un mínimo de 4 y un máximo de 12 bandas, dependiendo del oligonucleótido utilizado y el tipo de cepa analizada, para el oligonucleótido 1252 se generaron bandas entre 400 pb y 3.83 kb de tamaño, proporcionando un total de 14 bandas para el análisis de agrupamiento. El oligonucleótido 1254 generó bandas entre los 300 pb y 3.52 kb, con un total de 16 bandas. Por último, en el caso del oligonucleótido 1290 se generaron bandas entre los 490 pb y los 2.074 kb de tamaño, con un total de 12 bandas (Regalado 2011, Tesis de maestría).

En el estudio “Caracterización metabólica y respuesta a estrés de cepas de *Salmonella enterica*” se utilizaron 16 cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium. Las cepas de *S. Typhimurium* analizadas en este estudio, poseen diferente capacidad para recuperarse a la exposición de condiciones de preservación de alimentos (refrigeración y reducción de  $a_w$ ). En el cual se encontró que existía una diferencia en las velocidades de crecimiento entre las diferentes cepas, dependiendo de las condiciones de estrés a las cuales se sometieron. Bajo estrés, la mayoría de las cepas de estudio formaron células filamentosas, siendo estas más visibles cuando se someten a refrigeración y reducción de  $a_w$ . Las cepas de estudio mostraron una gran diversidad metabólica. No se encontró correlación entre el uso de los metabolitos analizados con la velocidad de crecimiento de las cepas expuestas a estrés. Se encontró correlación directa entre el crecimiento sin estrés y el metabolismo en presencia de sustratos como:  $\beta$ -metil-D-glucósido, NaCl al 1%, ácido-D-glucorónico y ácido propiónico. Así como una correlación inversa con  $\beta$ -metil-D-glucósido bajo la condición de 6°C (Kuk, 2016, Tesis de maestría).

En el estudio denominado “Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán”, se analizaron 90 cepas de *Salmonella enterica* con la finalidad de encontrar patrones de presencia/ausencia de 6 genes localizados en diferentes SPI: SPI1 (*sopE*), SPI2 (*ssaQ*), SPI3 (*rmbA*) y SPI5 (*sopB*). Encontrando 8 Perfiles de Virulencia (PV) con los cuales se realizó una asociación con Secuencia Tipo (ST). Se observó que el PV1 está distribuido en la mayoría de las ST; dentro de las ST con mayor diversidad de PV, se encontró a la ST40 y las STND, encontrándose 3 PV diferentes en cada una de éstas ST. Dentro de las ST que presentaron 2 PV diferentes se encontró a la ST64, ST213 y ST13 (Maldonado 2015, Tesis de maestría).

En el estudio denominado “Análisis de la resistencia a estrés y virulencia de los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica*”, en el cual se evaluó el remplazo del genotipo ST19 por el ST213. Se observó una gran variabilidad en la supervivencia entre las cepas ST19 y ST213 estudiadas en condiciones de estrés que simulan las condiciones empleadas en la preservación de los alimentos. Se encontró que en presencia de ciertos antibióticos se potenciaba la formación de biofilm de cepas del genotipo ST213. Además, se evaluó la interacción patógeno-hospedero de las cepas ST213 en un modelo experimental *in vitro* e *in vivo* observando mayor internalización por parte de las cepas del genotipo ST213, así como una mayor secreción de citocinas proinflamatorias por las células Caco-2, con relación al genotipo ST19. Cabe resaltar que tanto en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, las cepas ST213 fueron capaces de infectar al hospedero, lo cual es relevante, ya que estas cepas fueron aisladas de alimentos, por lo que además tienen la capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés ambiental (Gómez 2019, Tesis de doctorado).

Cabe señalar que todos estos ensayos fueron realizados en las cepas de estudio de este proyecto las cuales provienen de diversos alimentos como carne, lácteos y embutidos.

## 2 JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, *Salmonella enterica* se encuentra entre los primeros cuatro microorganismos responsables de intoxicación alimentaria afectando la salud del hospedero, lo cual provoca impacto en el sector salud y por lo tanto en la economía de los países afectados. Debido a la incidencia con la que se ha encontrado en los últimos años en alimentos en el estado de Michoacán, se han realizado trabajos de epidemiología molecular para realizar una caracterización más específica empleando ciertos genes localizados en el ADN bacteriano, ya que estos trabajos aportan un complemento mayor de información a las técnicas de identificación habitual como lo son las pruebas bioquímicas y la serotipificación. La virulogenotipificación tiene su importancia basada en conocer las características patógenas de un microorganismo, por la presencia o ausencia de genes de virulencia, con esta información se pueden construir dendrogramas para hacer relación entre una cepa y otro encontrado en iguales o distintas condiciones geográficas, nutricionales o ambientales. Esta información en conjunto con estudios de genes de resistencia a antibióticos y genes asociados a estrés, puede obtenerse un panorama más amplio que permite establecer acciones de trabajo eficaces ante la presencia de un brote. Así como también permite dar un seguimiento de ganancia o pérdida de ciertos genes independientemente del serotipo. Motivos por los cuales se realizó el estudio de presencia o ausencia de genes de virulencia *ssaQ*, *rmbA* y *spi4-F* en 134 cepas provenientes de distintos alimentos del estado de Michoacán y conocer el potencial patogénico de estas cepas.

### **3 HIPÓTESIS**

Los perfiles de virulencia en *Salmonella enterica* están relacionados con el municipio de procedencia del alimento, el serotipo y la resistencia a antibióticos.

### **4 OBJETIVOS**

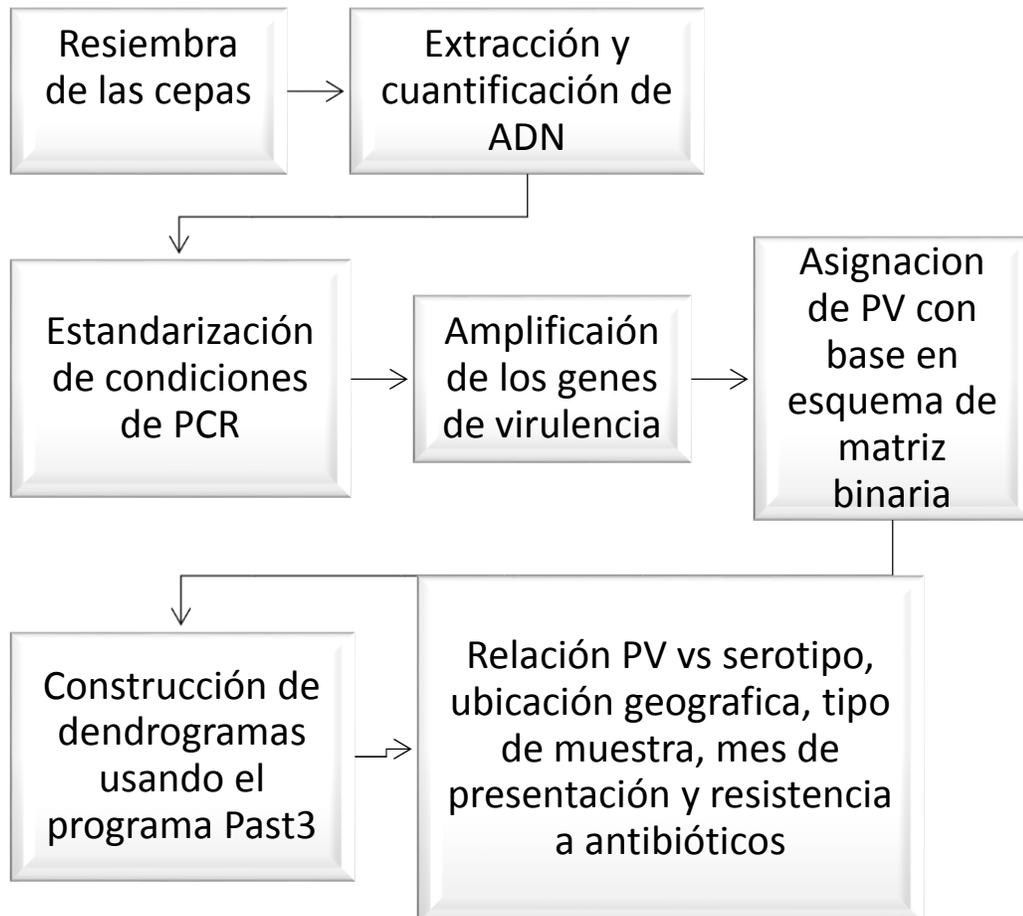
#### **4.7 Objetivo general:**

Caracterizar molecularmente y determinar la relación entre el perfil de virulencia con la procedencia geográfica y la resistencia a antibióticos de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos de Michoacán.

#### **4.8 Objetivos específicos:**

- Asignar perfiles de virulencia a las cepas de estudio.
- Correlacionar los perfiles de virulencia con tipo de muestra, la procedencia geográfica de aislamiento de las cepas, serotipo, fecha de obtención y la sensibilidad a los antibióticos.

## 5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas bacterianas analizadas en este estudio

En el presente trabajo se analizaron 134 cepas de *Salmonella enterica* provenientes de productos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán, las cuales fueron aisladas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán durante 2008 al 2011. En el anexo I se presenta la información correspondiente al número de cepa, tipo de muestra, municipio de procedencia, fecha de aislamiento y serotipo. Se utilizaron como controles las cepas *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium ATCC (14028) y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium SAL004.

De las 134 cepas de *Salmonella enterica* analizadas en este estudio, se encontraron 39 serotipos diferentes, de los cuales el serotipo que presenta mayor frecuencia es Derby con un 11% (15 cepas), Panama con 8% (11 cepas) y Give con un 6% (8 cepas), encontrándose el resto de los serotipos en un intervalo de 1-5% (1-7 cepas) (Fig. 5).

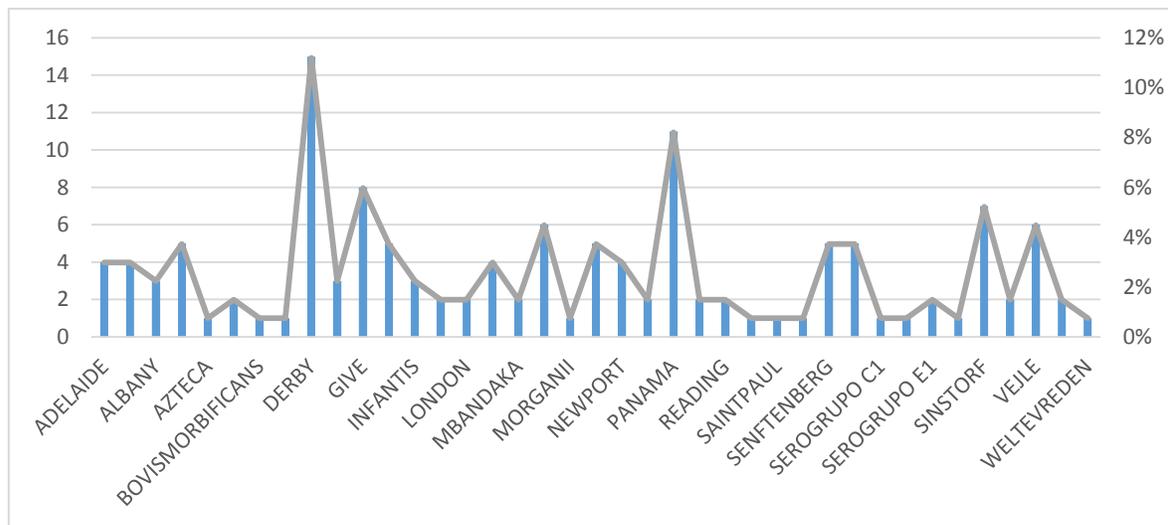
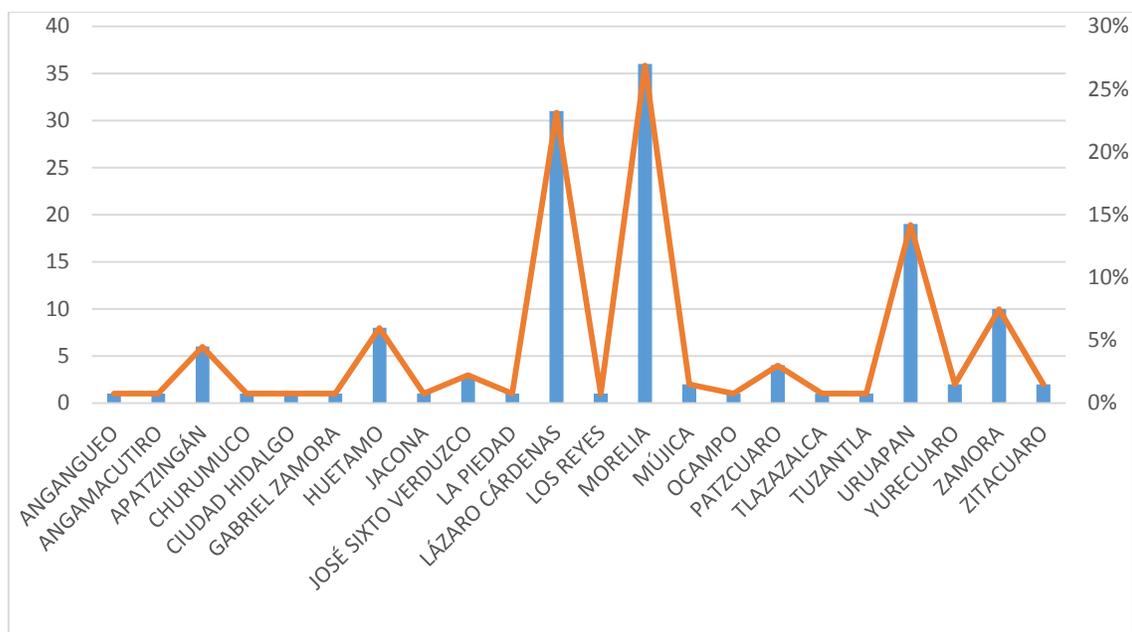


Figura 5. Relación cantidad-porcentaje de serotipos analizados.

Las 134 cepas provienen de 22 municipios del estado de Michoacán, de estos el que presentó mayor número de cepas fue el municipio de Morelia con un 27% (36 cepas), posteriormente Lázaro Cárdenas con un 23% (31 cepas), seguido por Uruapan con un 14% (19 cepas), encontrándose el resto de los municipios en un intervalo de 1-7% (1-10 cepas) (Fig. 6).



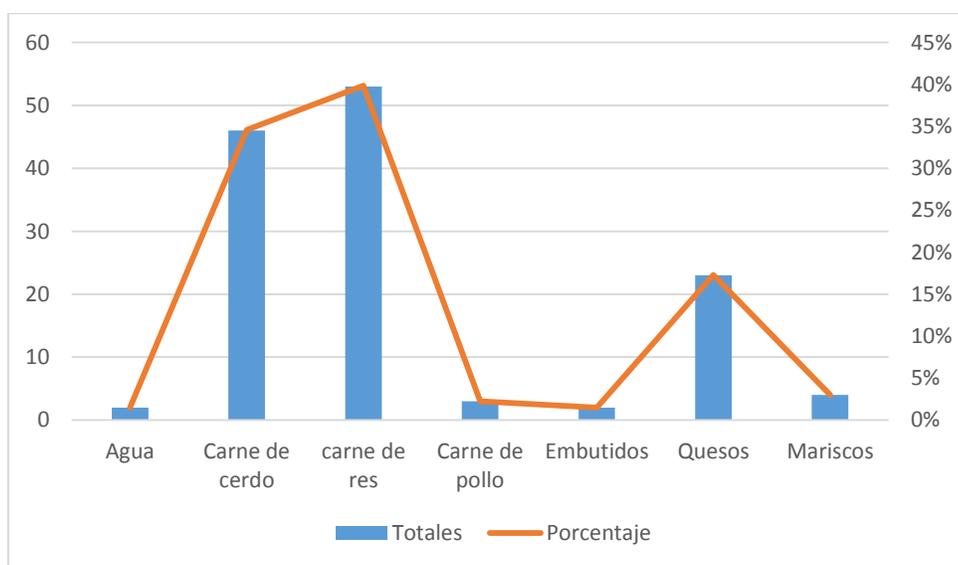
**Figura 6.** Relación cantidad-porcentaje por municipio analizado.

De los tipos de muestra de donde fueron aisladas las 134 cepas de *Salmonella enterica* para este estudio, provinieron de agua, carne de cerdo, carne de res, embutidos, quesos y mariscos; siendo carne de res el que presento mayor porcentaje 40% (53 cepas), carne de cerdo con un 35% (47 cepas) y posteriormente quesos con 17% (23 cepas). Encontrándose agua, carne de pollo, mariscos y embutidos en un rango de porcentaje de 2-3% (2-4 cepas).

**Tabla 3.** Relación cantidad-porcentaje respecto al serotipo vs tipo de muestra.

Serotipo	Muestra							Total	Porcentaje
	Agua	Carne de	Carne de	Carne de	Embutidos	Quesos	Mariscos		
<b>Adelaide</b>	0	1	3	0	0	0	0	4	3%
<b>Agona</b>	0	3	1	0	0	0	0	4	3%
<b>Albany</b>	0	1	1	1	0	0	0	3	2%
<b>Anatum</b>	0	2	2	0	0	1	0	5	4%
<b>Azteca</b>	0	0	1	0	0	0	0	1	1%
<b>Bareilly</b>	2	0	0	0	0	0	0	2	1%
<b>Bovismorbificans</b>	0	0	0	0	0	1	0	1	1%
<b>Braenderup</b>	0	0	0	0	0	1	0	1	1%
<b>Derby</b>	0	5	8	0	1	1	0	15	11%
<b>Enteritidis</b>	0	0	2	1	0	0	0	3	2%
<b>Give</b>	0	2	3	0	0	3	0	8	6%
<b>Havana</b>	0	2	1	0	0	0	2	5	4%
<b>Infantis</b>	0	1	2	0	0	0	0	3	2%
<b>Lockleaze</b>	0	1	1	0	0	0	0	2	1%

London	0	1	1	0	0	0	0	2	1%
Muenchen	0	1	2	0	0	1	0	4	3%
Mbandaka	0	0	0	0	0	1	1	2	1%
Montevideo	0	1	4	0	0	1	0	6	4%
Morganii	0	1	0	0	0	0	0	1	1%
Muenster	0	2	2	0	0	1	0	5	4%
Newport	0	1	2	0	0	1	0	4	3%
Oranienburg	0	1	1	0	0	0	0	2	1%
Panama	0	6	3	0	1	1	0	11	8%
Poona	0	0	0	0	0	2	0	2	1%
Reading	0	0	0	0	0	2	0	2	1%
Rissen	0	1	0	0	0	0	0	1	1%
Saintpaul	0	0	1	0	0	0	0	1	1%
Sandiego	0	1	0	0	0	0	0	1	1%
Snftenberg	0	1	3	0	0	1	0	5	4%
Serogrupo B	0	3	2	0	0	0	0	5	4%
Serogrupo C1	0	0	0	0	0	1	0	1	1%
Serogrupo D	0	0	1	0	0	0	0	1	1%
Serogrupo E1	0	0	1	0	0	1	0	2	1%
Serogrupo E4	0	0	0	0	0	1	0	1	1%
Sinstorf	0	2	4	1	0	0	0	7	5%
Typhimurium	0	1	1	0	0	0	0	2	1%
Vejle	0	4	0	0	0	1	1	6	4%
Vismorbifica	0	1	0	0	0	1	0	2	1%
Weltevreden	0	1	0	0	0	0	0	1	1%
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>47</b>	<b>53</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>23</b>	<b>4</b>	<b>134</b>	<b>100%</b>



**Figura 7.** Relación cantidad-porcentaje de cada tipo de muestra analizada.

## 6.2 Extracción de ADN

La extracción de ácido desoxirribonucleico se realizó por el método de fenol-cloroformo; para llevar a cabo dicha extracción se requiere un crecimiento bacteriano por 24 h a 37°C en agar LB. Transcurrido las 24 h se toman dos asadas de las colonias y se coloca en 600 µL de buffer (Tris HCl pH 8.0 0.1 M, SDS 2%, NaCl 0.1 M EDTA 0.05 M), posteriormente se agita vigorosamente por 5 min y se centrifuga con un pulso, se colocan 600 µL de fenol-cloroformo a cada muestra y se agita vigorosamente por 10 min, se centrifuga durante 10 min a 1118 x g, se toman 400-600 µL de la fase sobrenadante y se colocan en un tubo limpio, se agregan 600 µL de isopropanol para precipitar el ADN y se centrifuga por 10 min a 1118 x g, posteriormente se realizan 2 lavados a la pastilla formada con 200 µL de etanol. Se deja secar la pastilla a temperatura ambiente y se re-suspende con 40 µL de agua desionizada. Posteriormente se agrega 1 µL de RNasa por cada 10 µL de ADN, se incuba por 35 min a 37°C y se agregan 20 µL de isopropanol. El ADN se recupera centrifugando por 10 min a 1118 x g. La pastilla obtenida se lavó dos veces con 20 µL de etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en 25 µL de agua desionizada. La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador CHEMI-DOC Molecular viewer (Bio-Rad, USA). La cuantificación y verificación de pureza del ADN genómico se realizó en un nanodrop marca Implen modelo NanoPhotometer.

## 6.3 Amplificación por PCR de los genes de virulencia

Se usó el ADN de las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 como control positivo de amplificación para el gen *rmbA* y el gen *spi4-F*, y la cepa SAL004 para el gen *ssaQ* (Maldonado, 2015. Tesis de maestría). Las reacciones se llevaron a cabo usando buffer 1.5mM (Tris-HCl pH 8.2), Cl<sub>2</sub>Mg 1mM, desoxirribonucleotidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 2.0 mM, oligo R y oligo F a concentración de 2.0 mM, 750 nanogramos de ADN y 0.75 U de Taq polimerasa (Invitrogen, USA) en un volumen de 15 µl por reacción.

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Gen	Clave	Secuencia del oligonucleótido 5' → 3'	Pares de Bases	Referencia
<b>ssaQ</b>	SPI2-F	GAATAGCGAATGAAGAGCGTCC	455	Huehn et al., 2010
	SPI2-R	CATCGTGTATCCTCTGTCAGC		
<b>rmbA</b>	SPI3-F	AGCCTTCACAAATTGTCCATTG	454	Zou et al., 2011
	SPI3-R	TCCGTATAGTTAAGCGTTCGTC		
<b>spi4-F</b>	SPI4-F	GTATCATAACCGACACCATTGC	711	Khoo et al., 2009
	SPI4-R	CTGCCGTACCGACTAAAGC		

**Tabla 5.** Condiciones para las ampliaciones de PCR de acuerdo al gen.

<b>GEN</b>	<b>Desnaturalización inicial (1 ciclo)</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento (30 ciclos)</b>	<b>Extensión</b>	<b>Extensión final (1 ciclo)</b>
<b>ssaQ</b>	95 °C/1 min	95°C/30 seg	63°C/30 seg	72°C/30 seg	72°C/4 min
<b>rmbA</b>	94 °C/1 min	94°C/30 seg	58°C/30 seg	72°C/30 seg	72°C/5 min
<b>spi4-F</b>	94°C/5 min	94°C/1 min	56°C/1 min	72°C/1 min	72°C/5min

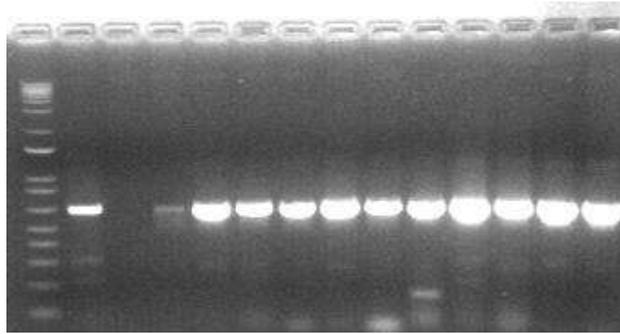
#### **6.4 Construcción de dendrogramas de similitud**

Para realizar los dendrogramas de similitud en cada uno de los análisis de este trabajo se utilizó el programa Past3, empleando el índice de agrupamiento de Jaccard para matrices binarias.

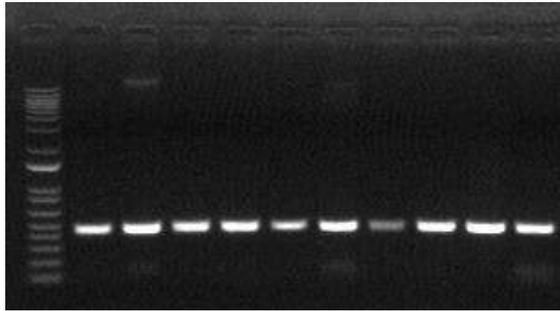
## 7 RESULTADOS

### 7.1 Amplificación por PCR de los genes de estudio en las cepas de referencia y en las cepas de estudio

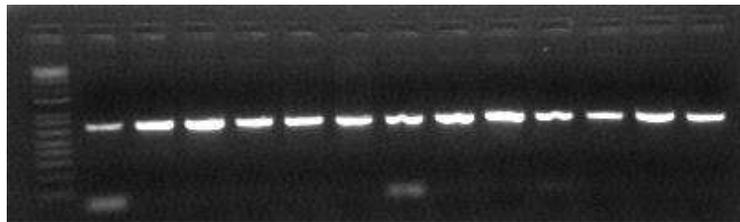
Se amplificaron tres genes de virulencia para los cuales se tomó como referencia la cepa *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028 (Fig. 10 y Fig. 11) y la cepa *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium SAL004 (Fig. 9).



**Figura 8.** Amplificación gen *ssaQ*. Gel de agarosa al 0.8% que muestra la amplificación del gen *ssaQ* de las cepas 76, carril libre, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 42, 46, 47 de *Salmonella enterica*.



**Figura 9.** Amplificación de gen *rmbA*. Gel de agarosa 1.5% que muestra la amplificación del gen *rmbA* de las cepas 120,1,3,6,7,8,9,11,12,14 de *Salmonella enterica*.



**Figura 10.** Amplificación de gen *spi4-F*. Gel de agarosa 1.5% que muestra la amplificación del gen *rmbA* de las cepas 14028, 27,30, 31, 33 34,35,36,37, 38, 42, 46,47 de *Salmonella enterica*

En la amplificación de genes mediante PCR punto final se obtuvieron 125 cepas positivas para los tres genes y solo 8 cepas las cuales se diferenciaron por presentar uno o dos genes de virulencia (Tabla 8).

**Tabla 6.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR punto final (1: presencia del gen, 0: ausencia del gen).

Cepa	Gen <i>ssaQ</i>	Gen <i>rmbA</i>	Gen <i>spi4-f</i>
14	1	1	0
134	1	1	0
136	0	1	1
152	0	1	1
163	1	1	0
221	1	1	1
222	1	0	0
235	1	0	1

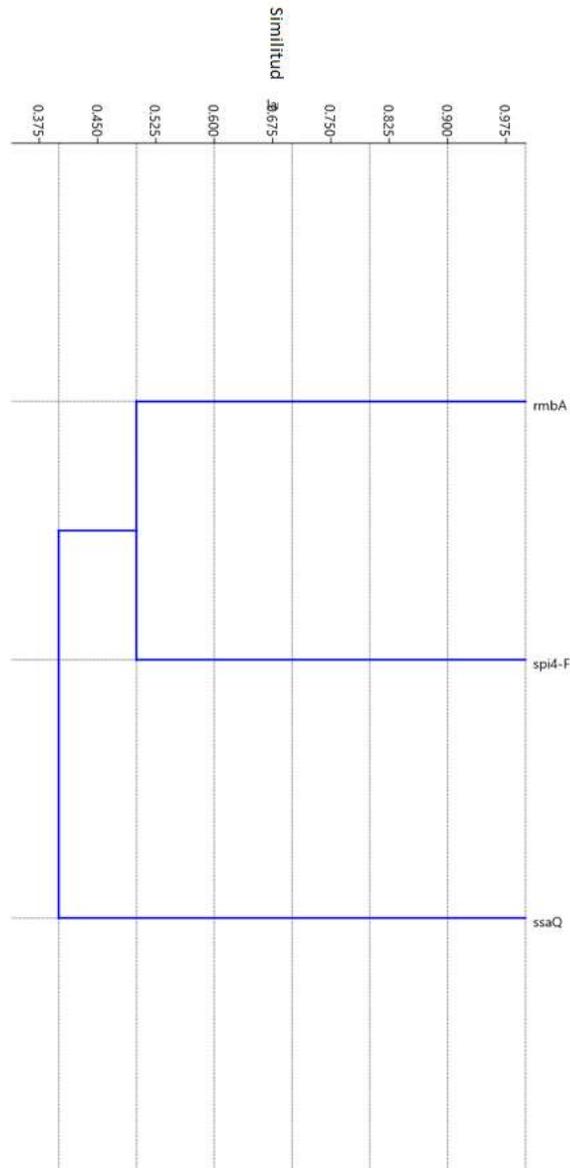
Se asignaron perfiles de virulencia (PV) de acuerdo a las combinaciones obtenidas de presencia o ausencia de genes en cada uno de las cepas analizadas, obteniéndose 5 combinaciones distintas. El PV1 se encontró en 95% de las cepas analizadas. Los perfiles PV2, PV3, PV4 y PV5 se encontraron en 1%-2% de las cepas (Tabla 9).

**Tabla 7.** Perfiles de Virulencia encontrados en las 134 cepas analizadas.

PV	GEN <i>ssaQ</i>	Gen <i>rmbA</i>	Gen <i>spi4-F</i>	NÚMERO DE CEPAS	PORCENTAJE
1	1	1	1	127	95%
2	1	1	0	3	2%
3	0	1	1	2	1%
4	1	0	1	1	1%
5	1	0	0	1	1%
<b>TOTALES</b>				134	100%

Se realizó un análisis de agrupamiento usando el índice de Jaccard (para matrices binarias) y se construyó un dendrograma para establecer la relación entre PV y gen de virulencia. Se observó la presencia de 3 clados, en los cuales se observó una correlación del gen *ssaQ* respecto a *rmbA* y *spi4-F* con un índice de 0.400, ya que el gen *ssaQ* se encuentra en 4 de los 5 PV de los cuales únicamente en 2 se presenta a la par con los genes *rmbA* y *spi4-f*. Con

respecto al gen *rmbA* (presente en 3 de 5 PV) y *spi4-F* (presente en 3 de 5 PV) existe un índice de relación entre ambos de 0.500 debido a que se encuentran en combinación solo en 2 de los 5 PV (Fig. 12).



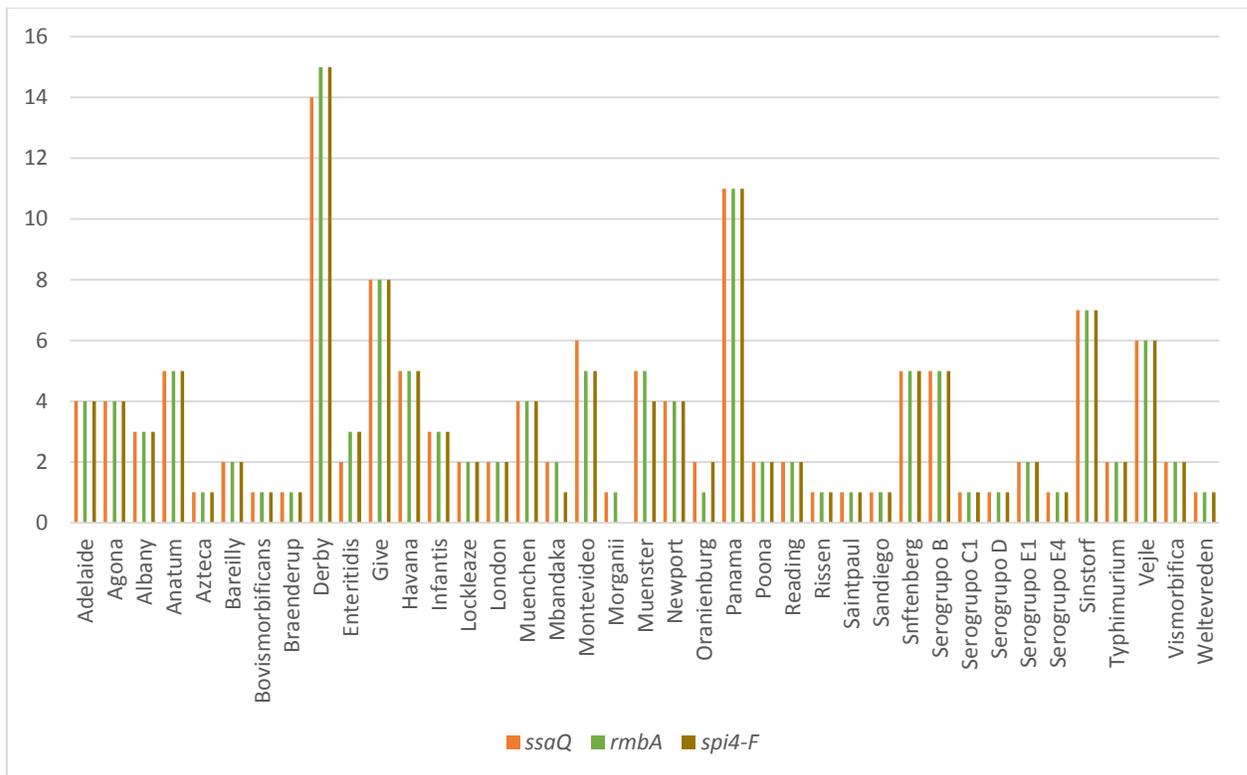
**Figura 11.** Dendrograma de similitud entre los genes *ssaQ*, *rmbA* y *spi4-F* analizados, con base en los PV.

**Tabla 8.** Relación cantidad-porcentaje de presencia de gen de virulencia por cada serotipo analizado.

Serotipo	<i>ssaQ</i>	<i>rmbA</i>	<i>spi4-F</i>
Adelaide	4(3%)	4(3%)	4(3%)
Agona	4(3%)	4(3%)	4(3%)
Albany	3(2%)	3(2%)	3(2%)
Anatum	5(4%)	5(4%)	5(4%)
Azteca	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Bareilly	2(2%)	2(2%)	2(2%)
Bovismorbificans	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Braenderup	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Derby	14(11%)	15(11%)	15(12%)
Enteritidis	2(2%)	3(2%)	3(2%)
Give	8(6%)	8(6%)	8(6%)
Havana	5(4%)	5(4%)	5(4%)
Infantis	3(2%)	3(2%)	3(2%)
Lockleaze	2(2%)	2(2%)	2(2%)
London	2(2%)	2(2%)	2(2%)
Muenchen	4(3%)	4(3%)	4(3%)
Mbandaka	2(2%)	2(2%)	1(1%)
Montevideo	6(5%)	5(4%)	5(4%)
Morganii	1(1%)	1(1%)	0(0%)
Muenster	5(4%)	5(4%)	4(3%)
Newport	4(3%)	4(3%)	4(3%)
Oranienburg	2(2%)	1(1%)	2(2%)
Panama	11(8%)	11(8%)	11(8%)
Poona	2(2%)	2(2%)	2(2%)
Reading	2(2%)	2(2%)	2(2%)
Rissen	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Saintpaul	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Sandiego	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Snftenberg	5(4%)	5(4%)	5(4%)
Serogrupo B	5(4%)	5(4%)	5(4%)
Serogrupo C1	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Serogrupo D	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Serogrupo E1	2(2%)	2(2%)	2(2%)
Serogrupo E4	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Sinstorf	7(5%)	7(5%)	7(5%)
Typhimurium	2(2%)	2(2%)	2(2%)
Vejle	6(5%)	6(5%)	6(5%)

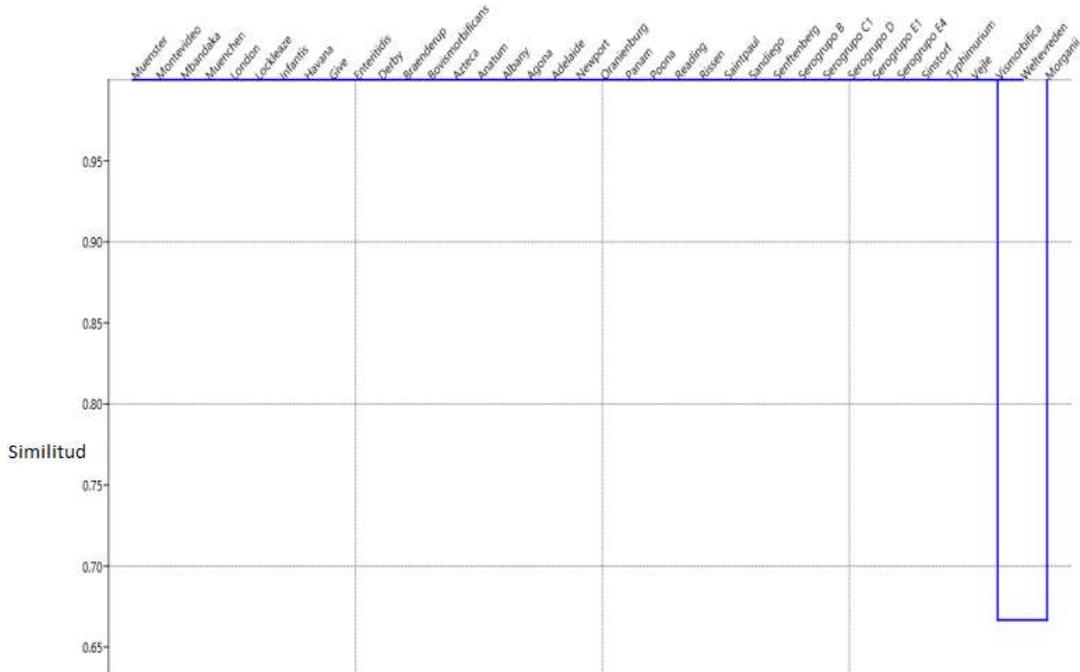
<b>Vismorbifica</b>	2(2%)	2(2%)	2(2%)
<b>Weltevreden</b>	1(1%)	1(1%)	1(1%)
<b>Totales</b>	132(100%)	132(100%)	130(100%)

De acuerdo al análisis relacionando el serotipo y la presencia del gen, se observa que, de los 39 serotipos presentes en las cepas, el de mayor porcentaje en presencia de los genes *ssaQ*, *rmbA* y *spi4-F* es Derby con un 11% de las cepas, seguido de Panama con un 8% y Give con 6%, encontrándose el resto de los 36 serotipos en un intervalo similar de presencia (1%-5%). Esto tiene una relación directa con la información inicial de las características de las cepas ya que el serotipo Derby se encuentra en el 11% de las cepas, Panama en el 8% de las cepas y Give con un 6% de las cepas y el resto de los serotipos en un intervalo de 1-5% de las cepas (Tabla 10 y Fig. 13).



**Figura 12.** Cantidad de genes con respecto al serotipo.

En la correlación serotipo-gen mediante el uso de un dendrograma se observa la similitud de 1 (índice de similitud Jaccard), deduciendo así la correlación entre estos serotipos por la presencia de los genes *ssaQ*, *rmbA* y *spi4-F*, excepto el serotipo Morganii el cual presenta una similitud de 0.67 con respecto al resto de los serotipos ya que carece de la presencia del gen *spi4-F* (Fig. 14).



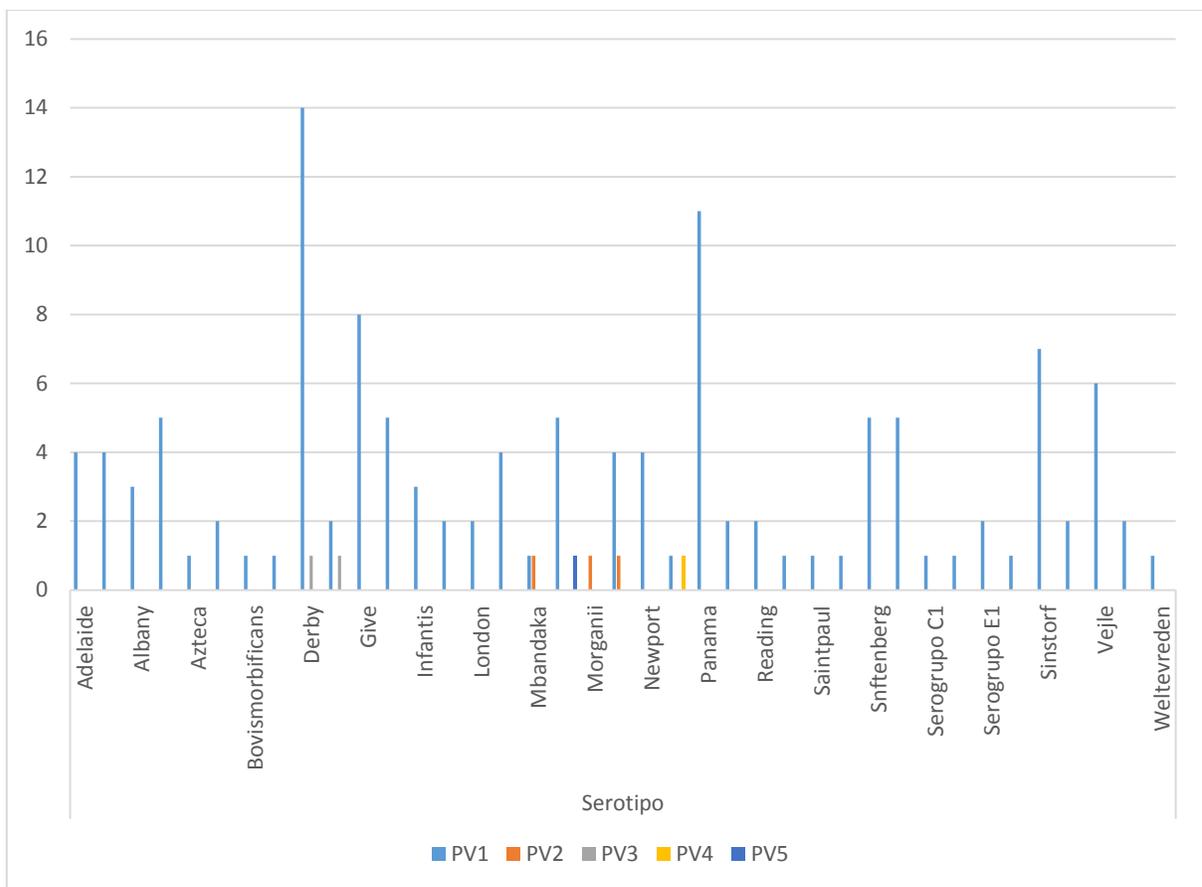
**Figura 13.** Dendrograma de similitud entre los 38 serotipos analizados con base a la presencia de los genes de virulencia.

En la relación serotipo con los 5 PV encontrados en los cepas se observa que el de mayor frecuencia fue el PV1 en 38 de los 39 serotipos que lo presentaron, siendo Derby el de mayor porcentaje (14%) seguido de Panama (6%) y Give (6%). Morganii fue el serotipo que careció de este PV, pero presentó el PV2 al igual que los serotipos Mbandaka y Muenster. El PV3 se encontró presente solo en 2 de los 398 serotipos, Derby y Enteritidis, PV4 y PV5 presentándose en 1 de los 39 los cuales fueron Oranienburg y Montevideo respectivamente (Tabla 11).

**Tabla 9.** Relación de cantidad-porcentaje de cada uno de los PV encontrados en los serotipos analizados.

		Perfil de Virulencia				
		PV1	PV2	PV3	PV4	PV5
<b>Serotipo</b>	<b>Adelaide</b>	4(3%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Agona</b>	4(3%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Albany</b>	3(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Anatum</b>	5(4%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Azteca</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Bareilly</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)

<b>Bovismorbificans</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Braenderup</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Derby</b>	14(11%)	0(0%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)
<b>Enteritidis</b>	2(2%)	0(0%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)
<b>Give</b>	8(6%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Havana</b>	5(4%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Infantis</b>	3(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Lockleaze</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>London</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Muenchen</b>	4(3%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Mbandaka</b>	1(1%)	1(33%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Montevideo</b>	5(4%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)
<b>Morganii</b>	0(0%)	1(33%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Muenster</b>	4(3%)	1(33%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Newport</b>	48(3%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Oranienburg</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)
<b>Panama</b>	11(9%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Poona</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Reading</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Rissen</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Saintpaul</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Sandiego</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Snftenberg</b>	5(4%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Serogrupo B</b>	5(4%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Serogrupo C1</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Serogrupo D</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Serogrupo E1</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Serogrupo E4</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Sinstorf</b>	7(6%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Typhimurium</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Vejle</b>	6(5%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Vismorbifica</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)



**Figura 14.** Relación de cantidad de PV por cada serotipo analizado.

El dendrograma resultante del análisis de similitud relacionando serotipo con PV, muestra la formación de 5 clados; con un índice de similitud del serotipo Oranienburg con el resto de los 38 serotipos de 0.475 ya que es el único serotipo que presentó el PV4 y comparte la presencia del PV1, Montevideo presenta una similitud con el resto de los 37 serotipos excluyendo Oranienburg de 0.480 ya que comparte la presencia del PV1 pero se diferencia por presentar el PV5; Mbandaka, Morganii y Muenster presentan una similitud de 0.490 con respecto a los 33 serotipos excepto Oranienburg y Montevideo ya que comparten la presencia del PV1 pero se diferencian por la característica de presentar el PV2; Derby y Enteritidis presentan una similitud de 0.500 con respecto a 30 serotipos (Give, Braenderup, Bovismorbifica, Azteca, Anatum, Albany, Agona, Adelaide, Havana, Infantis, Lockleaze, London, Muenchen, Newport, Panama, Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, San Diego, Senftenberg, Sinsterf, Typhimurim, Vejele, Vismorbifica Weltevreden, Serogrupo B, Serogrupo C1, Serogrupo D, Serogrupo E1, Serogrupo E4) ya que se caracterizan por presentar PV1 pero se diferencian por la presencia de PV2 y estos últimos 30 serotipos presentan similitud de 1 ya que tienen la característica de todos poseer el PV1 (Fig. 16).

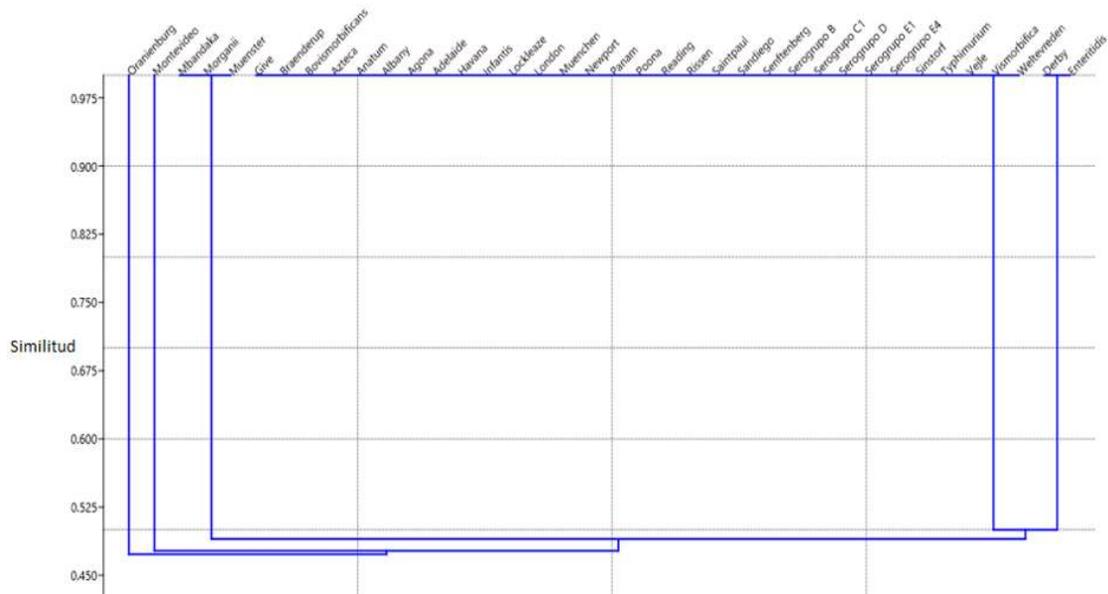


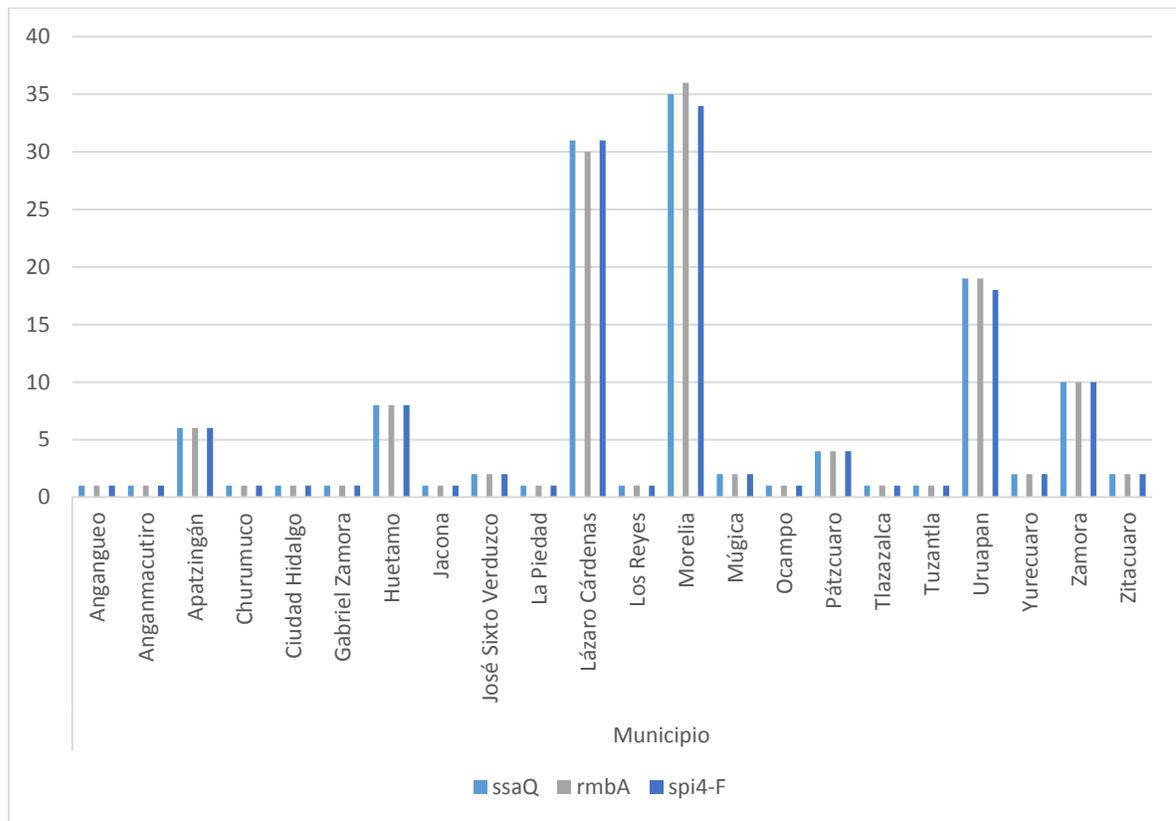
Figura 15. Dendrograma de similitud entre los 38 serotipos analizados con base en los PV.

Tabla 10. Relación de cantidad-porcentaje en cada uno de los genes de virulencia analizados por municipio.

Municipio	<i>ssaQ</i>	<i>rmbA</i>	<i>spi4-F</i>
Angangueo	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Angamacutiro	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Apatzingán	6(5%)	6(5%)	6(5%)
Churumuco	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Ciudad Hidalgo	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Gabriel Zamora	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Huetamo	8(6%)	8(6%)	8(6%)
Jacona	1(1%)	1(1%)	1(1%)
José Sixto Verduzco	2(2%)	2(2%)	2(2%)
La Piedad	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Lázaro Cárdenas	31(23%)	30(23%)	31(24%)
Los Reyes	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Morelia	35(27%)	36(27%)	34(26%)
Múgica	2(2%)	2(2%)	2(2%)
Ocampo	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Pátzcuaro	4(3%)	4(3%)	4(3%)
Tlazazalca	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Tuzantla	1(1%)	1(1%)	1(1%)
Uruapan	19(14%)	19(14%)	18(13%)
Yurécuaro	2(2%)	2(2%)	2(2%)
Zamora	10(8%)	10(8%)	10(8%)

<b>Zitácuaro</b>	2(2%)	2(2%)	2(2%)
<b>Total</b>	132(100%)	132(100%)	130(100%)

En el análisis de la relación municipio-gen se observa la presencia de los tres genes de virulencia en los 22 municipios, pero de estos el que presenta mayor presencia de los genes es el municipio de Morelia, seguido por Lázaro Cárdenas y Uruapan. Esto se ve influenciado debido a que la mayoría de las cepas provenían del Municipio de Morelia, Lázaro Cárdenas y Uruapan (Tabla 12).

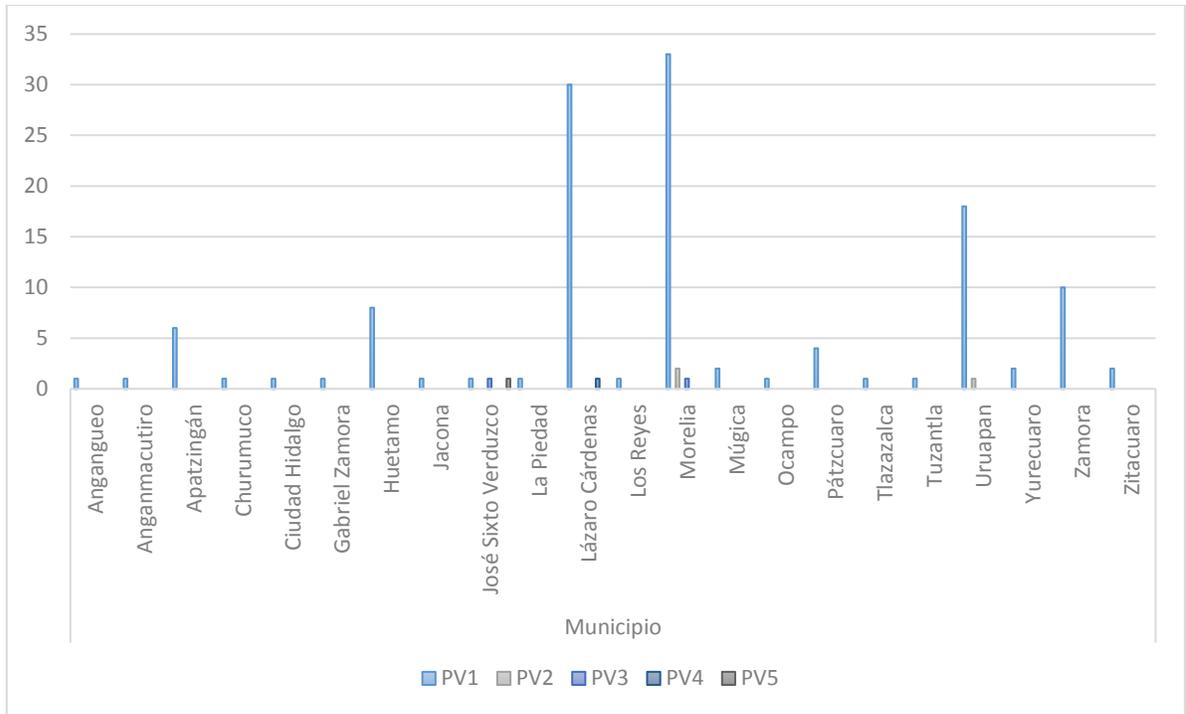


**Figura 16.** Cantidad de gen de virulencia por municipio.

**Tabla 11.** Relación cantidad-porcentaje de cada uno de los 5 PV encontrados por municipio.

		PV1	PV2	PV3	PV4	PV5
<b>Municipio</b>	<b>Angangueo</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Angamacutiro</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Apatzingán</b>	6(5%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Churumuco</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Ciudad Hidalgo</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Gabriel Zamora</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)
	<b>Huetamo</b>	8(6%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Jacona</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>José Sixto</b>	1(1%)	0(0%)	1(50%)	0(0%)	1(100%)
	<b>La Piedad</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Lázaro Cárdenas</b>	30(24%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)
	<b>Los Reyes</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Morelia</b>	33(26%)	2(67%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Múgica</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Ocampo</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Pátzcuaro</b>	4(3%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Tlazalca</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Tuzantla</b>	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Uruapan</b>	18(14%)	1(33%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	<b>Yurécuaro</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Zamora</b>	10(8%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	
<b>Zitácuaro</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	
<b>Totales</b>		127(100%)	3(100%)	2(100%)	1(100%)	1(100%)

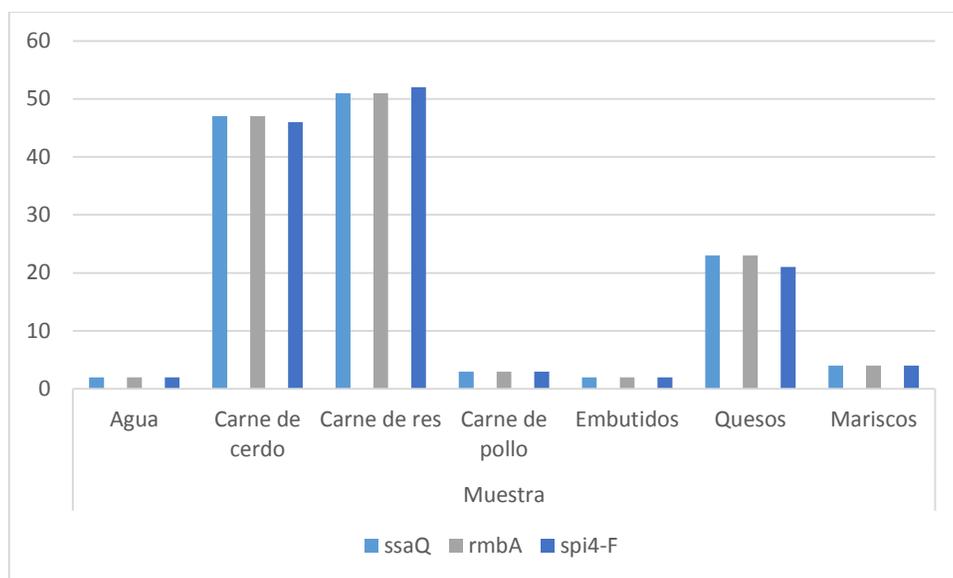
Respecto a la relación Municipio-PV, el PV1 es el de mayor presencia en las cepas analizadas, se encontró con mayor presencia en el municipio de Morelia pues esto tiene relación con que de este municipio son provenientes la mayoría de las cepas. El PV2 se encontró en los Municipios de Morelia y Uruapan, el PV3 se encontró en los municipios de Morelia y José Sixto Verduzco, PV4 se encontró Lázaro Cárdenas y el PV5 en José Sixto Verduzco. Siendo el Municipio de José Sixto Verduzco el que presenta mayor diversidad de PV aun sin ser el de mayor porcentaje respecto a cada PV (Tabla 13 y Fig. 18).



**Figura 17.** Cantidad de PV por municipio.

En el dendrograma de similitud de los municipios analizados con base en los PV, se observa un índice de similitud de 0.340 entre el municipio de José Sixto Verduzco y los 21 municipios analizados debido a que comparten la presencia del PV1 y algunos del PV3 y PV5; realizando comparación entre Morelia y Uruapan contra el resto de los 21 municipios existe un índice de similitud de 0.400 por la presencia del PV1 pero la diferencia se caracteriza por la presencia del PV2 en los dos primeros; Morelia y Uruapan presentan un índice de similitud de 0.670 por la presencia de PV1 y PV2 pero Morelia presenta PV3. Lázaro Cárdenas y el resto de los 18 municipios presentan un índice de similitud de 0.500 por la presencia de PV1 pero se diferencian por la presencia de PV4 en Lázaro Cárdenas. Los municipios de La Piedad, Jacona, Huetamo, Gabriel Zamora, Ciudad Hidalgo, Churumuco, Apatzingán, Angamacutiro, Angangueo, Los Reyes, Múgica, Ocampo, Pátzcuaro, Tlazazalca, Tuzantla, Yurécuaro, Zamora y Zitácuaro presentan un índice de similitud de 1 porque comparten la presencia de PV1 (Fig. 19).



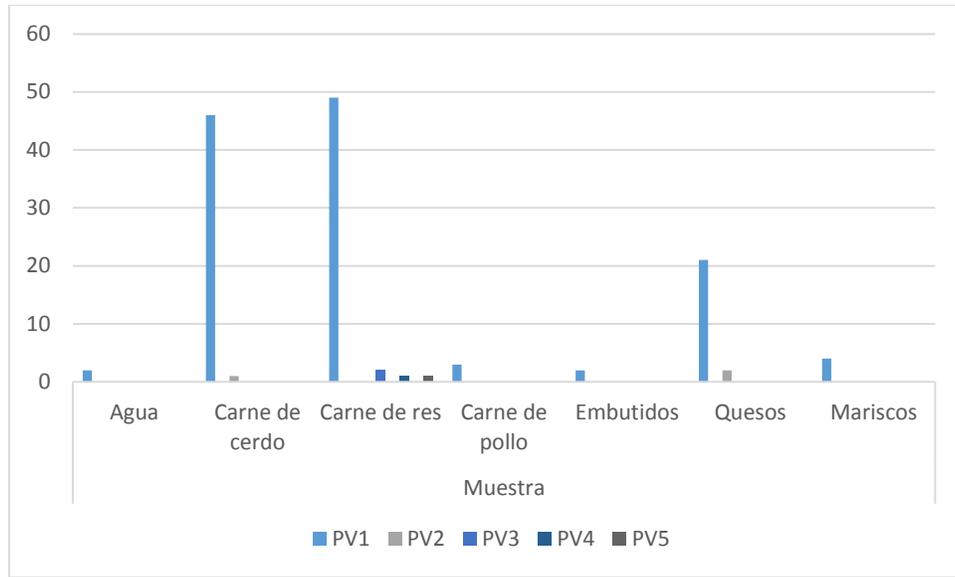


**Figura 19.** Cantidad de cada uno de los genes de virulencia analizados por tipo de muestra.

Realizando una correlación entre PV y tipos de muestra, el PV1 es el que se encuentra en todos los tipos de muestras, siendo PV2 el que se encuentra únicamente en dos tipos de muestra (quesos y carne de cerdo) y el resto de PV se encuentran en un solo tipo de muestra en los cuales fue carne de res para los tres restantes (Tabla 15 y Figura 21).

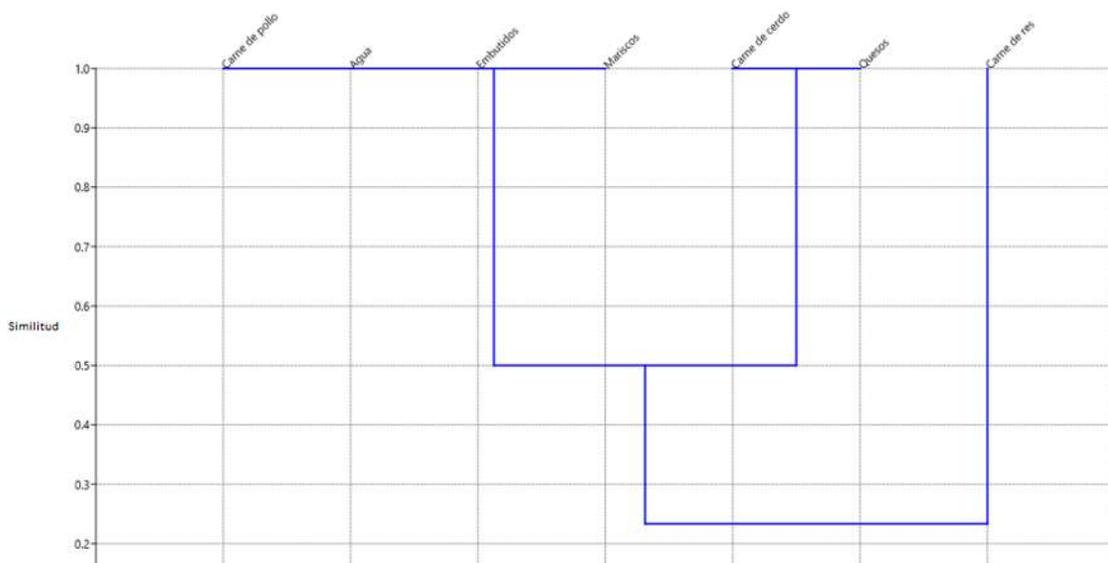
**Tabla 13.** Cantidad-porcentaje de cada uno de los PV encontrados en el estudio por tipo de muestra analizada.

Muestra	Perfil de virulencia				
	PV1	PV2	PV3	PV4	PV5
<b>Agua</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Carne de cerdo</b>	46(36%)	1(33%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Carne de res</b>	49(39%)	0(0%)	2(100%)	1(100%)	1(100%)
<b>Carne de pollo</b>	3(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Embutidos</b>	2(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Quesos</b>	21(17%)	2(67%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Mariscos</b>	4(3%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Total</b>	127(100%)	3(100%)	2(100%)	1(100%)	1(100%)



**Figura 20.** Relación de cantidad de cada uno de los 5 PV encontrados por cada tipo de muestra.

En un análisis de similitud mediante el uso de un dendrograma relacionando PV con tipo de muestra, la carne de res contra el resto de tipos de muestras presentan un índice de similitud 0.23 por que presentan el PV1, pero se diferencian porque la carne de res presenta el PV3; la carne de cerdo y quesos vs carne de pollo, agua, embutidos y mariscos presentan un índice de similitud de 0.5 por la presencia de PV1, pero se caracterizan los primeros por poseer el PV2 (Fig. 22).



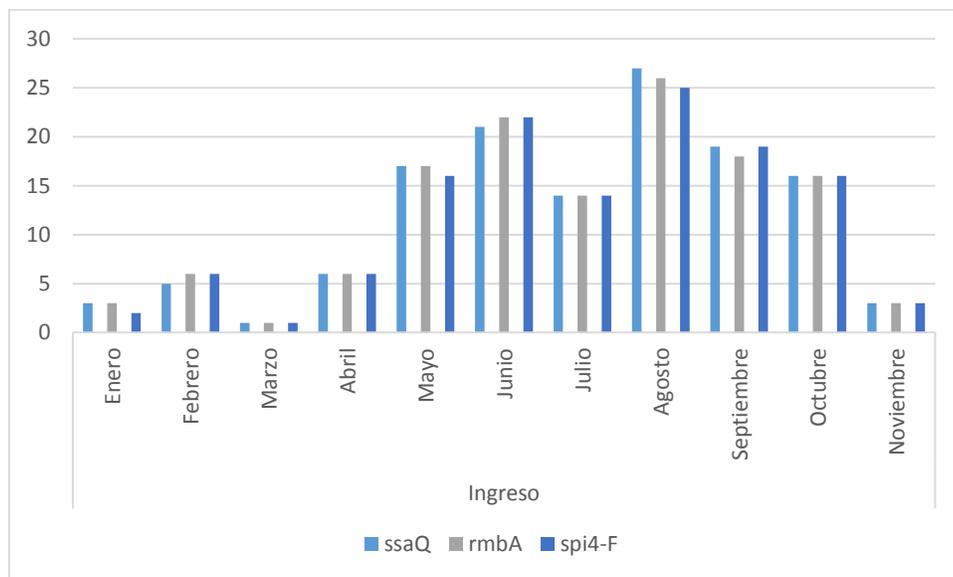
**Figura 21.** Dendrograma de similitud construido con tipo de muestra analizada con base en la presencia de los PV.

El análisis de correlación entre el mes de ingreso y la presencia del gen de virulencia, mostró que estos se encuentran presentes en todos los meses excepto en diciembre. (Tabla 15).

**Tabla 14.** Cantidad-porcentaje de genes de virulencia por mes de ingreso.

		Gen de virulencia		
		<i>ssaQ</i>	<i>rmbA</i>	<i>spi4-F</i>
Mes de Ingreso	Enero	3(2%)	3(2%)	2(2%)
	Febrero	5(4%)	6(5%)	6(5%)
	Marzo	1(1%)	1(1%)	1(1%)
	Abril	6(5%)	6(5%)	6(5%)
	Mayo	17(13%)	17(13%)	16(12%)
	Junio	21(16%)	22(17%)	22(17%)
	Julio	14(11%)	14(11%)	14(11%)
	Agosto	27(20%)	26(20%)	25(19%)
	Septiembre	19(14%)	18(14%)	19(15%)
	Octubre	16(12%)	16(12%)	16(12%)
	Noviembre	3(2%)	3(2%)	3(2%)
<b>Totales</b>		132(100%)	132(100%)	130(100%)

De acuerdo con la información obtenida de la presencia de los genes por mes de ingreso, se observa una incidencia que va del mes de mayo a octubre presentando un ligero descenso en el mes de julio pero aumentando en agosto para disminuir en el mes de noviembre (Fig. 23).



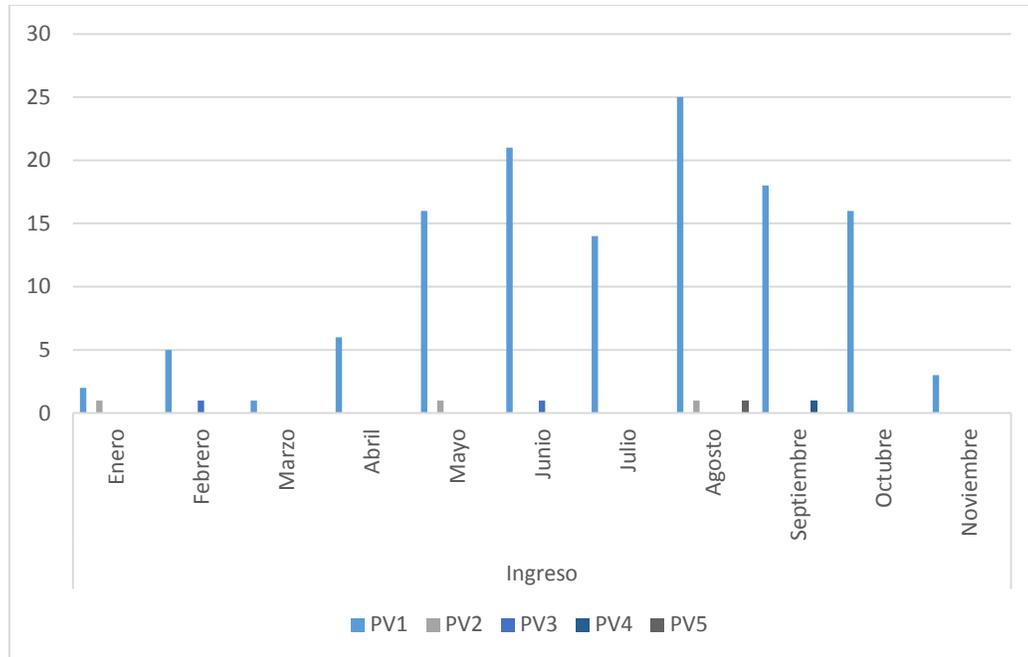
**Figura 22.** Relación cantidad de gen de virulencia por mes de incidencia.

Realizando una correlación entre PV y mes de ingreso el PV1 es el que se encuentra en todos los tipos de meses, PV2 se encuentra únicamente en dos meses (enero y mayo), PV3 en febrero y junio, PV4 en septiembre y PV5 en agosto (Tabla 16).

**Tabla 15.** Cantidad (porcentaje) de cada PV por mes de obtención.

		Perfil de virulencia				
		PV1	PV2	PV3	PV4	PV5
Mes de Ingreso	Enero	2(2%)	1(33%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Febrero	5(4%)	0(0%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)
	Marzo	1(1%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Abril	6(5%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Mayo	16(11%)	1(33%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Junio	21(17%)	0(0%)	1(50%)	0(0%)	0(0%)
	Julio	14(11%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Agosto	25(20%)	1(33%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)
	Septiembre	18(14%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)
	Octubre	16(13%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
	Noviembre	3(2%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
<b>Totales</b>		127(100%)	3(100%)	2(100%)	1(100%)	1(100%)

Evaluando la presencia de PV1 en los meses, se observa mayor incidencia de su presencia en los meses de abril y octubre con un ligero descenso en junio, esto se relaciona con la existencia de pocas cepas del mes de julio (Fig. 24).



**Figura 23.** Cantidad de cada uno de los 5 PV por mes de ingreso.

Analizando la similitud mediante el uso de un dendrograma se observa una similitud de 0.390 entre los 11 porque todos presentan el PV1, el mes de septiembre comprándolo con marzo, abril, julio, octubre, noviembre, febrero y julio presentan una similitud de 0.450 por la presencia del PV1 pero septiembre se diferencia por la presencia del PV4; comparando marzo, abril, julio, octubre y noviembre contra febrero y julio existe una similitud de 0.500 por la presencia de PV1 pero la diferencia de la presencia de PV3 en febrero y julio. Los meses de mayo y enero contra agosto, presentan una similitud de 0.675 por la presencia de PV1 y PV2 pero la diferencia de la presencia de PV5 en agosto.

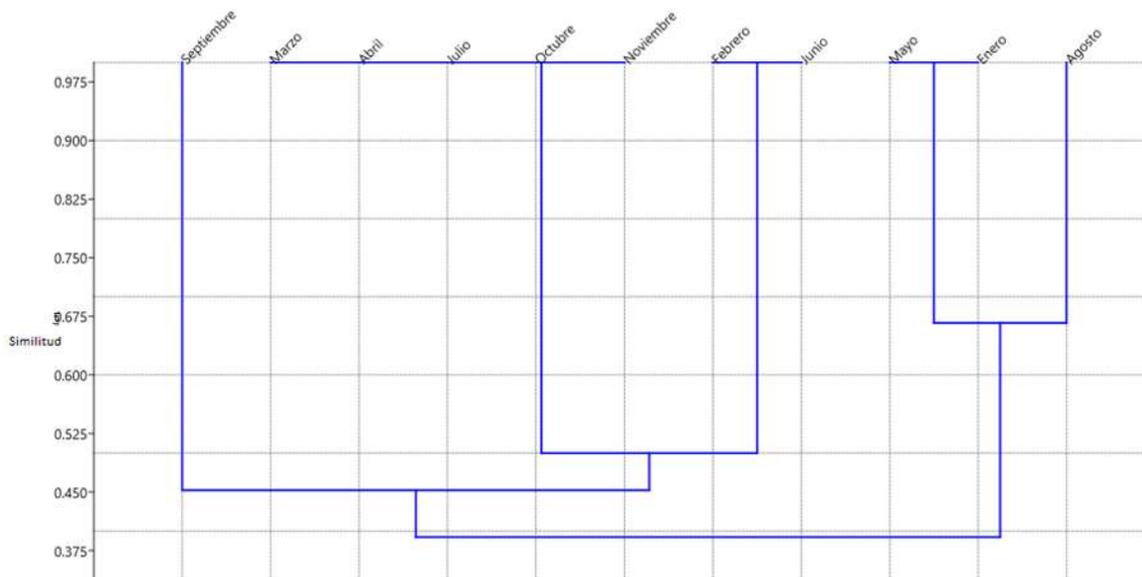


Figura 24. Dendrograma de similitud empleando perfil de virulencia con en el mes de ingreso.



Figura 25. Mapa de distribución de los 5 PV encontrados en este estudio.

## 7.2 Resistencia a antimicrobianos

**Tabla 16.** Resultados del antibiograma realizado a las cepas analizadas

NÚMERO DE CEPAS	ANTIBIOGRAMA															
	S	SXT	CL	NF	GE	AK	NET	CIP	NOF	AM	CB	CF	CTX	CRO	PEF	
1	S															
3	S															
6	S															
7	S															
8		SXT	CL	NF	GE					AM	CB					
9	S															
11						AK	NET				CB					
12											CB					
14	S															
18		SXT								AM	CB					
19	S															
20	S															
23						AK					CB					
25		SXT				AK				AM	CB					
27						AK										
31	S															
33							NET				CB					
34			CL	NF	GE		NET			AM	CB	CF	CTX		PEF	
35											CB					
36						AK					CB					
37	S															
38	S															
42	S															
47		SXT														
50	S															
51		SXT		NF	GE	AK	NET			AM	CB	CF	CTX	CRO		
52	S															
55		SXT	CL							AM	CB	CF				
57		SXT	CL							AM	CB		CTX	CRO		
58		SXT	CL		GE					AM	CB	CF				
59		SXT			GE											
60	S															

61		SXT	CL	NF	GE				
63	S								
64	S								
71	S								
73	S								
74	S								
76		SXT							
77	S								
78					NET			CTX	CRO
79	S								
80			CL			AK			
82						AK			
83	S								
85	S								
87	S								
88			CL						
91	S								
92	S								
93			CL						
95	S								
101			CL						
102								CB	
103				NF		AK		CB	
104	S								
105	S								
106						AK			
108		SXT	CL		GE		AM	CF	CTX
110	S								PEF
111								CB	
114	S								
117	S								
118	S								
119	S								
121	S								
122	S								
123								CB	
124		SXT	CL	NF					
126								CB	
128								CB	
129		SXT	CL				AM	CB	
130	S								
131	S								
	R								

134		SXT		NF															
135		SXT	CL	NF															
136		SXT	CL	NF															
137		SXT	CL	NF															
138	S																		
	R																		
140		SXT	CL	NF															
142	S																		
	R																		
143		SXT	CL	NF															
145		SXT	CL	NF															
147		SXT	CL	NF															
148				NF	GE	AK	NET			AM	CB	CF	CTX						
150	S																		
152		SXT	CL	NF															
154	S																		
	R																		
158		SXT	CL	NF															
159							NET						CF						
162				NF															
163		SXT	CL	NF															
164							NET	CIP	NOP										
165	S																		
	R																		
166							NET												
168				NF															
170		SXT		NF															
171				NF															
172	S																		
	R																		
173		SXT	CL	NF															
174				NF															
175				NF	GE														
176		SXT								AM									
177	S																		
	R																		
179		SXT	CL	NF															
181		SXT																	
183	S																		
	R																		
184		SXT																	
186		SXT	CL	NF															
187	S																		
	R																		
189		SXT		NF		AK	NET												
192		SXT	CL	NF															

194				GE	AK	NET		CB	CF
195	SXT	CL	NF						
198	SXT		NF		AK		AM	CB	
199			NF						
204	SXT			GE		NET			
205	S								
	R								
206			NF						
207	SXT	CL	NF						
209	S								
	R								
210	SXT	CL							
211	S								
	R								
212	S								
	R								
215	SXT	CL	NF	GE	AK	NET	AM	CB	CF
217		CL							
219	SXT	CL	NF						
220	SXT						NOF	AM	CB
221									CB
222									CB
225							NOF		
226	S								
	R								
232	SXT	CL	NF			NET	CIP	NOF	
235				GE	AK	NET		CB	

De acuerdo a las combinaciones encontradas por cada uno de los cinco PV se realizó una relación para evaluar el número de cepas que presentaron dicha combinación y evaluar el impacto de los genes de virulencia sobre la resistencia de ciertos antimicrobianos, para el caso del PV1 se encontró 14 cepas sin resultados y 35 cepas sensibles, para el PV2 se encontró 1 cepa sensible. En el caso del PV4 la única cepa encontrada con este perfil presentaba resistencia a CB (Tabla 18).

**Tabla 17.** Asociación de resistencia a antimicrobianos respecto al PV1.

NÚMERO DE CEPAS	COMBINACIONES DE ANTIMICROBIANOS								
1	SXT	CL	NF	GE	AM	CB			
1						CB	AK	NET	
8						CB			
1	SXT				AM	CB			
2						CB	AK		

1	SXT				AM	CB	AK					
1							AK					
1						CB		NET				
1		CL	NF	GE	AM	CB		NET	CF	CTX	PEF	
1	SXT		NF	GE	AM	CB	AK	NET	CF	CTX		CRO
2	SXT	CL			AM	CB						
1	SXT	CL			AM	CB			CF	CTX		CRO
1	SXT	CL		GE	AM	CB			CF			
1	SXT			GE								
1	SXT	CL	NF	GE								
1	SXT											
1								NET		CTX		CRO
2		CL					AK					
1			NF			CB	AK					
1		CL										
1	SXT	CL		GE	AM				CF	CTX	PEF	
1												
16	SXT	CL	NF									
1			NF	GE	AM	CB	AK	NET	CF	CTX		
1			NF					NET	CF			
1								NET				CIP
1								NET				
5			NF									
1	SXT		NF									
1			NF	GE								
1	SXT				AM							
2	SXT											
1	SXT		NF				AK	NET				
1				GE	AM	CB	AK		CF			
1	SXT		NF		AM	CB	AK					
1	SXT			GE				NET				
1	SXT	CL										
1	SXT	CL	NF	GE	AM	CB	AK	NET	CF			
1		CL										
1	SXT				AM	CB						NOF
1	SXT	CL	NF					NET			CIP	NOF
1												NOF

**Tabla 18.** Asociación de resistencia a antimicrobianos respecto al PV2.

NUMERO DE CEPAS	COMBINACION DE ANTIMICROBIANOS
1	SXT NF
1	SXT NF CL

**Tabla 19.** Asociación de resistencia a antimicrobianos respecto al PV3.

<b>NUMERO DE CEPAS</b>	<b>COMBINACION DE ANTIMICROBIANOS</b>		
<b>2</b>	SXT	CL	NF

**Tabla 20.** Asociación de resistencia a antimicrobianos respecto al PV5.

<b>NUMERO DE CEPAS</b>	<b>COMBINACION DE ANTIMICROBIANOS</b>		
<b>1</b>	GE	AK	NEF

## 8 Discusión

En este trabajo se analizaron 134 cepas de *Salmonella enterica* para detectar la presencia de 3 genes de virulencia (*ssaQ*, *rmbA* y *spi4-F*) localizados en las islas de patogenicidad SPI-2, SPI-3 y SPI-4 ya que estas islas están involucradas en la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimientos intracelulares de fagocitos y células epiteliales, también codifican un sistema de secreción tipo I y se cree que participan en la adaptación en ambientes intracelulares (Figueroa 2005). Esta identificación proporciona información sobre la patogenicidad de las cepas aisladas de diversos alimentos (productos cárnicos, derivados lácteos, embutidos, mariscos y agua) en el estado de Michoacán ya que son pocos los estudios realizados en el Estado. México se encuentra dentro de los países que carecen de sistemas de vigilancia de patógenos transmitidos por alimentos, en donde se integre alimentos, humanos y animales, por lo que en un estudio realizado por Mussaret y colaboradores en 2008, se diseñó un sistema integrado de vigilancia de la cadena alimentaria para *Salmonella* en México en el cual se estudiaron 4 estados representativos de México, en donde Michoacán representó la región del pacifico central y se ubicó en el tercer lugar de los estados que presenta contaminación por *Salmonella* en carne.

Los genes identificados en este estudio se encontraron en casi todas las cepas analizadas, con lo cual se pudo establecer 5 perfiles de virulencia distribuidos en todo el estado de Michoacán, lo cual coincide con el trabajo realizado por Maldonado en 2015 en donde se reportaron 8 PV en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos de Michoacán, estudio que consistió en la identificación de 6 genes, tres de los cuales son los identificados en este estudio lo cual explica la diferencia en cuanto a cantidad de PV encontrados. Huehn y colaboradores en 2010, identificaron 10 genes de virulencia, que coincide con este estudio debido a que incluyen el gen *ssaQ*, obteniendo 14 perfiles de virulencia los cuales se han observado en toda Europa. En Pakistán se han realizado estudios con el serotipo Typhimurium identificando diversos genes de virulencia localizados en las islas de patogenicidad SPI1, SPI2, SPI4, SPI8, SPI9, SPI11, SPI12, SPI16, SPI18, SPI17 Y SPI10 (Liaquat, Ali, Sarwar, y Haque, 2018). En Malasia con el objetivo de determinar un rango de genes de virulencia entre las cepas tifoideas y no tifoideas se tomaron cepas de diferentes regiones geográficas (Malasia, Indonesia, Papua Nueva Guinea y Chile) para detectar la presencia de 22 genes de virulencia. En *Salmonella* Typhi: *invA*, *prgH*, *sifA*, *spiC*, *sopB*, *iroN*, *sitC*, *misL*, *pipD*, *cdtB* y *orfL* estaban presentes en todas las cepas, mientras que *sopE*, *agfC*, *agfA*, *sefC*, *mgtC* y *sefD* estaban presentes en un intervalo de 98.8%-17.2% de las cepas, no se detectó *lpfA*, *lpfC*, *pefA*, *spvB* o *spvC*. Mientras tanto, en *Salmonella* Enteritidis, 15 genes (*agfA*, *agfC*, *invA*, *lpfA*, *lpfC*, *sefD*, *prgH*, *spiC*, *sopB*, *sopE*, *iroN*, *sitC*, *misL*, *pipD* y *orfL*) se encontraron en todas las

cepas. El gen *cdtB* estuvo ausente en todas las cepas de *Salmonella* Enteritidis probadas (Ismail y Lin, 2013). Con estos datos se puede observar que las islas estudiadas en este estudio son frecuentes en el mundo pero se carece de mayor información respecto a los genes *ssaQ*, *rmbA* sobre todo del gen *spi4-F*, lo cual es de importancia debido a que en este estudio presentaron alta prevalencia en cepas de *Salmonella enterica*.

El estudio realizado por Liaquat, Ali, Sarwar, y Haque en 2018, se observó una asociación de perfil de virulencia respecto a la resistencia a antibióticos, en el cual se observó que en el período 2001-2008 aumento el número de *Salmonella* Typhimurium, el cual estuvo acompañado por *Salmonella* Enteritidis ambas resistentes a AMP (del 39 al 52% al avanzar el período), AMC (0.4-16%), así como cotrimoxazol y ciprofloxacino (13 y 0.5%, respectivamente) y una disminución en la resistencia a ácido nalidíxico (del 42.5 al 20%). Durante el período 2009-2010 continuó la tendencia creciente de Typhimurium frente a Enteritidis (61% vs 16%) y el porcentaje de cepas resistentes a AMP que se encontró fue del 55%, con el 87% de ellos del serotipo Typhimurium.

Los PV y resistencia a antibióticos pueden estar asociados, debido a que estos genes se encuentran en las SPI que son más estables en las cepas (Martínez, 2007), los antibióticos a los que se les ha detecto resistencia son los de administración frecuente, cuando se presenta un cuadro diarreico (Beceiro, Tomás y Bou, 2012). Por lo que se realizó en la presente tesis una asociación entre PV y resistencia a antibióticos observando que 94 cepas presentaban resistencia a Sulfametoxazol/trimetroprim, Cloranfenicol, Nitrofurantina, Gentamicina, Amikacina, Netilmicina, Ampicilina, Carbenicilina, Cefalottina, Ceftriaxona y Cefepime. Por lo que sería posible que los genes *ssaQ*, *rmbA* y *spi4-F* estén relacionados en cierto punto con la resistencia a estos antibióticos. De acuerdo a lo observado en la literatura, se sabe que existe resistencia de *Salmonella* a antibióticos de las familias sulfonamidas, fluoroquinolonas, quinolonas, betalactamicos y aminoglucósido en los PV establecidos que presentan los genes de virulencia *ssaQ* y *rmbA* (Toro, 2013), sin embargo del gen *spi4-F* es muy poca la información disponible con respecto a una asociación de resistencia a antimicrobianos. Por lo cual se sugiere realizar estudios de genotipificación con mayor número de genes de virulencia, para obtener PV mas enriquecidos de información y poder evaluar con certeza que tan cercana es su relación y su punto de correlación a resistencia a antibióticos. Debido a que una resistencia a antibióticos se incrementaría aún más con una carga virulenta dando lugar al potencial patogénico en una cepa.

Estudios realizados sobre resistencia a antibióticos en *Salmonella* donde se determinaron el perfil de sensibilidad y resistencia de 91 cepas *Salmonella* spp aisladas de muestras clínicas coinciden con el estudio presente pues se encontró resistencia a ácido nalidixico, ampicilina,

cefalotina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazole (Sánchez, Caraballo, Cardona, Bernal, Tulia y Eduardo, 2004). A menudo la resistencia antimicrobiana se encuentra también asociada a la infección y por tanto, también vinculada a virulencia, como en el caso de microorganismos productores de biofilm o en infecciones intracelulares (Beceiro, Tomás y Buo, 2012). Los factores de resistencia ofrecen al microorganismo la capacidad de continuar replicándose en un individuo tratado con antimicrobianos, desplazando al resto de microorganismos sensibles y expresando así su carga genética de patogenicidad (Beceiro, Tomás y Buo, 2012).

Se tiene registro de estudios donde se asocian la virulencia y la resistencia a antibióticos en otras bacterias como en *Escherichia coli*, en el cual se analizaron 50 cepas de *E.coli* de una localidad en el centro México y 57 provenientes de una localidad al suroeste. Los aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente (serotipificación, ensayos de adherencia, formación de biopelícula, producción de hemolisina y susceptibilidad antibióticos) y genotípicamente (grupos filogenéticos y genes de virulencia). Los grupos filogenéticos B2 (60%) y F (12%) fueron significativamente predominantes en la localidad del centro con mayor frecuencia de los genes *fimH* (96%), *iutA* (66%) y *sat* (36%) en comparación con la localidad en el suroeste, donde los grupos A (35%) y B1 (21%) fueron más frecuentes y presentaron menor cantidad de genes de virulencia. El 21,5% del total de las cepas pertenecieron al grupo O25-ST131. La producción de hemolisina y biopelícula fue significativamente mayor en cepas de la localidad del sureste. La resistencia a ampicilina (92,5%), tetraciclina (76,6%) y trimetoprim/sulfametoxazol (70,1%) fueron las más comunes en ambos grupos (Miranda, Ruíz, Molina, Parra, Gonzalez y Castro 2017).

Los siguientes serotipos presentaron un par de PV: Derby (PV1 y PV3), Enteritidis (PV1 y PV3), Mbandaka (PV1 y PV2), Montevideo (PV1 y PV5), Muenster (PV1 y PV2) y Oranienburg (PV1 y PV4), donde se observó que uno de los PV es el responsable de la diferencia entre ellos, de acuerdo a los datos registrados se sabe mediante análisis bioinformáticos que alrededor del 80% de los genes presentes en los serotipos de *Salmonella* son homólogos entre sí, difiriendo aproximadamente en un 3% de su secuencia. El 20% restante de cada genoma es único, definiendo islas genómicas específicas de cada serotipo (Bäumler, Tsolis, Ficht, y Adams, 1998). Algunos genes codificados en islas específicas podrían ser una de las causas de la variabilidad en patogenicidad que presentan los distintos serotipos de *Salmonella* (Amavisit, Lightfoot, Browning y Markhem, 2003). En estudios realizados por Liaquat, Ali, Sarwar, y Haque en 2018 se observó que la ausencia o presencia de genes se puede deber a la pérdida parcial o total de la SPI debido a las características de tamaño de la isla, ya que entre más pequeña es más probable su pérdida completa. En 2010 Huehn y colaboradores, encontraron algunas diferencias en los perfiles de genes de virulencia entre cepas que pertenecen a un

serotipo individual, variación que se produjo principalmente dentro de los genes de virulencia que estaban codificados por profagos, en grupos fimbriales o en el plásmido de virulencia, parece probable que tales cambios permitan a *Salmonella* adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo que podría reflejarse en una ecología específica del serotipo; detectando en este subconjunto de cepas varios genes de resistencia.

En los municipios con mayor diversidad de PV fue José Sixto Verduzco a pesar de ser uno de los municipios con menor número de cepas para este estudio. Respecto a los serotipos se observó que el serotipo Derby presentó mayor diversidad de PV, lo cual nos reafirma la importancia de realizar este tipo de análisis de virulogenitipificación con mayor número de cepas por cada municipio para así evaluar con mayor certeza la distribución geográfica de los PV.

El tipo de muestra que presentó mayor diversidad de PV fueron carne de res, carne de cerdo y quesos los cuales son alimentos que contienen grasa, lo cual es un ambiente para el crecimiento de *Salmonella enterica* ya que sobrevive durante tiempo prolongado en alimentos con elevado contenido de proteínas y grasas (Hacha y Boris, 2001), respecto al pH del alimento la carne de res presenta un pH que oscila entre 5.1-6.2, carne de puerco 5.4-5.6, y el queso entre 4.9-5.9 y *Salmonella* crece en un rango de pH de 3.8-9.5 con un óptimo crecimiento en un pH de 7-7.5 (Elika, 2013), por lo cual posiblemente al estar el pH de la carne de res cerca del pH óptimo este puede ser una característica para presentar mayor diversidad de número de cepas diferentes de *Salmonella enterica* por lo cual es susceptible a presentar diversidad de PV.

Para este estudio se observó la incidencia en el mes de mayo a octubre y dentro de este rango de tiempo no solo se observó mayor número de cepas si no también la presencia de dos a tres PV distintos, lo cual coincide con lo descrito por que *Salmonella* presenta incidencia estacional, por lo que el canal endémico registra aumento de casos a partir del mes de mayo, con pico máximo en julio y agosto y una declinación a partir de septiembre (Guitierrez, Montiel, Aguilera, y Gonzalez, 2000).

## 9 CONCLUSIÓN

- I. Se establecieron 5 PV a partir de la identificación de tres genes de virulencia de las SPI2, SPI3 y SPI4 de *Salmonella enterica* procedentes de diversos municipios de Michoacán.
- II. Se realizó una asociación entre PV con serotipo, procedencia geográfica, tipo de muestra, fecha de obtención y sensibilidad a antibióticos. Concluyendo con estos resultados que el PV está relacionado con el serotipo y ubicación geográfica, excluyendo al tipo de muestra y mes de obtención debido a que el PV no depende de estos. Respecto a la sensibilidad a antibióticos, se obtuvo la relación de los 5 PV con resistencia a Amikacina, Ampicilina, Carbenicilina, Cloranfenicol, Sulfametoxazol / Trimetoprim, Nitrofurantoina, Gentamicina y Netilmicina.

## 10 ANEXOS

### ANEXO I. Información de las cepas analizadas en este estudio.

NÚMERO DE CEPA	MUESTRA	MUNICIPIO	FECHA DE INGRESO	SEROTIPO
<b>SAL 0011</b>	Carne de res	Tlazazalca	2009-05-27	Derby
<b>3</b>	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2009-05-22	Give
<b>6</b>	Queso fresco	La Piedad	2009-06-04	Give
<b>7</b>	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2009-06-05	Senftenberg
<b>8</b>	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009-06-05	Panama
<b>9</b>	Chorizo	Uruapan	2009-06-16	Derby
<b>11</b>	Queso Cotija	Morelia	2009-06-22	Montevideo
<b>12</b>	Chorizo	Los Reyes	2009-05-21	Agona
<b>14</b>	Queso ranchero	Morelia	2009-05-18	Mbandaka
<b>18</b>	Queso fresco	Ciudad Hidalgo	2009-05-29	Anatum
<b>19</b>	Carne de res	Pátzcuaro	2009-05-15	London
<b>20</b>	Chorizo	Pátzcuaro	2009-05-15	London
<b>23</b>	Queso panela	Morelia	2009-02-23	Bovismorbificans
<b>25</b>	Chorizo	Uruapan	2009-09-03	Anatum
<b>27</b>	Queso tipo americano	Zamora	2009-04-21	Reading
<b>31</b>	Chorizo crudo	Zitácuaro	2009-10-28	Anatum
<b>33</b>	Carne magra de cerdo	Zamora	2009-07-28	Vejle
<b>34</b>	Guisado de pollo	Zamora	2009-06-30	Enteritidis
<b>35</b>	Queso fresco	Zitácuaro	2009-06-01	Poona
<b>36</b>	Chorizo	Uruapan	2009-06-30	Serogrupo B
<b>37</b>	Carne de res cruda	Morelia	2009-06-30	Newport
<b>38</b>	Carne de res cruda	Uruapan	2009-11-24	Serogrupo B
<b>42</b>	Carne de res cruda	Apatzingán	2009-11-21	Lockleaze
<b>47</b>	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2008-07-18	Serogrupo B

50	Carne de res cruda	Huetamo	2009-10-02	Senftenberg
51	Chorizo crudo	Morelia	2009-08-11	Infantis
52	Carne de res cruda	Zamora	2009-09-09	Derby
55	Carne de res	Morelia	2009-06-27	Sinstorf
57	Chorizo	Morelia	2009-10-26	Lockleaze
58	Coctel de ostión	Morelia	2009-10-26	Mbandaka
59	Gancho	Uruapan	2009-10-15	Havana
60	Carne de res cruda	Zamora	2009-08-26	Typhimurium
61	Gancho	Uruapan	2009-10-15	Havana
63	Carne de res	Yurécuaro	2009-10-28	Newport
64	Carne de res cruda	Huetamo	2009-10-02	Sebftenberg
71	Carne de res cruda	Morelia	2009-10-12	Havana
73	Chorizo	Morelia	2009-09-07	Muenster
74	Carne de res cruda	Uruapan	2009-09-03	Derby
76	Chorizo	Churumuco	2009-08-06	Sinstorf
77	Carne de res cruda	Morelia	2009-06-23	Saintpaul
78	Carne de res cruda	Morelia	2009-06-24	Give
79	Chorizo	Jaconá	2009-08-25	Sandiego
80	Carne de res cruda	Guacamayas	2009-09-23	Panama
82	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2009-04-25	Muenchen
83	Chorizo	Uruapan	2009-05-12	Serogrupo B
85	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009-10-03	Muenster
87	Chorizo	Uruapan	2009-11-12	Adelaide
88	Carne de res cruda	Yurécuaro	2009-10-07	Muenchen
91	Carne de res cruda	Apatzingán	2009-10-21	Agona
92	Chorizo	Guacamayas	2009-08-15	Panama
93	Carne de res cruda	San Juan Nuevo	2009-09-12	Derby

95	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2009-10-03	Muenster
101	Queso Ranchero	Morelia	2009-07-06	Give
102	Chorizo	Zamora	2009-10-15	Oranienburg
103	Chorizo	Huetamo	2009-08-07	Serogrupo B
104	Chorizo	Nueva Italia	2009-07-09	Agona
105	Queso Ranchero	Huetamo	2009-08-07	Serogrupo C1
106	Carne de res cruda	Morelia	2009-06-09	Montevideo
108	Chorizo	Guacamayas	2009-09-11	Panama
110	Queso	Morelia	2009-06-10	Give
111	Carne de cerdo	Morelia	2009-09-14	Vejle
114	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009-10-23	Newport
117	Chorizo	Apatzingán	2009-04-16	Weltevreden
118	Coctel de ostión	Morelia	2009-09-21	Vejle
119	Queso	Morelia	2009-09-21	Vejle
121	Chorizo crudo	Zamora	2009-09-22	Vejle
122	Queso tipo Oaxaca	Morelia	2009-07-20	Reading
123	Tacos de jamón	Morelia	2009-07-20	Derby
124	Carne de res cruda	Uruapan	2009-09-24	Adelaide
126	Carne de res cruda	Morelia	2009-07-21	Adelaide
128	Chorizo	Morelia	2009-08-24	Give
129	Chuleta de cerdo	Morelia	2009-08-09	Vejle
130	Chorizo	Huetamo	2009-06-24	Give
131	Chorizo crudo	Uruapan	2009-06-30	Typhimurium
134	Queso de adobera	Uruapan	2010-01-27	Muenster
135	Carne de res cruda	Morelia	2010-02-02	Muenster
136	Carne de res	Morelia	2010-02-03	Enteritidis
137	Carne de cerdo	Lázaro Cárdenas	2010-02-05	Albany
138	Queso fresco	Tuzantla	2010-02-09	Muenchen
140	Chorizo	Morelia	2010-03-11	Havana
142	Agua	Lázaro Cárdenas	2010-04-08	Bareilly
143	Agua	Lázaro	2010-04-08	Bareilly

Cárdenas				
145	Chorizo	Morelia	2010-04-19	Havana
147	Carne de res cruda	Morelia	2010-05-17	Panama
148	Chorizo crudo	Huetamo	2010-05-27	Derby
150	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2010-05-28	Derby
152	Carne de res cruda	Pastor Ortiz	2010-06-03	Derby
154	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2010-06-11	Albany
158	Carne de res cruda	Uruapan	2010-07-07	Anatum
159	Chorizo	Uruapan	2010-07-07	Rissen
162	Chorizo	Pastor Ortiz	2010-07-30	Derby
163	Chorizo	Morelia	2010-08-02	Morganii
164	Carne de res cruda	Morelia	2010-08-02	Infantis
165	Queso Fresco	Apatzingán	2010-08-13	Newport
166	Chorizo	Apatzingán	2010-08-13	Derby
168	Chorizo	Huetamo	2010-08-18	Poona
170	Queso Fresco	Huetamo	2010-08-18	Serogrupo E4
171	Chorizo	Uruapan	2010-08-19	Derby
172	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2010-08-20	Sinstorf
173	Chorizo	Uruapan	2010-08-25	Derby
174	Carne de cerdo	Morelia	2010-08-30	Vismorbifica
175	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2010-09-09	Muenchen
176	Queso	Apatzingán	2010-09-09	Serogrupo E1 monofasica
177	Carne de res cruda	Morelia	2010-09-10	Anatum
179	Carne de res cruda	Morelia	2010-09-20	Adelaide
181	Carne de res cruda	Uruapan	2010-09-23	Serogrupo E1
183	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2010-09-24	Serogrupo D
184	Carne de res cruda	Uruapan	2011-01-14	Derby

<b>186</b>	Queso Fresco	Pátzcuaro	2011-01-19	Poona
<b>187</b>	Queso panela	Zamora	2011-02-16	Give
<b>189</b>	Carne de res cocida	Playa Azul	2011-04-01	Enteritidis
<b>192</b>	Chorizo	Nueva Italia	2011-05-19	Agona
<b>194</b>	Carne de res cruda	Guacamayas	2011-05-20	Infantis
<b>195</b>	Pollo crudo	Anganguero	2011-05-24	Sinstorf
<b>198</b>	Chorizo crudo	Guacamayas	2011-05-27	Panama
<b>199</b>	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2011-05-27	Panama
<b>204</b>	Queso Fresco	Morelia	2011-06-20	Braenderup
<b>205</b>	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2011-06-24	Montevideo
<b>206</b>	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2011-06-24	Montevideo
<b>207</b>	Queso cotija	Lázaro Cárdenas	2011-06-24	Senftenberg
<b>209</b>	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2011-07-08	Albany
<b>210</b>	Chorizo	Guacamayas	2011-07-08	Senftenberg
<b>211</b>	Carne de res cruda	Guacamayas	2011-07-08	Sinstorf
<b>212</b>	Carne de res cruda	Guacamayas	2011-07-22	Give
<b>215</b>	Carne de res cruda	Ocampo	2011-08-04	Sinstorf
<b>217</b>	Chorizo	Angamacutiro	2011-08-10	Panama
<b>219</b>	Queso panela	Zamora	2011-08-17	Panama
<b>220</b>	Jamón de pavo	Zamora	2011-08-17	Panama
<b>221</b>	Carne de res cruda	Lombardía	2011-08-23	Montevideo
<b>222</b>	Carne de res cruda	Pastor Ortiz	2011-08-24	Montevideo
<b>225</b>	Queso añejo	Morelia	2011-08-29	Vismorbifica
<b>226</b>	Carne de res cruda	Pátzcuaro	2011-08-31	Azteca
<b>232</b>	Carne de puerco cruda	Morelia	2011-09-19	Sinstorf
<b>235</b>	Carne de res cruda	Guacamayas	2011-09-29	Oranienburg

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alimentos, R. N. (2015). Resistencia antimicrobiana a Salmonella. INFOSAN.
- Alimentos, R. N. (2016). Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Red Nacional de Proteccion de Alimentos.
- Alvarado, D. (2017). Tipificación molecular de aislados de Salmonella enterica subespecie enterica de muestras obtenidas de sistemas de producción avícola en Péru. Peru: Universidad Ricardo Palma.
- Amavisit, P., Lightfoot, G., Browning, F., & Markham. (2003). Variation between Pathogenic Serovar within Salmonella Pathogenicity Islands. J. bacteriol.
- Ballesteros, N., Rubio, M., Delgado, E., Méndez, D., Braña, D., & Rodas, O. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de Salmonella spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. Salud Publica México, 371-377.
- Barreto, M., Castillo, M., & Retamal, P. (2016). Salmonella enterica: una revisión de la triología agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Revista Chilena Infectol, 547-557.
- Bäumler, A., Tsolis, R., Ficht, T., & Adams, L. (1998). Evolution of host adaptation in Salmonella enterica. Infect. Immun.
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2012). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano. Elsevier, 492-499.
- Betancor, L., & Yim, L. (Septiembre de 2012). Departamentp de Bacteriología y Virología. Obtenido de Departamentp de Bacteriología y Virología: [http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella\\_y\\_salmonelosis.pdf](http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella_y_salmonelosis.pdf)
- Bhowmick, P., Deveguda, D., Ruwandepika, Iddya, K., & Indrani, K. (2011). Presence of Salmonella pathogenicity island 2 genes in seafood-associated Salmonella serovars and the role of the sseC gene in survival of Salmonella enterica serovar weltrevreden in epithelial cells. Microbiology, 160-168.
- Blanc-Potard, A.-B., Solomon, F., Jayson, K., & Eduardo, G. (1998). The SPI-3 Pathogenicity Island of Salmonella enterica. Journal of Bacteriology, 998-1004.
- Bou, G. (2014). Relación entre resistencia y virulencia en bacterias de interés clínico. Elsevier, 1-3.
- Burkinshaw, B., & Strynadka, N. (2014). Assembly and structure of the T3SS. Elsevier, 1649-1663.

- Cardona, N., & Miryan, S. (2003). Mecanismos de interacción de Salmonella con la mucosa intestinal. *Asociación Colombiana de Infectología*, 22-29.
- Carla, C. (2017). Sensibilidad antimicrobiana en cepas de Salmonella sp. de importancia en salud pública. Lima: Universidad Ricardo Palma.
- Cruz, C. (2017). Sensibilidad antimicrobiana en cepas de Salmonella sp. de importancia en salud pública. Lima: Universidad Ricardo Palma.
- Dawoud, T. (2015). Phenotypic and functional genomics analyses of salmonella for food safety applications. Arkansas: University of Arkansas.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Shea, J., Gleeson, C., Holden, D., & Hensel, M. (1998). Mutations in Salmonella Pathogenicity Island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. *Journal of Bacteriology*, 4775-4780.
- Demonios, L. c. (29 de Octubre de 2009). Islas genómicas y evolución bacteriana. Obtenido de La ciencia y sus Demonios: <https://lacienciaysusdemonios.com/2009/10/29/islas-genomicas-y-evolucion-bacteriana/>
- Elena, L. (2007). Mutación y Recombinación en cepas naturales de Eschechia coli y efecto de los antibióticos sobre recombinación. Madrid: Universidad Autonoma de Madrid.
- Enfermedades, C. p. (27 de Diciembre de 2011). Centro pra el Control y Prevención de Enfermedades. Obtenido de Centro pra el Control y Prevención de Enfermedades: <https://www.cdc.gov/spanish/Datos/BrotosEnfermedades/>
- Enfermedades, C. p. (2015). La resistencia a los antibióticos y la seguridad de los alimentos. CDC.
- Enfermedades, C. p., Zoonóticas, C. N., & Disión de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, e. A. (28 de Octubre de 2016). CDC. Obtenido de CDC: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/antibiotic-resistance.html>
- Férrnandez, S., Alonso, G., & Toro, E. (2004). Estructura de mosaico del cromosoma bacteriano: Islas patogénicas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 20-31.
- Figueroa, I., & Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 25-42.
- Figueroa, I., & Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 25-42.
- Ganesan, V., Harish, B., Menezes, G., & Parija, S. (Journal of Clinical and Diagnostic). Detection of Salmonella in Blood by PCR using iroB gene. 2014, 1-3.

- García, J., Paniagua, J., Pelallo, R., Isibasi, A., & Kúmate, J. (1992). Factores de Virulencia de Salmonella Typhi en relación al desarrollo de nuevas vacunas. Salud Pública de México.
- Gerlach, R., Jäckel, D., Geymeier, N., & Hensel, M. (2007). Salmonella Pathogenicity Island 4-Mediated Adhesion Is Coregulated with Invasion Genes in Salmonella enterica. *Infection and Immunity*, 4697-4709.
- Gómez, A. B. (2019). Análisis de la resistencia a estrés y virulencia de los genotipos ST19 Y ST213 de Salmonella enterica. Morelia: Tesis de doctorado.
- Granda, R. (2015). Tipificación molecular de aislamientos de Salmonella enterica serotipo Derby obtenidos de muestras clínicas y de alimentos en el Principio de Asturias durante los años 2013-2014. Comparación con los años anteriores. Oviedo : Universidad de Oviedo.
- Güerri, M. (2002). Estudio de la resistencia a antibióticos (Beta)-Lactemicos en aislamientos clínicos de Salmonella typhimurium. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Gutiérrez, L., Montiel, E., Aguilera, P., & González, M. (2000). Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. *Salud Publica de México*, 490-495.
- Hamdan, A., Sainz, T., & Bustos, J. (2015). Islas de patogenicidad en bacterias. UNiversidad Autonoma Metropolitana.
- Herrero, A., Rodicio, M., González, M., & Mendoza, M. (2005). Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39-45.
- Huehn, S., La Ragione, R., Anjum, M., Saunders, M., Woodward, M., Bunge, C., . . . Malorny, B. (2010). Virulotyping and antimicrobial resistance typing of Salmonella enterica serovars relevant to human health in Europe. NCBI, 10.1089 / fpd.2009.0447.
- Huehn, S., La Ragione, R., Anjum, M., Saunders, M., Woodward, M., Bunge, C., . . . Malorny, B. (2010). Virulotyping y tipificación de resistencia antimicrobiana de serovars de Salmonella enterica relevantes para la salud humana en Europa. NCBI, 10.1089 / fpd.2009.0447.
- Ismail, O., & Lin, K. (2013). Comparative Virulotyping of Salmonellatyphi and Salmonellaenteritidis. *Indian J Microbiol*, 410–417.
- Juhas, M., Roelof, J., Gaillard, M., Harding, R., Hood, D., & Crook, D. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *Microbiology*, 376-393.

- Junod, T., López, J., & Gädicke. (2013). Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella enterica en muestras de origen animal y alimentario. *Revista Medica Chilena*, 298-304.
- Junod, T., López-Martin, J., & Gädicke, P. (2013). Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella enterica en muestras de origen animal y alimentario. *Revista Medica Chilena*, 298-304.
- Jurado, R., Arenas, C., Doblaz, A., Rivera, A., & Torre, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Unidad de gestión clínica de enfermedades infecciosas*, 3497-3501.
- Liaquat, S., Ali, A., Sarwar, Y., & Haque, A. (2018). Virulotyping of Salmonella enterica serovar Typhi isolates from Pakistan: Absence of complete SPI-10 in Vi negative isolates. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, e0006839.
- Liaquat, S., Sarwar, Y. S., Ali, A., Haque, A., Muhammad, F., Martínez, I., . . . Bikandi, J. (2018). Virulotyping de aislamientos de Salmonella enterica serovar Typhi de Pakistán: Ausencia de SPI-10 completo en aislamientos Vi negativos. *NCBI*, e0006839.
- Liaquat, S., Sarwar, Y., Ali, A., Haque, A., Farooq, M., Ilargí, M., . . . Bikandi, J. (2018). Virulotyping de aislamientos de Salmonella enterica serovar Typhi de Pakistán: Ausencia de SPI-10 completo en aislamientos Vi negativos. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006839>.
- Luna, G. (1991). *Muanual Operativo de Análisis Microbiológicas Para Alimentos*. Bogotá: Fundación Uviversidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Maldonado, L. (2015). *Perfiles de virulencia de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán*. Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Marín, E. (2017). *Fiebre tifoidea y factores de virulencia de Salmonella enterica serotipo Typhi*. Madrid: Universidad complutiense.
- Martínez, N. (2007). *Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de Salmonella enterica*. Oviedo: Universidad de Oviedo.
- Miller, J. (1996). *Experiments in molecular Genetics*. Nueva Yort: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Miranda, L., Ruíz, M., Molina, J., Parra, I., Edgar, G., & Castro, N. (2017). RElación enter factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos fologenéticos de Escherichia coli uropatogena en dos localidades de México. *Elsevier*, 426-433.

- Miranda, L., Ruíz, M., Molina, J., Parra, I., González, E., & Castro, N. (2017). Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos México. Elsevier, 426-433.
- Morgan, E., Campbell, J., Rowe, S., Blspham, J., Stevens, M., Bowen, A., . . . Wallis, T. (2004). Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 994-1010.
- Narváez, E. G. (2011). Elementos Repetitivos para el análisis de Diversidad Genética de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de productos cárnicos y lácteos del Estado de Michoacán. Morelia: Tesis de maestría.
- Nghiem, M., Nguyen, V., Nguyen, T. T., Nguyen, T. D., & Bich Vo, T. T. (2017). Antimicrobial resistance gene expression associated with multidrug resistant *Salmonella* spp. isolated from retail meat in Hanoi; vietnam. *Microbiology*, 85-93.
- Oi, E., & Tanga, K. (2013). Virulotyping comparativo de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*. NCBI, 10.1007 / s12088-013-0407-y.
- Osman, K., Marouf, S., & Erfan, A. A. (2014). *Salmonella enterica* in imported and domestic day-old turkey poults in Egypt: repertoire of virulence genes and their antimicrobial resistance profiles. *Environmental Science y Technology*, 1017-1026.
- Osman, K., Maroufy, S., & Alatfeehy. (2013). Resistencia a los antimicrobianos y genes asociados a la virulencia de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotipos Mûenster, Florian, Omuna y Nova. Las cepas aisladas de humanas clínicamente diarreicas en Egipto. Resistencia microbiana a los medicamentos.
- Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2007). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ Córdoba , 187-200.
- Parra, M., Durango, J., & Salim, M. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. MVZ-Córdoba, 187-200.
- pathogenesis, R. o. (2012). Kaur, Jasmine; Jain, S.K. Elsevier, 199-210.
- Patiño, D. (2003). ¿por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? Dialnet, 48-56.
- Pérez, C., & Cardoz, S. (2014). Reportes de brotes y aislamientos de *Salmonella* spp. *Cultura Científica*, 74-83.
- Pérez, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 57-67.

- Pineda, I. D. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán. Morelia: Tesis de maestría.
- Pontes, M., Eun-Jin, L., & Groisman, E. (2025). *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. *Microbiology*, 5183-5188.
- Rubio, M., Delgado, E., Méndez, D., Braña, D., & Rodas, O. (2018). Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Scielo*, 371-377.
- Sabbagh, S., Lepage, L. C., McClelland, M., & France, D. (2012). Selection of *Salmonella enterica* Serovar Typhi genes involved during interaction with human macrophages by screening of a transposon mutant library. *Plos One*, e36643.
- Saldarriaga, O., & Rugeles, M. (2001). Genes y plásmidos de la *Salmonella* spp. asociados con virulencia. *Revista Colombiana de Ciencia Pecuarias*, 11-19.
- Salem, R., Abbassi, M., García, V., García, R., Fernández, J., Kilani, H., . . . Rodicio, M. (2017). Resistencia a los medicamentos antimicrobianos y propiedades genéticas de la *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis circulando en granjas avícolas en Túnez. *Elsevier*, 885-860.
- Salem, R., Mohamed, A., García, V., García, R., Fernandez, J., Hajer, K., . . . María, R. (2017). Antimicrobial drug resistance and genetic properties of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis circulating in chicken farms in Tunisia. *Elsevier*, 6.
- Salud, O. M. (2018). Alerta Epidemiológica *Salmonella enterica* serovar Typhi haplotipo H58. Sitio Web OMS.
- Salud, O. M. (Enero de 2018). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/features/qa/typhoid-fever/es/>
- Salud, O. M. (Febrero de 2018). Organización Mundial de la Salud. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Salud, S. d. (2014). Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad por causas sujetas a la vigilancia epidemiológica. Ciudad de México: Secretaría de Salud .
- Salud, S. d. (2017). Notificación semanal, casos nuevos de enfermedades 2017. México: Secretaría de Salud .
- Sánchez, M., Caraballo, A., Cardona, N., Bernal, C., Zapata, C., & Durango, h. (2004). Determinación del perfil de sensibilidad y resistencia a antibióticos seleccionados , en

- cepas de *Salmonella* spp. aislados en Antioquia durante los años 2002 y 2003. Biblioteca virtual en saúde, lil-459102.
- Silva, G., & López, H. (2011). Genes involved Pathogenesis, persistence, excretion of *Salmonella* in animal models. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 107-122.
- Soberanis, M. E. (2016). Caracterización metabólica y respuesta a estrés de cepas. Morelia: Tesis de Maestría.
- Toor, M., Sharma, S., Mir, A., Bansal, B., Uppal, S., & Gupta, D. (2017). Virulence gen profiling in *Salmonella* Typhimurium Isolated from fecal samples of domestic and wild animals. *Journal of Animal Research*, 1029-1034.
- Toro, M. (2013). Resistencia a beta-lactámicos y fluoroquinolonas en *Salmonella enterica*. Mecanismos moleculares y elementos de movilización genica. Logroño: Centro de Investigación Biomedica de La Roja.
- Toro, M., Seral, C., Rojo, B., Torres, C., Castillo, F. J., & Sàenz, Y. (2014). Resistencia a antibiòticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. Elsevier, 4-10.
- Toro, M., Seral, C., Rojo, B., Torres, C., Castillo, F. J., & Yolanda, S. (2014). Resistencia a antiòticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. Elsevier, 4-10.
- Uribe, C., & Suárez, M. C. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Medica*, 151-158.
- Velázquez, A. G. (2012). Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de. Morelia: Tesis de maestría.
- Velázquez, A. G. (s.f.). Resistencia a antibiòticos y presencia de integrones en aislados de *Salmonella enterica*. Morelia: Tesis de licenciatura.
- Vignoli, R., & Sejjia, V. (2006). Principales mecanismos de resistencia antibiòtica. En R. Vignoli, & V. Sejjia, *Temas de bacteriología y viruología* (págs. 649-662).
- Villaseñor, C. H. (2015). Búsqueda de genes sul, tet e integrones de clase 2 en cepas de salmonella enterica aisladas de alimentos del estado de michoacán. Morelia: Tesis de Licenciatura.
- Vladimir, P., & Huerta, A. (2014). Nanomáquinas biológicas: los sistemas de secreción bacterianos. *Mundo Nano*, 28-36.

- Xiujuan Zhou, L. X., Xu, X., Matthews, K., Liu, Y., Kuang, D., & Shi, X. (2018). Antimicrobial resistance, virulence genes and molecular subtypes of *S. Enteritidis* isolated from children in Shanghai. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 573-580.
- Yoshida, Y., Miki, T., One, S., Haneda, T., Ito, M., & Okada, N. (2014). Functional characterization of the type III secretion ATPase *ssaN* encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Plos One*, e94347.
- Yu, X.-J., Liu, M., Matthews, S., & Holden, D. (2011). Tandem translation generates a chaperone for the *Salmonella* type III secretion system protein *ssaQ*. *The Journal of Biological Chemistry*, 36098-36107.