



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR de *Salmonella enterica* MEDIANTE  
ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE) Y SU  
APLICACIÓN PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS  
ESPECÍFICOS**

**TESIS**

**Para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Presenta**

**BIÓL. GASPAR MORALES ROMERO**

**Asesor de Tesis:**

**Dr. Juan José Valdez Alarcón.**

**Co-asesor de Tesis:**

**Dr. Irvin Eduardo Jácome Galarza.**

**Morelia, Michoacán, Agosto de 2017.**



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
*Cuna de héroes, crisol de pensadores*

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de Enfermedades Infecciosas del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología y en el Laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, bajo la dirección del D.C. Juan José Valdez Alarcón y del D.C. Irvin Eduardo Jácome Galarza. Este trabajo contó con los recursos de la Coordinación de Investigación Científica-CIC (proyecto 14.7) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al proyecto "Control biológico de infecciones bacterianas utilizando bacteriófagos" del CONACYT-Fondos Mixtos del Estado de Michoacán con clave (MICH-2012-C05-196879). Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para estudios de Maestría en el año 2015 con el número 348259.

## AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mi familia, a mis papas (Don Gaspar y Doña Lupe), a mi hermana Lupita y a mis hermanos Pedro y Andrés por todo el apoyo que me han brindado.

Dedico y agradezco de todo corazón y con todo mi amor a mi dulce esposa Paulina Fabiola Rodríguez Flores (Mi Pollito), por su incondicional apoyo y toda su comprensión en todo este proceso. Además, por animarme para continuar con mis estudios y seguir adelante.

A Cesar Medina Rojas por haber ayudado en la experimentación de aislamiento de bacteriófagos.

Agradezco de antemano al D.C. Juan José Valdez Alarcón, por haberme apoyado en la realización de esta tesis como mi asesor y haberme dado esta oportunidad para desarrollar este trabajo. Le doy gracias por toda su confianza y sus conocimientos en estos años de trabajo.

También agradezco al D.C. Irvin Eduardo Jácome Galarza por haberme abierto las puertas para trabajar en su laboratorio y apoyarme en todo el proceso experimental de este trabajo en el Laboratorio Estatal de Salud Pública.

Agradezco al Biólogo Juan Luis Jaime Sánchez por su apoyo en todo este proceso y al haber brindado las cepas de *Salmonella*. También, al Departamento de Bacteriología y al Departamento de Alimentos del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán por haber proporcionado la información de los serotipos de *Salmonella enterica*.

También mi agradecimiento a la M.C. Aida Bejar Ubaldo, por su apoyo moral.

A todos aquellos que han estado en mi vida.

**Gaspar Morales-Romero.  
Morelia, Michoacán. Agosto 2017**

## RESUMEN.

*Salmonella enterica* es un agente infeccioso zoonótico de distribución universal causante de la Salmonelosis. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación, en el procesamiento de alimentos o en el hogar; también por vía sexual. Para poseer sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos, es necesario aplicar técnicas de biología molecular para la caracterización de *Salmonella enterica*. La técnica de análisis de macrorestricción del genoma en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) es empleada en la caracterización molecular del agente causal de la fiebre entérica y posee un índice de discriminación de Hunter D=0.96, superior a la serotipificación. En este trabajo se empleo la técnica de PFGE y se analizaron 52 aislados de *Salmonella*, las cuales se formaron 15 grupos en el dendograma que nos proporciono una similitud genética heterogénea. De estos grupos se seleccionaron cepas para el aislamiento de bacteriófagos específicos, en donde se aislaron dos bacteriófagos denominaron FPMICHS01 y FPMICHS02 que son fagos lisogénicos con propiedades líticas inestables.

Palabras Clave: salmonella,electroforesis,epidemiología,bacteriofagos,PFGE

## ABSTRACT.

*Salmonella enterica* is a zoonotic infectious agent of universal distribution causing Salmonellosis. It is transmitted by direct contact or cross-contamination during handling, food processing and by sex via. To possess epidemiological surveillance systems for foodborne diseases, it is necessary to apply molecular biology techniques for characterization of *S. enterica*. The technique of genome macrorestriction analysis in pulsed field gel (PFGE) is used in the molecular characterization of the causative agent of enteric fever and has a Hunter discrimination index ( $D = 0.96$ ), higher than Serotyping. In this work, the PFGE technique was used and 52 *Salmonella* isolates were analyzed, which formed 15 groups in the dendogram that gave a heterogeneous genetic similarity. From these groups strains were selected for isolation of specific bacteriophages, where two bacteriophages denominated FPMICHS01 and FPMICHS02 which are lysogenic phages with unstable lytic properties were isolated.

# ÍNDICE.

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>1</b>
1.1. Taxonomía del género <i>Salmonella</i> . .....	1
1.2. <i>Salmonella enterica</i> como un problema de salud pública. ....	2
1.3. Epidemiología molecular de <i>Salmonella enterica</i> . ....	3
1.4. <i>Salmonella</i> como género multirresistente a los antibióticos.....	6
1.5. Biología de bacteriófagos. ....	6
1.6. Aplicación de bacteriófagos. ....	7
1.7. Endolisinas de bacteriófagos. ....	8
1. 8. Justificación. ....	9
<b>II. HIPÓTESIS:</b> .....	<b>10</b>
<b>III. OBJETIVO GENERAL:</b> .....	<b>10</b>
<b>IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> .....	<b>10</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.</b> .....	<b>11</b>
5.1. Cepas bacterianas. ....	11
5.2. Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE). ....	11
5.3. Aislamientos de bacteriófagos de <i>Salmonella enterica</i> .....	13
<b>VI. RESULTADOS.</b> .....	<b>14</b>
6.1. Estandarización de la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP-MICHOACÁN).....	14
6.2. Evaluación de las condiciones definidas por PulseNet. ....	15
6.3. Efecto de la densidad celular en la PFGE. ....	16

6.4. Efecto de la Concentración Agarosa Bajo Punto de Fusión en la elaboración de los bloques y del amortiguador de lisis. ....	17
6.5. Verificación del protocolo estandarizado con diferentes serotipos de <i>Salmonella enterica</i> . ....	18
6.6. Patrones de los Serotipos de <i>Salmonella enterica</i> . ....	20
6.7. Aislamiento de bacteriófagos de serotipos de <i>Salmonella enterica</i> . ....	26
<b>VII. DISCUSIÓN</b> . ....	28
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> . ....	31
<b>IX. REFERENCIAS</b> . ....	31
<b>X. ANEXOS</b> . ....	319
10.1 Oficio de entrega del protocolo estandarizado de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados al Laboratorio Estatal de Salud Pública.....	39
10.2 Artículo Molecular characterization of pathogenic bacteria by pulsed field-gel electrophoresis (PFGE)/Caracterización molecular de bacterias patógenas mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). 1(2):48-56. Publicado en la revista Mexican Journal of Biotechnology, 2016.....	40

## I. INTRODUCCIÓN.

*Salmonella* es una de las principales causas de intoxicación alimentaria y fiebre tifoidea en todo el mundo y se encuentra entre los cuatro patógenos asociados con las enfermedades diarreicas. Los alimentos insalubres son la causa más común de estas enfermedades diarreicas y pueden ser graves en especial cuando afectan a los niños pequeños. *Salmonella* es una bacteria universal y resistente que puede sobrevivir durante varias semanas en un ambiente seco y varios meses en agua. También, son prevalentes en animales comestibles como las aves de corral, los porcinos y vacunos, y también en mascotas, como gatos, perros, pájaros y reptiles como las tortugas. La salmonelosis se caracteriza por la aparición de fiebre, dolor abdominal, diarrea, náusea y vómitos. Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre 12 a 36 horas después de la ingesta de *Salmonella*, y la enfermedad dura entre 2 y 7 días.

*Salmonella* es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, móvil mediante flagelos peritricos y con dimensiones de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de largo y 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro, produce ácido sulfhídrico y fermenta glucosa pero lactosa, es catalasa positiva y oxidasa negativo (Grimont & Weill, 2008).

### 1.1. Taxonomía del género *Salmonella*.

El género *Salmonella* es miembro de la familia Enterobacteriaceae. Los miembros de esta familia también son conocidos como coliformes. Este género comprende tres especies, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* y una nueva especie descrita como *Salmonella subterranea*. *Salmonella enterica*, se divide en seis subespecies: (I) *S. enterica* subsp. *enterica*, (II) *S. entérica* subsp. *salamae*, (IIIa) *S. enterica* subsp. *arizonae*, (IIIb) *S. entérica* subsp. *diarizonae*, (IV) *S. enterica* subsp. *houtenae* y (VI) *S. subsp. entérica indica*; la especie *S. bongori* posee solamente una subespecie (V) *S. bongori* subsp. *bongori* y la recientemente especie descrita como *Salmonella subterranea*, que se aisló de sedimentos de la

subsuperficie contaminada con uranio y nitratos, la cual es considerada para la biorremediación de suelos contaminados con Uranio-VI (Achtman et al., 2012; Shelobolina et al, 2004).

## **1.2. *Salmonella enterica* como un problema de salud pública.**

Las enfermedades transmitidas por los alimentos por *Salmonella enterica* No-Tifoidales (*Salmonella*-NT), son las causantes de las frecuentes enfermedades gastrointestinales en la salud humana, provocando un impacto negativo en la economía y en los sistemas de salud pública de los países en desarrollo. Por ello, en el año 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS) presentó el estimado de censo global de enfermedades transmitidas por los alimentos, que resultó en 78 707 591 casos y 59 153 muertes por *Salmonella*-NT en alimentos alrededor del mundo. En México, desde el año 2010, se posee un estimado de 581 514 casos de salmonelosis causadas por *Salmonella*-NT en el país. De los cuales, los más afectados son los niños de 0-5 años y adultos mayores de 60 años, esto debido a su inmuno-comprometido sistema inmunológico (CDC, 2015; WHO, 2015).

Así, los serotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* han sido categorizados de acuerdo en el síndrome de la enfermedad en Tifoidales (Fiebre Tifoidea-Paratifoidea; *Salmonella T*) y No Tifoidales (Salmonelosis-Gastroentérica; *Salmonella* NT). La fiebre tifoidea y paratifoidea son distinguidas por su prolongada sintomatología; mientras la gastroentérica es diferenciada por la diarrea y una infección extraintestinal aguda, estas infecciones son capaces de producir enfermedades invasivas en diferentes órganos. De este modo, *S. enterica* se considera como un problema de salud pública en el mundo por generar enfermedades infecciosas transmitidas por los alimentos y además de poseer una amplia gama de huéspedes que puede causar diversas enfermedades entre humanos y animales, como diarrea que puede contener sangre o moco y en los animales enfermos presentan un cansancio excesivo y pueden vomitar o tener fiebre; esto generando grandes pérdidas económicas por los tratamiento

médicos(Achtman et al., 2012; Atterbury et al., 2007; Hernandez et al., 2016; Ngoi et al, 2015).

En los estudios de caracterización de microorganismos se han utilizado herramientas que se enfocan en las características fenotípicas, como la serotipificación, que es aplicada en numerosos estudios epidemiológicos y que utiliza los antígenos que se expresan en la pared externa, que incluyen proteínas somáticas (O) bacterianas, flagelares (H) y capsulares (Vi). La serotipificación hace el uso de reacciones de aglutinación con antisueros específicos para los antígenos (factores antigénicos somáticos) dentro de cualquier lipopolisacárido (Antígeno O; codificada por el gen *rfb*) o uno de los dos antígenos flagelares alternos (fases 1 y 2 del antígeno H, codificada por *fliC* y *fljB*); que aparecen en la superficie de la célula bacteriana, de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White. La serotipificación a pesar de su amplio uso, tiene una serie de desventajas: es lento, laborioso y puede ser impreciso. También requiere el mantenimiento y control de calidad de cientos de sueros y antígenos específicos.. Hasta la fecha con la serotipificación, se han descrito más de 2500 serotipos de *Salmonella*, de los cuales se encuentran divididos en más 1500 serotipos dentro de *S. enterica* subespecie *enterica* y los demás 1000 serotipos en las otras subespecies de *S. enterica* y *Salmonella bongori*, también los nombres particulares de los serotipos denotan síndromes o la especificidad del huésped en el que fueron aislados (Wattiau et al, 2011; INDRE 1994).

### **1.3. Epidemiología molecular de *Salmonella enterica*.**

Las investigaciones epidemiológicas han avanzado en las últimas dos décadas con las numerosas herramientas de la biología molecular; esto representa un avance revolucionario en los conocimientos y conceptos en la epidemiología molecular, ya que los sistemas de caracterización molecular permiten reconocer características genéticas de las poblaciones bacterianas que no son reveladas por las técnicas de laboratorio convencionales que se limitan a la identificación de la especie y/o el serotipo (Riley, 2004; Levin, 1999).

Un amplio número de métodos y técnicas de caracterización molecular han sido descritas y empleadas para la diferenciación de bacterias patógenas, y la aplicación de estos métodos moleculares generan una eficiencia en el diagnóstico y caracterización de bacterias patógenas. Por lo tanto, es necesario generar y aplicar métodos de caracterización a nivel molecular, lo cual permitirá la asociación de genotipos específicos a los brotes infecciosos de *S. enterica*. De las muchas técnicas que han sido aceptadas para la identificación y caracterización de *S. enterica*, son el análisis de restricción del genoma en electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), el análisis de secuencias de *loci* múltiple (MLST) y el análisis de *loci* múltiple de número variable de repetidos en tándem [MLVA] (Capparelli et al., 2010; Gebru et al., 2010; Johnson et al., 2010). En la Tabla 1, se muestra una comparación de las técnicas de caracterización molecular más comúnmente usadas en *Salmonella* spp.

Método	Objetivo	Poder discriminatorio	Índice de Discriminación Hunter ( <i>D</i> ).	Referencias
<b>Perfil Plasmídico</b>	Plásmido extra-cromosomal	Bajo	0.652	Pang et al., 2005
<b>PCR Ribo-tipificación</b>	Región intergénica 16S-23S ARNr	Medio	0.820	Hyeon et al., 2013
<b>PFGE</b>	Genoma completo, restricción enzimática.	Alto	0.948	Bergamini et al. 2011.
<b>MLST</b>	Siete genes de mantenimiento o metabolismo primario	Medio	0.905	Liu et al., 2001
<b>MLVA</b>	Genoma completo, tandem repetidos	Alto	0.960	Ross et al., 2008

**Tabla 1. Métodos moleculares comúnmente utilizados en la caracterización de bacterias.**

En cuanto a las estrategias basadas en el análisis de la estructura del genoma, la secuenciación del genoma y el análisis de restricción del genoma mediante electroforesis de campos pulsados (PFGE) son las de mayor poder de discriminación y alta reproducibilidad entre aislados, debido a que pueden identificar y determinar los diferentes serotipos de *Salmonella*. La secuenciación del genoma por su costo no puede ser utilizada en estudios epidemiológicos amplios, por lo que PFGE se considera como la técnica estándar de oro por poseer una alta reproducibilidad, un alto poder discriminatorio y es una excelente

herramienta para analizar brotes y eventos de transmisión de cepas (Ribot et al., 2006; Enright et al., 2000). Además, el PFGE requiere de un protocolo básico universal aplicable a todos los microorganismos de interés y que varía en detalles de acuerdo a la composición de la pared celular y el contenido de guaninas-citosinas en el genoma, variando solamente los detalles de la lisis bacteriana y la selección de la enzima de restricción. De este modo, la caracterización molecular de bacterias patógenas por electroforesis en gel de campos pulsados nos permitirá realizar estudios de vigilancia epidemiológica y obtener información relevante de las cepas predominantes en brotes infecciosos en el Estado de Michoacán. Por lo anterior, en este trabajo se realizó la caracterización molecular de cepas multi-resistentes de *S. entérica*, mediante PFGE. De acuerdo con los serotipos más estudiados de *S. enterica*, es muy importante una adecuada evaluación de estas cepas por la serotipificación, ya que esto nos permitirá aislar los fagos específicos, pero al mismo tiempo, algunos serotipos pueden poseer idénticos epítopes de lipo-polisacárido membranal y ser cepas genéticamente diferentes. La caracterización genética por PFGE permite la diferenciación completa de la diversidad genética de los serotipos de *S. enterica* con mayor precisión y mayor velocidad, determinando su relación genética. Por tal motivo, el PFGE se puede utilizar para proporcionar una rápida visión general de la estructura genética de la población de *S. enterica* en el estado de Michoacán y constituirse en una herramienta útil para la vigilancia epidemiológica (Achtman et al., 2012; Atterbury et al., 2007; Jassim & Limoges, 2014; Sulakvelidze, 2011). Esto permitirá la identificación de genotipos particulares de *Salmonella* los cuales serán relevantes para la comparación de la base de datos que establece y gestiona PulseNet International del Centro de Control y Prevención de Enfermedades [CDC, USA] (Birren & Lai, 1993; Ribot et al., 2006; Valdez-Alarcón et al, 2015).

#### **1.4. *Salmonella* como género multirresistente a los antibióticos.**

Desde el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos en la década de 1940s, éste ha sido el principal logro de la medicina para reducir las enfermedades infecciosas. Sin embargo, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para resistir los efectos de los antimicrobianos, como pueden ser la degradación enzimática de algunos agentes antimicrobianos, el bloqueo de la permeabilidad celular a los antibióticos, activación de bombas de flujo de antimicrobianos, y esto debido a la evolución de su genoma que está bajo continúa modificación y presión selectiva del ambiente. Recientemente la reemergencia de bacterias multirresistentes a antibióticos de *Salmonella* ha incrementado en los últimos años y las cepas del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, que han sido analizados poseen resistencia a antibióticos en un porcentaje del 95% y 98 % de amicacina y gentamicina, respectivamente. Esto ha generado la preocupación por el incremento en el fracaso de los tratamientos médicos (en algunos casos muerte), y el aumento de la gravedad de las infecciones (Ngoi et al., 2015; Karchmer, 2006). Por ello, el mayor inconveniente es la incapacidad de desarrollar nuevos antibióticos frente a bacterias resistentes, y la búsqueda de nuevos fármacos se está convirtiendo en una creciente preocupación debido a que el descubrimiento de nuevos antibióticos están fallando contra estas súper-bacterias. Por eso, ha surgido un gran interés o la necesidad para investigar una alternativa a antibióticos y agentes antimicrobianos naturales (Jassim et al., 2014; Karchmer, 2006; Rubin & Samore, 2002)

#### **1.5. Biología de bacteriófagos.**

Los bacteriófagos o fagos son virus bacterianos, que no pueden crecer o replicarse excepto en una célula bacteriana; estos virus se pueden presentar en dos fases de ciclos de vida: el ciclo lítico y el ciclo lisogénico. En el caso de fagos líticos, estos interrumpen el metabolismo bacteriano, transformando a la célula bacteriana en una fábrica que produce una numerosa progenie viral, que posteriormente causa la lisis bacteriana. Un fago en el ciclo lisogénico a menudo

se sintetiza una enzima de integración (integrasa), y enzima represora de la transcripción viral, y el ADN viral se inserta en el cromosoma bacteriano. En este caso la bacteria sigue creciendo y multiplicándose llevando integrado en su genoma una copia del ADN viral. Los genes de los fagos se replican como parte del cromosoma bacteriano, mientras que el ADN viral integrado se denomina un profago. Sin embargo, la presencia de genomas relacionados con fagos inactivos (genes lisógenos) en las cepas bacterianas son capaces de ser reactivados o pueden recombinarse y convertirse en fagos líticos (Jassim & Limoges, 2014; Moreno Switt et al., 2013).

### **1.6. Aplicación de bacteriófagos.**

La aplicación de los fagos se ha investigado ampliamente contra las bacterias resistentes a los antibióticos, debido a que son las entidades más abundantes en el mundo y pueden ser usados contra las bacterias. De este modo, los fagos líticos pueden sustituir a los antibióticos, ya que tienen una notable actividad antimicrobiana. Por tal motivo, la terapia con fagos es considerada como una estrategia de biocontrol eficiente en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos, debido a que los bacteriófagos presentan especificidad, destrucción bacteriana rápida y la capacidad de auto-replicarse. Se han desarrollado cócteles de bacteriófagos que reducen eficazmente la contaminación natural de *Salmonella* en aves de corral (pollos) y alimentos como la carne de puerco, el pollo, las frutas y las verduras (Birren & Lai, 1993; Moreno Switt et al., 2013; Sulakvelidze, 2011). De los estudios de aislamiento y aplicación de bacteriófagos para el biocontrol de *Salmonella* en alimentos y en animales hasta ahora se han demostrado con 41 bacteriófagos. En un estudio realizado en cerdos con el fago lítico (Felix-O1), éste fue probado como un posible candidato para terapia, por controlar y reducir la carga bacteriana *Salmonella* Typhimurium en la piel de los cerdos. Un estudio diferente con alimentos listos para consumo fueron contaminados con *Salmonella* Enteritidis, luego tratados y almacenados con el fago F01-E2 a 8°C por durante 6 días. En el análisis no se detectó ningún huésped

bacteriano, ni toxinas, ni factores de virulencia, lo que determina que el tratamiento con fagos reduce la contaminación de los alimentos listos para comer durante el almacenamiento e incluso a bajas temperaturas. Después, otro estudio para mejorar la actividad de lisis del huésped, se analizaron cócteles de fagos contra alimentos contaminados de *Salmonella* Enteritidis, y el tratamiento con el cóctel de fagos exhibió un efecto más efectivo en la lisis *S. Enteritidis*, que el tratamiento con un solo fago (Bai et al, 2016; Borie et al, 2014; Gerstmans et al, 2016; Schmelcher et al, 2016).

### **1.7. Endolisinas de bacteriófagos.**

Después de la infección, replicación y propagación del fago en la célula huésped, los fagos ensamblados son liberados por la ruptura de la pared celular, esta actividad específica para hidrolizar el peptidoglicano es codificada por la endolisina y la holina que juegan un papel importante en la liberación de los fagos. No solamente se ha resaltado el estudio de los fagos para el biocontrol de *Salmonella*, en los últimos años también se ha sugerido a las endolisinas o lisinas como un nuevo agente de biocontrol. Estas endolisinas fágicas son el resultado de millones de años de evolución entre el hospedero y su huésped. Las endolisinas presentan diferentes dominios modulares relacionados a las diferencias que existen en la arquitectura de la membrana celular entre los principales grupos bacterianos. Las endolisinas presentan arreglos modulares; poseen dos dominios de proteínas conservadas, un dominio con actividad enzimática (EAD, por las siglas en ingles) como pueden ser la lisozima, glicosidasas, endolisinas, etc., y otro dominio de reconcomiendo al sustrato o de unión a pared celular (CDB). Los estudios relacionados con la aplicación y reducción de patógenos utilizando endolisinas han sido escasos y enfocados a bacterias resistente a antibióticos como *Staphylococcus aureus* (Roach & Donovan, 2015; Schmelcher, Donovan, & Loessner, 2012; Yang, Yu, & Wei, 2014). La endolisina LysH5 del fago vB\_SauS-philPLA88, es activo contra una amplia gama de cepas de estafilococos y biopelículas estafilocócicos. También, se desarrollo una endolisina quimérica

denominada  $\lambda$ SA2-E-Lyso-SH3b, de los fagos estreptocócico  $\lambda$ SA2-SH3b y del dominio de unión a pared celular del fago estafilocócico LysK, al que se fusionó también el sitio activo de la lisozima y que es activo en las glándulas mamarias de los bovinos contra cepas de estafilococos que causan mastitis. Otra endolisina, desarrollada es el Artilynsins, esta es una fusión de un péptido antimicrobiano del tejido mieloide de oveja y las endolisinas OBPgp279 del fago OBP de *Pseudomonas* y la endolisina PVP-SE1gp146 del fago PVP-SE1 de *Salmonella* Enteritidis, y posee una alta actividad contra bacterias Gram-Negativas y contra bacterias Gram-positivas como *Mycobacterium* y *Staphylococcus* comprobada hasta ahora (Callewaert et al, 2011; Gerstmans et al., 2016; Roach & Donovan, 2015; Schmelcher & Loessner, 2016).

## **1. 8. Justificación.**

El uso inadecuado de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en humanos y animales, tiene como resultado la selección de bacterias resistentes a múltiples antibióticos; lo que ha generado la necesidad de una alternativa a su uso. El control biológico por bacteriófagos representa la alternativa apropiada contra la multi-resistencia a medicamentos por *Salmonella enterica*, ya que estos pueden ser específicos de especie o genotipo, no afectan la salud, su abundancia se modula naturalmente por la densidad celular del hospedero, En el estado Michoacán no se han generado estudios de vigilancia epidemiológica a nivel de biología molecular. Este trabajo pretende realizar la caracterización molecular de cepas multi-resistentes de *Salmonella enterica*, mediante la técnica de PFGE e identificar cepas particulares o genotipos particulares, los cuales serán utilizados para la búsqueda de bacteriófagos. Además, se pueden identificar más de un bacteriófago para cada especie o genotipo con relevancia epidemiológica(Jassim et al, 2014; Valdez-Alarcón et al., 2015).

## **II. HIPÓTESIS:**

Las colecciones de aislados de *Salmonella enterica* presentan genotipos diversos que pueden ser determinados por PFGE; los diversos genotipos pueden ser utilizados para el aislamiento de bacteriófagos específicos.

## **III. OBJETIVO GENERAL:**

Realizar la caracterización genética de cepas de *Salmonella enterica* mediante Electroforesis en Gel de Campos Pulsado (PFGE) y su aplicación en el aislamiento de bacteriófagos específicos contra genotipos epidemiológicamente relevantes de *S. enterica* del estado de Michoacán.

## **IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Estandarizar la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) en el equipo CHEF Mapper XR, en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP-MICHOACÁN) para la genotipificación de aislados de *Salmonella enterica*.

Caracterizar genéticamente colecciones de aislados bacterianos de *Salmonella enterica* del LESP mediante Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE).

Seleccionar colecciones de bacteriófagos contra los genotipos identificados de los aislados bacterianos de *Salmonella enterica*.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.1. Cepas bacterianas.**

Los aislados de *Salmonella enterica*, fueron proporcionados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Michoacán, que posee una colección de aproximadamente 55 aislados obtenidos a partir de muestras de alimentos y casos clínicos entre los años 2014-2016, las cuales fueron serotipificados por el esquema de Kauffmann-White en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). Dichos aislados fueron obtenidos siguiendo el procedimiento de la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de los Estados Unidos de América (Goering, 2010; Kidgell et al., 2002; Nutrition, 2013).

### **5.2. Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE).**

El análisis del polimorfismo en los patrones de macro-restricción de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE), se realizó con la metodología estandarizada del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) bajo la iniciativa de PulseNet, que pretende promover la adopción de PFGE como una herramienta universal de vigilancia epidemiológica. El análisis de PFGE se realizó con algunas modificaciones de nuestro laboratorio. Las cepas de *Salmonella* spp. se cultivaron en 5 ml de medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI), y se incubaron por 18 horas a 37°C. La suspensión bacteriana se ajustó con el tubo número 3 del nefelómetro de McFarland o con la Absorbencia a un valor de 0.5-0.55 a una longitud de onda de 610 nm. Se tomaron las cantidades en microlitros de cultivo a utilizar (ej. 350 µl) y se depositaron en un tubo de micro-centrífuga de 1.5 mL. Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm, por 5 min, el sobrenadante se decantó; se realizaron dos lavados con amortiguador PIV (Tris 10 mM, NaCl 1M), y la pastilla bacteriana se re-suspendió en 80 µL de amortiguador PIV. Posteriormente se preparó la agarosa de bajo punto de fusión (LMPA, Sigma) al 3% en amortiguador TE<sub>10/1</sub> (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y 1% de dodecil-sulfato sódico (SDS, Sigma), se disolvió en

horno de microondas, dando pequeños pulsos de 10 segundos inicialmente y finales de 5 segundos hasta que esté completamente fundida. En los tubos de micro-centrífuga de 1.5 ml con 80 µl de pastilla bacteriana en amortiguador PIV, se agregó 100 µl de la suspensión de agarosa y 20 µl de Proteinasa K (Roche; 20 mg/ml), se mezcló suavemente con la micro-pipeta, procurando no generar burbujas. Los moldes para los bloques fueron desinfectados previamente con etanol al 70%. Se tomó una alícuota del tubo que contiene la mezcla (agarosa; proteinasa K; suspensión bacteriana) inmediatamente después de haberla terminado de homogenizar, y se llenaron las celdas del molde completamente. Se dejó gelificar a temperatura ambiente 10-15 minutos o en refrigeración a 4°C por 5 minutos. Los bloques fueron removidos del molde y depositados en tubos de micro-centrífuga de 1.5 mL con 500 µl de amortiguador de lisis celular (Tris 50 mM, EDTA 50 mM [pH 8.0]; 1% N- Lauroil sarcosinato de sodio [Sigma]) y 25 µL de Proteinasa K (Roche; 20 mg/ml), a 50°C por 5 horas. Los bloques son lavados con amortiguador TE<sub>10/1</sub> (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) por 15 minutos a 50°C; este lavado se repitió 5 veces. Para la técnica de PFGE con *Salmonella sp.* Se utilizó la enzima *Xba*I, con las siguientes cantidades: 175 µl de agua destilada estéril, 20 µl de amortiguador de restricción 10 X (Promega); y 5 µl de enzima *Xba*I (Promega), por cada tubo y se incubaron las muestras a 37°C/300rpm por 12 horas. Los bloques fueron cargados dentro de un gel de agarosa de electro endósmosis baja para PFGE al 1 % y la corrida se realizó en 3 litros de amortiguador TBE (Tris 0.089 mM, Ácido Bórico 0.089 mM, EDTA 2 mM). La PFGE fue realizada en el modo Auto-Algoritmo característico en el Sistema CHEF Mapper (Bio-Rad) con un rango de resolución de los fragmentos de restricción de 30-700 kb. La condiciones finales de electroforesis fueron las siguientes: el pulso de tiempo inicial de 2.16 segundos, y el pulso de tiempo final de 63.8 segundos a un gradiente de 6 V / cm y un ángulo de 120 ° incluido, por 20 horas de corrida. La cepa estándar universal de PulseNet-CDC, *Salmonella enterica* subsp, *enterica* serovar Braenderup H9812 (ATCC/BAA-664), se utilizó como marcador de referencia de tamaño molecular. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL, Sigma) durante 30 a 45 minutos y se registró en el sistema

de fotodocumentación Gel Doc XR+ System (Bio-Rad). El dendograma de similitud se elaboró con los software libres PyElph y GelJ (Heras et al., 2015; CDC PFGEil, 2013; Nutrition FDA, 2013; Pavel & Vasile, 2012; Ribot et al., 2006).

### **5.3. Aislamientos de bacteriófagos de *Salmonella enterica*.**

Para el aislamiento de bacteriófagos a *Salmonella*, fueron colectadas cinco muestras en la zona limítrofe de la Facultad de Medicina Veterinaria (Posta Veterinaria). Dos de las muestras fueron colectadas de la superficie de un canal de agua residual; una muestra fue colectada de excremento de pollo en la granja de aves y resuspendida en amortiguador SM (Tris-HCl 100 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 8 mM); otra muestra fue colectada de excremento de vacas en la granja de bovinos y resuspendida en amortiguador SM, y una última muestra de agua estancada en un campo de futbol. Estas muestras fueron colectadas en los meses de verano e invierno. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas dos veces a 10,000 rpm por 10 minutos, luego filtradas a través de un filtro de 0,2 µm. Posteriormente, se incubó durante una noche a 37°C, una combinación de 1mL de *Salmonella* y 1 ml del filtrado de la muestra, en 30 mL de medio liquido de soya Trypticaseína, adicionado con 5 ml de amortiguador SM y 20 µL de cloroformo. Luego, el crecimiento de toda la noche, se centrifugó y el sobrenadante se filtró a través de una membrana millipore GSWP 02500 de 0,2 µm. Este posible lisado de fagos del filtrado fue almacenado a 4°C. Posterior, el título de fago se determinó mediante la técnica de agar doble capa utilizando agar 2xYT (0.7% de agar). Luego, 100 µl de un cultivo de toda la noche, se mezcló con 10 ml de agar 2xYT y se vertió en la primera capa de agar, esto para realizar el tapete bacteriano de la doble capa. Luego, una alícuota de 20 µL de la muestra del filtrado del fago fue agregado en el agar doble capa y la incubación fue por un periodo de 24-48 horas. Para incrementar el título del fago se recuperaron las zonas de lisis confluentes o zonas líticas de la doble capa y se incubaron nuevamente con una combinación de 1mL de *Salmonella*, en 30 mL de medio

líquido de soya Tripticaseína, adicionado con 5 ml de amortiguador SM y 20 µL de cloroformo. Finalmente, se volvió a centrifugar y el sobrenadante se filtró a través de 0,2 µm y los fagos fueron almacenado a 4°C (Filho et al., 2007; Higgins et al., 2005; Valdez-Alarcón et al., 2015).

## **VI. RESULTADOS.**

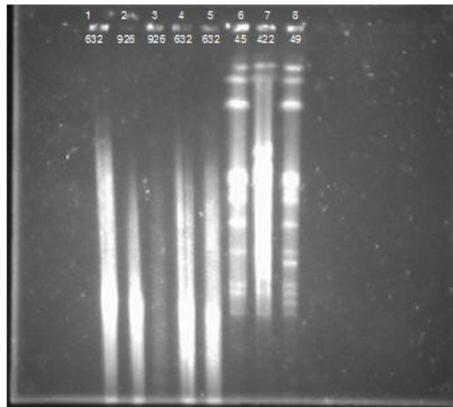
El resultado de los primeros patrones de bandas que se obtuvieron por la macro-restricción de *Xba* I de los aislamientos de *S. enterica* mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), fueron poco visibles, con bandas muy tenues y presencia de barridos de ADN. El protocolo de la CDC, se encuentra diseñado para un análisis rápido y continuo, propio para vigilancia epidemiológica de rutina y por ello las imágenes de la macro-restricción no tienen la calidad similar a la de los trabajos de investigación. Por este motivo, se realizaron modificaciones en el protocolo inicial del PFGE establecido por la CDC, con la finalidad de intensificar la señal de las bandas y poder realizar análisis de similitud confiables de los patrones de restricción (Ribot et al., 2006).

### **6.1. Estandarización de la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP-MICHOACÁN).**

En esta etapa se realizaron modificaciones en los parámetros de corrida (densidad celular, amortiguador de suspensión celular) y en la preparación de los bloques (concentración de agarosa) del protocolo estandarizado de la CDC. Con el fin de elaborar geles con una buena resolución en los patrones de bandas, ya que el resultado de las primeras imágenes generadas ha sido poco visible, y así elaborar geles con alta resolución en los patrones de bandas y evitar degradación del ADN que afecten el análisis de patrones de bandas conforme al protocolo establecido por la CDC.

## 6.2. Evaluación de las condiciones definidas por PulseNet.

En la Figura 1, el gel de PFGE se elaboró conforme al protocolo estandarizado de la CDC, con mínimas modificaciones (concentración de agarosa de 1% al 3 % por la fragilidad de los bloques), en donde se utilizaron seis cepas de *Salmonella enterica*. En los primeros cinco carriles se observa un barrido del ADN degradado, mientras que en los tres siguientes se observan patrones de restricción genómica.

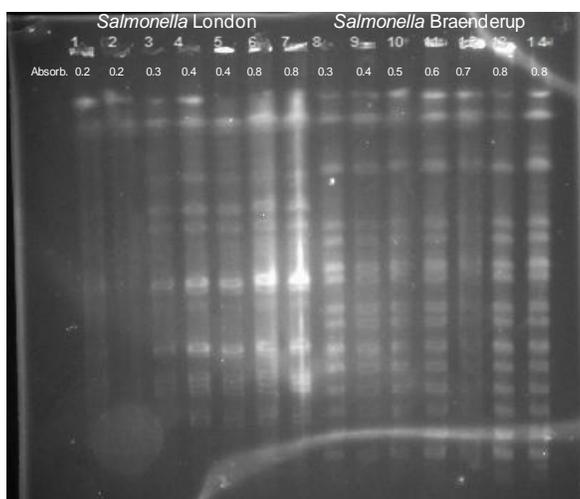


**Figura 1. Evaluación de las condiciones de PFGE.** Los pulsotipos (1-4-5) representan al aislado 632 y pulsotipo (2-3) al aislado 926 de la colección de *Salmonella enterica*, en donde se observan bandas degradadas; los pulsotipos (6-7-8) representan a los aislados 45-422-49 de *Salmonella enterica*, en donde se observan patrones de restricción con bandas visibles.

La Figura 1 representa los diferentes problemas iniciales de este proceso de estandarización, en donde se observan los pulsotipos con degradación o un barrido en gel, el cual pudo haber sido afectado por el exceso ADN (exceso de densidad celular bacteriana inicial), y con una baja resolución en las bandas, debido a que co-migran con el ADN un exceso de desechos celulares o impurezas en los bloques de lisis. En este gel se modificó la concentración de la agarosa de bajo punto de fusión al 3%, en la que se embebieron las células bacterias, debido a la fragilidad de los bloques a una menor concentración e igualmente se observan impurezas de la muestra en los patrones por los ineficientes lavados de los bloques y a la inadecuada digestión del ADN por la enzima de restricción *Xba*I. Como resultado produciendo una corrida en el gel y defectuosa unos patrones de bandas indefinidos.

### 6.3. Efecto de la densidad celular en la PFGE.

En la Figura 2 se continuó utilizando el protocolo estandarizado de la CDC, en este proceso se modificó la concentración de agarosa de bajo punto de fusión, esta parámetro se restableció en 1.5% de agarosa en la cual se embeben los aislados bacterianos, esto de acuerdo según a la CDC. Con finalidad de evitar el exceso de ADN, también se evaluó el valor de densidad óptica o concentración celular bacteriana en un intervalo de 0.2 a 0.8 de Absorbancia a una longitud de onda de 610 nm. La densidad que permitió obtener la señal más intensa y sin distorsión de las bandas fue de 0.8. En estos geles se utilizó el amortiguador de suspensión celular PIV (Tris-HCl,10mM; NaCl, 1 M, pH 7.5)(Hamdan-Partida et al, 2014).



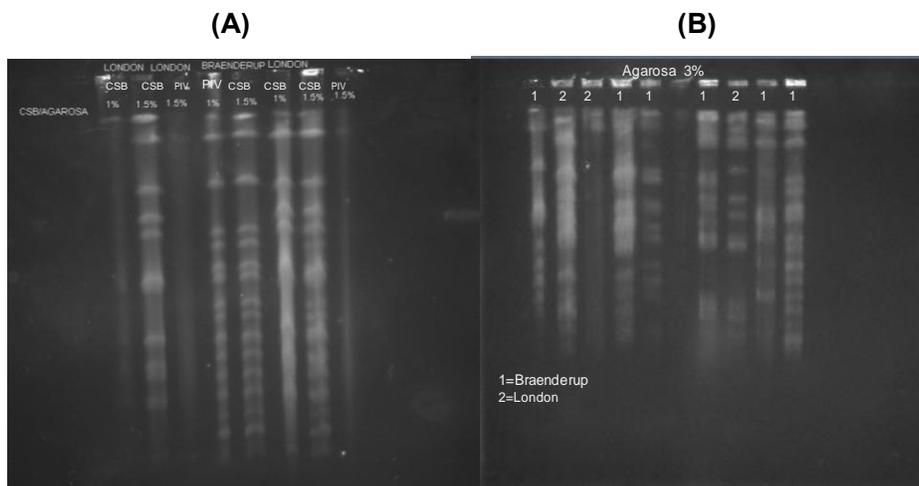
**Figura 2. Efecto de la densidad celular.** A) Las cepas en los carriles de patrones de bandas (1-7), representan a las cepas de *Salmonella* serotipo London con los valores de Absorbancia indicados. B) Las cepas *Salmonella* serotipo Braenderup en los patrones de bandas (8-14) con los valores de Absorbancias indicados, se observa una alta concentración de ADN y patrones definidos.

En esta imagen, se muestran los patrones de bandas de los serotipos London y Braenderup utilizando el protocolo de la CDC en la que se evaluó la concentración celular bacteriana (Densidad Óptica). Se probaron de 0.2 a 0.8 de Absorbancia a una longitud de onda de 610 nm. En los patrones de bandas con Absorbancia de (0.2-0.3-0.4-0.5), se observan con poca resolución; por lo tanto, se ven afectados los pulsotipos en la imagen. En los pulsotipos de Absorbancia (0.6-0.7-0.8), se

observan las bandas con resolución y definición, se demuestra que la Absorbancia de 0.8 posee una mayor resolución y definición de las bandas para su posterior análisis e interpretación. Por lo tanto, la Absorbancia a utilizar será de 0.8 a una longitud de onda de 610 nm.

#### 6.4. Efecto de la Concentración Agarosa Bajo Punto de Fusión en la elaboración de los bloques y del amortiguador de lisis.

En la Figura 3 se muestra el gel donde se realizó la modificación de la concentración de la agarosa de bajo punto de fusión al 1%, la concentración celular bacteriana con una Absorbancia 0.8 a  $\lambda=610$  nm, y el amortiguador de suspensión celular por Amortiguador PIV y CSB. Los amortiguadores (PIV-CSB) son empleados para preparar la suspensión bacteriana y los bloques de agarosa de PFGE. El resultado de estas modificaciones proporcionó patrones de bandas con mayor resolución o más definidos.



**Figura 3. Efecto de la Concentración Agarosa Bajo Punto de Fusión.** Las cepas en los carriles corresponden a los serotipos de *Salmonella* Braenderup (1) y London (2) en los paneles (A) y (B), utilizando concentración de agarosa para realizar los bloques al 1%, 1.5% y 3%, en donde las células bacterianas fueron resuspendidas con amortiguador CSB y PIV. Por lo que se observa las bandas son afectadas por la degradación del ADN.

En la Figura 3(A), se realizaron modificaciones en la concentración de la agarosa de bajo punto de fusión en la que se embeben las bacterias; así como, el amortiguador de suspensión celular. En los carriles 1, 2, 3, 6 y 7, se utilizó el

serotipo London y en los carriles 4, 5 y 8, se utilizó el serotipo Braenderup H9812 con los porcentajes de agarosa y amortiguador señalados. En la Figura 3(A) se observa una diferencia mínima entre los carriles donde se utilizó agarosa al 1% y 1.5%, con una tendencia a un menor barrido en la concentración de 1%. En la Figura 3(B) se observa que el uso de 3% de agarosa en los bloques no permite una buena definición de las bandas y además parece retrasar la migración, haciendo menos eficiente la separación de fragmentos. También, se observó que los amortiguadores CSB y PIV, permiten la misma separación y resolución de los patrones de bandas. Este parámetro se modificó para comprobar si resultaba en una alta resolución y una mayor limpieza en los patrones de bandas. La concentración de agarosa de bajo punto de fusión que se utilizará será al 1% en la que se embeberán las células bacterianas para formar los bloques y además se utilizara el amortiguador CSB para la suspensión celular, de acuerdo con el protocolo de la CDC para *Salmonella*. Debido a que se seguían observando digestiones deficientes del ADN en los patrones de bandas, se aumentó también la concentración de la enzima de restricción *Xba*I de 50 a 75 unidades por bloque, de acuerdo al protocolo de la CDC, que señala que la decreciente cantidad de enzima forma bandas fantasmas dificultando la interpretación de los patrones de bandas.

#### **6.5. Verificación del protocolo estandarizado con diferentes serotipos de *Salmonella enterica*.**

La Figura 4 representa la validación del PFGE en las condiciones y parámetros de corrida de la electroforesis en gel de campos pulsados señalados previamente. Las modificaciones que fueron utilizadas para análisis de los aislados de *Salmonella*, fueron la agarosa de bajo punto de fusión al 1% en la que se embebieron las células bacterianas, también la modificación del amortiguador de suspensión celular (Amortiguador CSB), y la densidad óptica bacteriana con una Absorbancia 0.8 a la longitud de onda de 610 nm. En este proceso final todavía es necesario estandarizar los problemas con las impurezas de los bloques, por lo

cual nos está afectando en la resolución de los patrones de bandas. Por tal motivo, se aumentó el número los lavados de los bloques de agarosa conteniendo al ADN.



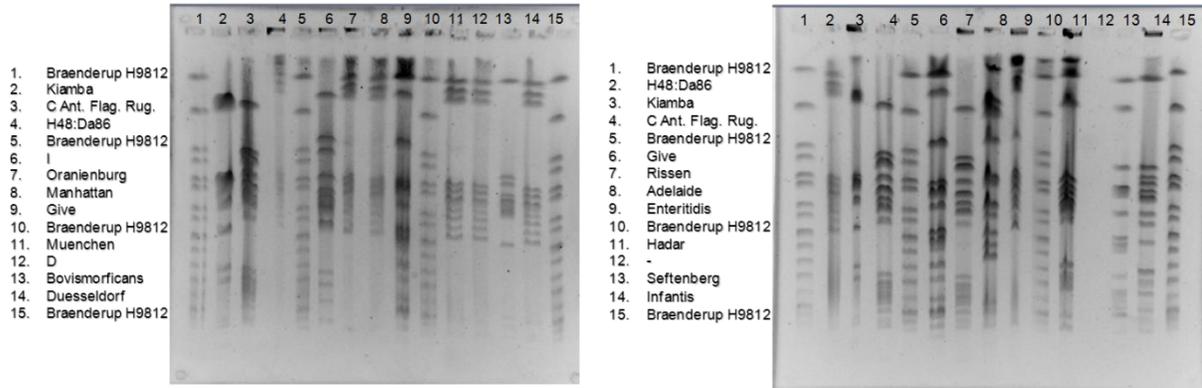
**Figura 4. Validación del protocolo estandarizado de PFGE.** Las cepas en los carriles de patrones de bandas, representan a los serotipos de *Salmonella* (1) Braenderup H9812; (2) Typhimurium; (3) London; (4) Javiana; (5) Braenderup H9812; (6) Javiana; (7) Javiana; (8) Give; (9) Typhimurium; (10) Agona; (11) Enteritidis; (12) Montevideo; (13) Braenderup; (14) Braenderup H9812, respectivamente.

En la Figura 4, se observa que en lo general los patrones de bandas para la mayoría de los serotipos presentan una mayor resolución y más definidas. Al contrario, en los carriles de restricción 4, 6 y 7, que corresponden a *Salmonella* Javiana no se observan patrones de bandas. Por lo tanto, se considera que el aislado *S. Javiana* no es tipificable para PFGE. Los parámetros y condiciones finales que fueron preestablecidos para el protocolo de electroforesis de campos pulsados son mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros Modificados del Protocolo del CDC.				
Parámetros	Condición CDC.	Modificación de Laboratorio.	Condiciones Estandarizadas	Proceso de Estandarización
Densidad Celular	Rango de 0.8-1.0 Absorbancia/610 nm	Rango de 0.8 Absorbancia/610 nm	Rango de 0.8. Absorbancia/610 nm. 350±450 µl Cultivo bacteriano.	Se realizó una curva de Absorbancia de 0.2 a 0.8 para ajustar la densidad bacteriana en los bloques de agarosa.
% Agarosa	1% Agarosa bajo punto de fusión (Lonza)	1.5-3% Agarosa bajo punto de fusión (Sigma)	1% Agarosa bajo punto de fusión (Sigma)	Se realizó una curva de concentración de agarosa de 1, 1.5, 2, 3% de Agarosa bajo punto de fusión
Amortiguador	Amortiguador Suspensión Celular-CSB (Tris 100 Mm, EDTA 100 Mm, pH 8.0).	Amortiguador PIV (Tris 10 Mm, NaCl 1M).	Amortiguador Suspensión celular (Tris 100 Mm, EDTA 100 Mm, pH 8.0).	Se utilizó CSB, para la resuspensión de las células y evitar la degradación del ADN.
Unidades de Enzima XbaI	50 U	70 U	70 U	Por restricción parcial del ADN. Se incremento unidades de enzima XbaI, para proporcionar una restricción total del ADN.
Proceso del Protocolo	24-26 Horas	72 Horas	72 Horas	Se aumento tiempo de protocolo por lavados de bloques e incubación con enzima de restricción.

## 6.6. Patrones de los Serotipos de *Salmonella enterica*.

En esta etapa con las condiciones ya establecidas, se inicia el análisis de los aislados de *S. enterica*.



**Figura 5.** Patrones de PFGE que presentan los diferentes serotipos de *Salmonella enterica*.

En este trabajo, se analizaron 51 cepas de *S. enterica* por PFGE de los 55 aislados de la colección que posee el Laboratorio Estatal de Salud Pública, esto representa el 93% de los aislados analizados de la colección de *S. enterica* (Tabla 3). Además, los serotipos más frecuentes de este análisis fueron de *Salmonella* Enteritidis (n=11; 20%); *Salmonella* Typhimurium (n=5; 9%); *Salmonella* GIVE y *Salmonella* Javiana (n=3; 6%); *Salmonella* Rissen, *Salmonella* Seftenberg, *Salmonella* Oranienburg, *Salmonella* Montevideo y *Salmonella* Agona (n=2; 3%) y

las 23 cepas restantes corresponden a los serotipos menos frecuentes lo que representa al restante 44% de las cepas asociados en este estudio.

Los aislados de *Salmonella* fueron separados en XXX pulsotipos diferentes los cuales se agruparon en YYY grupos tomando como criterio que tuvieran 75% de similitud en el patrón de macrorestricción. Los pulsotipos agruparon a los serotipos *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, los de mayor prevalencia, en grupos de pulsotipo distinto. En el grupo de pulsotipos de *Salmonella* Enteritidis, se pudieron distinguir pulsotipos específicos para *Salmonella* Enteritidis asociada a alimentos y *Salmonella* Enteritidis Invasiva. Los pulsotipos de PFGE fueron muy similares. La principal diferencia es una banda de XXX de tamaño molecular, que permite diferenciar a los aislados obtenidos de alimentos de los invasivos. Respecto, a los serotipos *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* D, *Salmonella* Manhattan, *Salmonella* Duesseldorf y *Salmonella* Oranienburg también poseen pulsotipos idénticos o muy similares y estos corresponden a los aislados de alimentos. Además, en los pulsotipos de PFGE de *Salmonella* no se observaron pulsotipos idénticos o similares entre los aislados de caso clínicos de humanos y aislados de alimentos, lo cual sugieren que cada genotipo/serotipo puede ser específico de cada tipo de patología. Por otro lado, la alta diversidad de serotipos *Salmonella* que se encuentran en los alimentos sugiere que no existen huéspedes específicos (pollo, chorizo, verduras, etc) e indica la posible diversidad *Salmonella* en el medio ambiente.

**Tabla 3. Información y diversidad de los serotipos de *Salmonella enterica* aislados en el estado de Michoacán.**

Serotipo	Edad	Sexo	Recurso	Tipo de Muestra	Municipio	Fecha	Grupos-PFGE
<i>Salmonella</i> Typhimurium	12	F	Humano	Hisopado Rectal	Paracho	2015	IX
<i>Salmonella</i> London	23	M	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	IX
<i>Salmonella</i> Infantis	10	F	Humano	Hisopado Rectal	Juárez	2015	XIV
<i>Salmonella</i> Javiana	36	F	Humano	Hisopado Rectal	Paracho	2015	.
<i>Salmonella</i> Javiana	21	F	Humano	Hisopado Rectal	Paracho	2015	.
<i>Salmonella</i> Javiana	23	M	Humano	Hisopado Rectal	Yurécuaro	2015	.
<i>Salmonella</i> Give	2M <sup>a</sup>	M	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	XI
<i>Salmonella</i> Typhimurium	10	M	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	VII
<i>Salmonella</i> Agona	8M <sup>a</sup>	M	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	XV

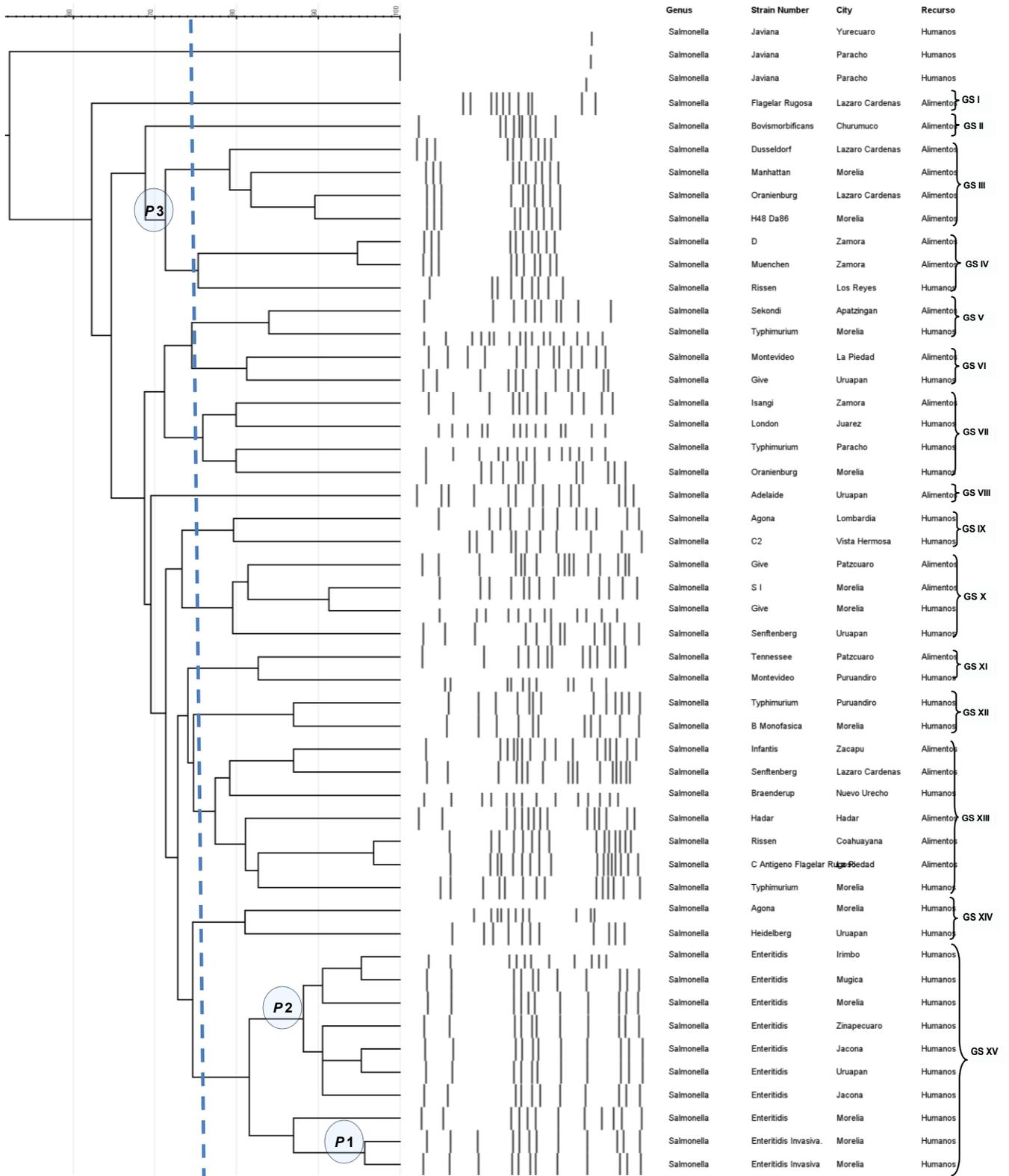
<b>Salmonella Enteritidis</b>	1	M	Humano	Hisopado Rectal	Irimbo	2015	XII
<b>Salmonella Montevideo</b>	24	F	Humano	Hisopado Rectal	Puruándiro	2015	VIII
<b>Salmonella Braenderup</b>	59	F	Humano	Hisopado Rectal	Nuevo Urecho	2015	XV
<b>Salmonella Typhimurium</b>	34	M	Humano	Hisopado Rectal	Zamora	2015	.
<b>Salmonella Enteritidis</b>	41	M	Humano	Hisopado Rectal	Zamora	2015	XII
<b>Salmonella Rissen</b>	15	F	Humano	Hisopado Rectal	Los Reyes	2015	IV
<b>Salmonella Give</b>	71	F	Humano	Hisopado Rectal	Uruapan	2015	VI
<b>Salmonella Enteritidis</b>	32	F	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	XII
<b>Salmonella Enteritidis</b>	-	F	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	XII
<b>Salmonella Typhimurium</b>	50	F	Humano	Hisopado Rectal	Puruándiro	2015	XIII
<b>Salmonella Enteritidis</b>	8	M	Humano	Hisopado Rectal	Uruapan	2015	XII
<b>Salmonella Agona</b>	38	F	Humano	Hisopado Rectal	Gabriel Zamora	2015	XI
<b>Salmonella Enteritidis</b>	3	F	Humano	Hisopado Rectal	Jaconá	2015	XII
<b>Salmonella Enteritidis</b>	42	F	Humano	Hisopado Rectal	Jaconá	2015	XII
<b>Salmonella Oranienburg</b>	1	F	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	XII
<b>Salmonella E4</b>	49	F	Humano	Hisopado Rectal	Lázaro Cárdenas	2015	.
<b>Salmonella Heidelberg</b>	24	M	Humano	Hisopado Rectal	Uruapan	2015	XV
<b>Salmonella Senftenberg</b>	17	M	Humano	Hisopado Rectal	Uruapan	2015	XII
<b>Salmonella C2</b>	30	F	Humano	Hisopado Rectal	Vista Hermosa	2015	XI
<b>Salmonella 28 Antig. Flag. Rug.</b>	63	F	Humano	Hisopado Rectal	Tarímbaro	2015	.
<b>Salmonella Enteritidis</b>	81	F	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	XII
<b>Salmonella Enteritidis</b>	3	F	Humano	Hisopado Rectal	Zinapécuaro	2015	XII
<b>Salmonella Enteritidis Invasiva</b>	-	M	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	XII
<b>Salmonella B Monofasica</b>	-	M	Humano	Hisopado Rectal	Morelia	2015	XIII
<b>Salmonella Typhimurium</b>	-	-	Alimentos	Carne de Res	Apatzingán	2014	.
<b>Salmonella Antigeno Flag. Rug.</b>	-	-	Alimentos	Carne de Res	Lázaro Cárdenas	2014	I
<b>Salmonella Isangi</b>	-	-	Alimentos	Pollo Crudo	Zamora	2014	IX
<b>Salmonella Sekondi</b>	-	-	Alimentos	Carne de Bovino	Apatzingán	2014	VII
<b>Salmonella San Diego</b>	-	-	Alimentos	Carne de Res	Apatzingán	2014	.
<b>Salmonella Montevideo</b>	-	-	Alimentos	Queso Fresco	La Piedad	2014	VI
<b>Salmonella Tennessee</b>	-	-	Alimentos	Chorizo	Pátzcuaro	2014	VIII
<b>Salmonella D</b>	-	-	Alimentos	Pollo Crudo	Zamora	2014	III
<b>Salmonella Muenchen</b>	-	-	Alimentos	Longaniza	Zamora	2014	III
<b>Salmonella Give</b>	-	-	Alimentos	Chorizo	Pátzcuaro	2014	XII
<b>Salmonella Manhattan</b>	-	-	Alimentos	Carne de Bovino	Morelia	2014	V
<b>Salmonella Oranienburg</b>	-	-	Alimentos	Carne de Bovino	Lázaro Cárdenas	2014	V
<b>Salmonella I</b>	-	-	Alimentos	Chorizo	Morelia	2014	XI
<b>Salmonella H48 Da26</b>	-	-	Alimentos	Ostión	Morelia	2014	V
<b>Salmonella C Antig. Flag. Rug.</b>	-	-	Alimentos	Carne de Res	La Piedad	2014	XIV
<b>Salmonella Bovismorbificans</b>	-	-	Alimentos	Carne de Res	Churumuco	2014	II
<b>Salmonella Duesseldorf</b>	-	-	Alimentos	Arroz con Pollo Cocido	Lázaro Cárdenas	2014	V
<b>Salmonella Enteritidis</b>	-	-	Alimentos	Pollo Crudo	Lázaro Cárdenas	2014	XII
<b>Salmonella Rissen</b>	-	-	Alimentos	Carne de Bovino	Coahuayana	2014	XIV

<i>Salmonella</i> Adelaide	-	-	Alimentos	Chorizo	Uruapan	2014	X
<i>Salmonella</i> Infantis	-	-	Alimentos	Carne de Bovino	Zacapu	2014	XIV
<i>Salmonella</i> Senftenberg	-	-	Alimentos	Pollo Crudo	Lázaro Cárdenas	2014	XIV
<i>Salmonella</i> Hadar	-	-	Alimentos	Pollo Crudo	Morelia	2014	XIV

<sup>a</sup> La edad señalada son en Meses.

En dendograma (**Fig. 6**), se muestra el análisis de similitud genética de 52 aislados por pulsotipos de PFGE. Se observa la formación de al menos 15 grupos-Clúster de la presencia de diferentes grupos de *Salmonella* (GS I; GS II; GS III; GS IV, sucesivamente) sugieren una amplia diversidad o heterogeneidad genética en concordancia con la diversidad de serotipos determinados. Las serotipos de los grupos (GS I; GS II; GS VIII) se observa una diversidad de pulsotipos únicos asociados cada uno a un serotipo y en otros grupos (GS IV; GS VII; GS XIII), se encuentran conformados por dos, tres y cinco serotipos, respectivamente, lo cual sugiere una heterogeneidad genética En un tercer grupo (GS XV) se encuentran los aislados con el serotipo de mayor prevalencia en Michoacán, el serotipo *Salmonella* Enteritidis , en el cual se agrupan tanto los aislados asociados a gastroenteritis, como los que presentan invasividad. Esto sugiere que el fondo genético del serotipo *Salmonella* Enteritidis posee un potencial patogénico generando agudas infecciones intestinales y extra intestinales o enfermedades invasivas, el porcentaje de similitud en estos aislados es del 91% al 100%. Los demás serotipos del grupo (GS V; GS VI; GS IX; GS XII), presentan una relación de similitud intermedia (75%-90%) y están integrados por los serotipos *Salmonella* Seftenberg y *Salmonella* Give; En el cuarto grupo (GS III) la caracterización molecular señala a los serotipos *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* D, *Salmonella* Manhattan, *Salmonella* Duesseldorf y *Salmonella* Oranienburg como aislados indistinguibles por poseer el mismo pulsotipo genético y presentar diferente serotipo, lo cual nos indica que son estrechamente relacionados. Por tal motivo, la caracterización molecular de *S. enterica* por PFGE es una herramienta útil como un sistema preliminar para identificar los serotipos en brotes infecciosos, y así sustituir la serotipificación por técnicas de epidemiología molecular, como la que se realiza con los pulsotipos de PFGE. De esta manera, los nuevos pulsotipos de

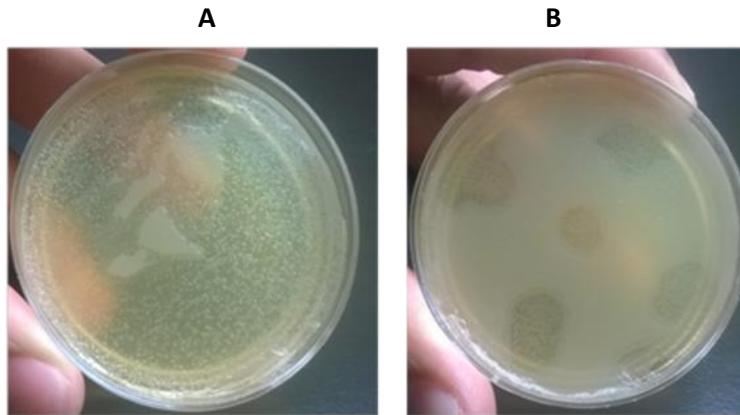
los aislados que coincidan exactamente con un pulsotipo de la base de datos, confirmaría el serotipo; además, realizaría predicciones de aislados con los pulsotipos y determinar el serotipo del brote epidemiológico. Así, reduciendo los laboriosos métodos convencionales o cuando un laboratorio no tiene acceso a la serotipificación estándar. A su vez, se obtuvo el valor del índice de discriminación de Hunter ( $D_{95}$ ) que se utiliza para distinguir entre dos cepas. El cual en este análisis proporcionó valores de poder de discriminación para serotipificación de  $D=0.94$  y para pulsotipos  $D=0.96$  para el PFGE (Blanc et al., 2007; Gaul et al., 2007; Ribot et al., 2006; Tenover et al., 1995; Valdez-Alarcón et al., 2015).



**Figura 6.** Dendrograma de similitud de patrones de bandas por PFGE de 56 serotipos de *Salmonella enterica*, generadas con la enzima de restricción *Xba* I, y analizadas por UPGMA en el programa GelJ de análisis de ADN. Indicando la línea vertical de similitud de 75%.

### **6.7. Aislamiento de bacteriófagos de serotipos de *Salmonella enterica*.**

En este proceso se utilizaron los serotipos de *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Enteritidis Invasiva, y *Salmonella* Braenderup, como hospederos para el primoaislamiento de los bacteriófagos. Estos serotipos fueron seleccionados de acuerdo a los grupos (GS XI, GS XIII y GS XV, respectivamente) del dendograma de similitud. Los dos pulsotipos de *Salmonella* Enteritidis fueron seleccionados en función de su prevalencia y patología (gastroentérica o invasiva). De los serotipos de *Salmonella* Enteritidis Invasiva y *Salmonella* Braenderup se aislaron bacteriófagos específicos y estos bacteriófagos fueron obtenidos de una muestra de un canal de agua residual en los meses de Mayo-Julio en la época de verano en el año 2017. Estos bacteriófagos fueron designados como Fago Posta Michoacán *Salmonella* 01 (FPMICHS01) que fue aislado de *Salmonella* Enteritidis Invasiva y Fago Posta Michoacán *Salmonella* 02 (FPMICHS02) aislado de *Salmonella* Braenderup. El fenotipo de estos bacteriófagos no fue característico de bacteriófagos líticos, sino que presento lisis parcial, doble borde en la placa lítica y crecimiento de colonias bacterianas en la zona de lisis. Estos fagos lisogénicos presentaron características iniciales de placas líticas redondas y claras pero posterior a la infección aparecieron pequeñas colonias bacterianas en el centro de esta misma placa, lo que podría indicar que estos son fagos líticos inestables y los colonias Clones Tipo Parental [**Figura 7**] (Khemayan et al., 2006; Williamson et al, 2001).



**Figura 7. Imágenes del ensayo de placas líticas obtenidas con el fago FPMICHS01, respectivamente.** A) Serotipo *Salmonella* Enteritidis con el fago FPMICHS01 donde se muestran lisis con zonas de crecimiento bacteriano. B) Serotipo *Salmonella* Braenderup, se observan zonas de placas líticas bordeadas con un tapiz bacteriano.

Los bacteriófagos se ensayaron en agar doble capa con los serotipos de *Salmonella* Enteritidis (**Fig.7A**), en donde se observó lisis completa en la placa con zonas no líticas con crecimiento de algunas colonias bacterianas en la zona de lisis total. Por otro lado, *Salmonella* Braenderup (**Fig.7B**) se observaron con placas líticas en las zonas donde se adicionaron las gotas de los fagos, señalando actividad lítica de los fagos, pero también presentó el crecimiento de colonias bacterianas dentro de la zona de lisis. En ambos casos, el comportamiento se ha descrito como un fago lítico inestable y colonias clon tipo parental. (39). El crecimiento e incubación de la placa doble capa con bacteria-fago se realizó por 24 horas. Se observan las colonias bacterianas bordeadas por una zona de inhibición de crecimiento posiblemente debido a la formación de las lisis de los fagos (Bao et al., 2015; Yuan et al., 2015).

## VII. DISCUSIÓN.

La implementación de la electroforesis en gel campos pulsados (PFGE) en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Michoacán, permitirá establecer aproximadamente en un año, un sistema de vigilancia de enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos y generar una caracterización genotípica de las cepas de *Salmonella enterica*, para crear una base de datos de las bacterias analizadas, las cuales se podrán estudiar en un futuro en los brotes de salmonelosis transmitidas por los alimentos en el Estado.

En la evaluación del PFGE, los primeros pulsotipos no fueron visibles debido a problemas en la resolución por la degradación del ADN, generando una insuficiente calidad en la imagen, que puede ser afectada por el exceso de ADN y el exceso de desechos celulares por los inadecuados lavados de los bloques con Amortiguador TE<sub>10/1</sub>. Por ello, en la estandarización se corrigieron los problemas de parámetros específicos para generar imágenes con pulsotipos o patrones de bandas distinguibles con buena resolución y definición de los pulsotipos, lo que al final se observan pulsotipos de PFGE, que pueden ser analizados para su similitud de los genotipos de los aislados *S. enterica* (Acar et al., 2017; Barrett et al, 2006; Gaul et al., 2007; Valdez-Alarcón et al., 2015).

En la caracterización por PFGE-*Xba*I se detectaron 23 pulsotipos (*P*) diferentes, entre los cuales se encontró con mayor porcentaje de similitud de los pulsotipos en los serotipos de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Enteritidis invasiva (*P1*, *P2*) y *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* D, *Salmonella* Manhattan, *Salmonella* Duesseldorf y *Salmonella* Oranienburg (*P3*). En el pulsotipo de *Salmonella* Enteritidis Invasiva (extraintestinal) se diferencia solo en una banda con respecto a la *Salmonella* Enteritidis gastroenterica, ya que generó un pulsotipo similar. Esto puede representar una inserción de material genético en el cromosoma o un plásmido, sugiriendo que son aislados estrechamente relacionados genéticamente y que pudieron haber adquirido un plásmido integrativo o un bacteriófago lisogénico (profagos), que al insertarse en el genoma, introdujera sitios de

restricción nuevos, generando la banda polimórfica que es diferencial entre los dos aislados (Barrett et al., 2006; Powell et al, 1994). *Salmonella* Enteritidis invasiva, suele aislarse de casos de bacteremia de individuos inmunocomprometidos, como los pacientes enfermos de VIH. La diferencia en patrones de PFGE entre aislados invasivos y no invasivos de *Salmonella* Enteritidis ha sido previamente reportada (Kariuki et al., 2006; Shariat et al., 2013). La posibilidad de detectar la diferencia entre cepas gastroentéricas e invasivas permite una mejor vigilancia epidemiológica e identificar las cepas para investigación. Este hallazgo abre la posibilidad de realizar estudios de genómica comparativa y expresión de genes con cepas de genotipos gastroentérico e invasivo. En el caso de *Salmonella* Enteritidis proveniente de casos de diarrea o de bacteremia, el análisis genómico permitió demostrar que el genoma de la cepa invasiva sufrió una degradación en comparación con la cepa no invasiva. Esto sugiere una especialización de las cepas invasivas comparadas con la versatilidad de las cepas gastroentéricas (Kariuki et al, 2015). Los serotipos *Salmonella* Muenchen, D, Manhattan, Duesseldorf y Oranienburg, presentan pulsotipos muy similares y los aislados son designados como cepas indistinguibles. Lo anterior sugiere la existencia de un genotipo común, prevalente que posee patrones antigénicos diferentes. Dada la alta similitud en los patrones de los pulsotipos y la complejidad del sistema de serotipificación, en este momento no podemos descartar que la caracterización por serotipificación haya tenido errores, o bien las cepas no sean tipificables por serotipificación. El restante de los serotipos de *S. enterica* presenta una diversidad genética amplia, que se observa por los diferentes pulsotipos que pueden considerarse como aislados no relacionados genéticamente. La mayoría de los pulsotipos de menor frecuencia, correspondió también a serotipos diferentes. Esto abre la posibilidad de plantear una iniciativa para sustituir el uso de la serotipificación, ya que se podrían asociar los pulsotipos con los serotipos, y de esta manera sustituir el laborioso método serológico, que implica contar más de 250 antisueros para la identificación de más 2500 serotipos y a su vez reducir costos y tiempos en la discriminación de los serotipos. Aún así, sería necesario contar con un mayor número de aislados de cada genotipo/serotipo para poder

establecer correlaciones efectivas. Un estudio tipo meta-análisis podría contribuir a definir las correlaciones pulsotipo – serotipo en los aislados de serotipo/pulsotipo menos prevalentes. Por ello y dado que el índice de discriminación de Hunter (D), el cual en este análisis proporcionó valores de poder de discriminación para serotipificación de  $D=0.94$  y para pulsotipos  $D=0.96$ . Esto sugiere un poder de discriminación del PFGE mayor en comparación con la serotipificación. Sin embargo, estudios con un mayor número de aislados han sugerido que no existe diferencia estadísticamente significativa entre la serotipificación y el análisis de macro-restricción del genoma por PFGE (Kariuki et al., 2006). Diversas iniciativas plantean utilizar el PFGE como método de tipificación estandarizado en los laboratorios de hospitales y de vigilancia epidemiológica por ser más sensible y menos laborioso que la serotipificación (Powell et al., 1994; Swaminathan, 2001; Tenover et al., 1995).

El PFGE posee la capacidad de discriminar aislados de brotes o cepas de la misma especie. Por ello, el análisis de macrorestricción para *S. enterica*, se encuentra señalando la correlación de los aislados con los serotipos de los cuales son de relevancia epidemiológica en brotes infecciosos (Barrett et al., 2006; CDC, 2013; Morales-romero et al., 2016; Nutrition FDA, 2013). Además, la metodología de PFGE, una vez estandarizada en el laboratorio, puede ser utilizada virtualmente para cualquier otra especie bacteriana, solamente modificando los protocolos de lisis, restricción del genoma y los parámetros de corrida en la PFGE. Es por ello que debería tenerse como un método de elección para la tipificación de aislados bacterianos en hospitales y laboratorios de vigilancia epidemiológica.

En adición a la resistencia de antibióticos de *S. enterica*, es necesario un tratamiento alternativo a los antibióticos para las infecciones multi-resistentes de *S. enterica* y esta posible alternativa se teoriza en la terapia bacteriofágica. En este trabajo se aislaron dos fagos lisogénicos con propiedades líticas inestables que denominamos fagos líticos inestables. Los fagos líticos inestables son fagos que poseen alta síntesis de las proteínas que provocan la integración y la lisogenia. Por otro lado, si el producto del gen de la integrasa es degradado por proteasas reguladoras del huésped pasa al ciclo lítico. Se cree que se pueden

formar cepas resistentes a fagos si no son sintetizadas las proteasas que degradan la integrasa (Bao et al., 2015; Datta et al., 2005; Khemayan et al., 2006; Shin et al., 2012; Yuan et al., 2015). El aislamiento de fagos lisogénicos es también una oportunidad para desarrollar una estrategia de biocontrol de *Salmonella enterica*. Aunque los fagos tengan características de lisogenia o de lisis inestable, las enzimas encargadas de la hidrólisis de la pared celular, las endolisinas o sus genes, pueden ser aislados de estos bacteriófagos y ser expresados para su aplicación contra los serotipos contra los que fueron aislados o contra otros genotipos. Una vez contando con endolisinas en sistemas de expresión, se puede realizar ingeniería genética o construcción de endolisinas modulares recombinantes para modificar su actividad y su especificidad (Barrera-Rivas et al., 2015).

## **VIII. CONCLUSIONES.**

- 1) El análisis de PFGE de los aislados de *Salmonella entérica* tiene un poder de discriminación mayor que el serotipo y puede distinguir entre patotipos gastroentérico e invasivo de *Salmonella Enterica*.
- 2) Existe una buena correlación entre los pulsotipos asignados por PFGE o los serotipos, dejando abierta la posibilidad de sustituir la serotipificación por el análisis PFGE.
- 3) Aunque se aislaron bacteriófagos lisogénicos inestables, que serían de poca utilidad para su aplicación terapéutica directa, el hallazgo aún es de utilidad pues se pueden aislar y expresar los genes de las endolisinas correspondientes para usar como agentes de control biológico.

## **IX. REFERENCIAS.**

Acar, S., Bulut, E., Durul, B., Uner, I., Kur, M., Avsaroglu, M. D., ... Soyer, Y. (2017). Phenotyping and genetic characterization of *Salmonella enterica* isolates from Turkey revealing arise of different features specific to geography.

- International Journal of Food Microbiology*, 241, 98–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.031>
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F. X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., ... Brisse, S. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, 8(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A., ... Barrow, P. A. (2007). Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4543–4549. <https://doi.org/10.1128/AEM.00049-07>
- Bai, J., Kim, Y. T., Ryu, S., & Lee, J. H. (2016). Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00474>
- Bao, H., Zhang, P., Zhang, H., Zhou, Y., Zhang, L., & Wang, R. (2015). Bio-control of salmonella enteritidis in foods using bacteriophages. *Viruses*, 7(8), 4836–4853. <https://doi.org/10.3390/v7082847>
- Barrett, T. J., Gerner-Smidt, P., & Swaminathan, B. (2006). Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 20–31. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.20>
- Birren, B., & Lai, E. (1993). *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide* (Vol. 9). [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90046-K](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90046-K)
- Blanc, D. S., Petignat, C., Wenger, A., Kuhn, G., Vallet, Y., Fracheboud, D., ... Zanetti, G. (2007). Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a small geographic area over an eight-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), 3729–3736. <https://doi.org/10.1128/JCM.00511-07>
- Borie, C., Robeson, J., & Galarce, N. (2014). Lytic bacteriophages in Veterinary Medicine: a therapeutic option against bacterial pathogens? TT - Bacteriófagos líticos en Medicina Veterinaria: ¿una opción terapéutica frente a patógenos bacterianos? *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(2), 167–179.

<https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000200002>

- Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C. W., & Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.012>
- Capparelli, R., Nocerino, N., Iannaccone, M., Ercolini, D., Parlato, M., Chiara, M., & Iannelli, D. (2010). Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(1), 52–61. <https://doi.org/10.1086/648478>
- Datta, A. B., Roy, S., & Parrack, P. (2005). Role of C-terminal residues in oligomerization and stability of ?? CII: Implications for lysis-lysogeny decision of the phage. *Journal of Molecular Biology*, 345(2), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.098>
- Filho Andreatti, R. L., Higgins, J. P., Higgins, S. E., Gaona, G., Wolfenden, a D., Tellez, G., & Hargis, B. M. (2007). Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar enteritidis in vitro and in vivo. *Poultry Science*, 86(9), 1904–1909. <https://doi.org/10.1093/ps/86.9.1904>
- Gaul, S. B., Wedel, S., Erdman, M. M., Harris, D. L., Harris, I. T., Ferris, K. E., & Hoffman, L. (2007). Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved XbaI fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 472–476. <https://doi.org/10.1128/JCM.00962-06>
- Gebru, E., Lee, J. S., Son, J. C., Yang, S. Y., Shin, S. A., Kim, B., ... Park, S. C. (2010). Effect of probiotic-, bacteriophage-, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Journal of Animal Science*, 88(12), 3880–3886. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-2939>
- Gerstmans, H., Rodriguez-Rubio, L., Lavigne, R., & Briers, Y. (2016). From endolysins to Artilysin(R)s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 123–128. <https://doi.org/10.1042/BST20150192>

- Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 866–875. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>
- Grimont, P., & Weill, F.-X. (2008). Antigenic formulae of the Salmonella servovars. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*, 1–167. Retrieved from <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089%5Cnpapers2://publication/uuid/CA3447A0-61BF-4D62-9181-C9BA78AF0312>
- Hamdan-Partida, A., Sainz-Espuñes, T., & Bustos-Martínez, J. (2014). Isolation of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in healthy carriers in a Mexican community. *International Journal of Infectious Diseases*, 18(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.08.010>
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Hernandez, S. M., Welch, C. N., Peters, V. E., Lipp, E. K., Curry, S., Yabsley, M. J., ... Maurer, J. J. (2016). Urbanized White Ibises (Eudocimus albus) as carriers of Salmonella enterica of significance to public health and wildlife. *PLoS ONE*, 11(10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164402>
- Higgins, J. P., Higgins, S. E., Guenther, K. L., Huff, W., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., & Hargis, B. M. (2005). Use of a specific bacteriophage treatment to reduce Salmonella in poultry products. *Poultry Science*, 84(7), 1141–1145. <https://doi.org/10.1093/ps/84.7.1141>
- Jassim, S. A. A., & Limoges, R. G. (2014). Natural solution to antibiotic resistance: Bacteriophages “The Living Drugs.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(8), 2153–2170. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1655-7>
- Johnson, T. J., Thorsness, J. L., Anderson, C. P., Lynne, A. M., Foley, S. L., Han, J., ... Singer, R. S. (2010). Horizontal gene transfer of a colV plasmid has resulted in a dominant avian clonal type of salmonella enterica serovar

- kentucky. *PLoS ONE*, 5(12), 1–10.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015524>
- Karchmer, A. W. (2006). From theory to practice: resistance in *Staphylococcus aureus* and new treatments. *Clin.Microbiol.Infect.*, 12 Suppl 8(1198–743X (Print)), 15–21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01626.x>
- Kariuki, S., & Onsare, R. S. (2015). Epidemiology and genomics of invasive nontyphoidal salmonella infections in Kenya. *Clinical Infectious Diseases*, 61(Suppl 4), S317–S324. <https://doi.org/10.1093/cid/civ711>
- Kariuki, S., Revathi, G., Kariuki, N., Kiiru, J., Mwituria, J., & Hart, C. A. (2006). Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *BMC Microbiology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-101>
- Khemayan, K., Khemayan, K., Pasharawipas, T., Pasharawipas, T., Puiprom, O., Puiprom, O., ... Flegel, T. W. (2006). Unstable Lysogeny and Pseudolysogeny in. *Microbiology*, 72(2), 1355–1363. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1355>
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., & Achtman, M. (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution*, 2(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00089-8)
- Last, P. N. L., & April, U. (2013). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157 : H7 , *Escherichia coli* non - O157 ( STEC ), *Salmonella* serotypes , *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *E.coli and Salmonelle Detection in Meat*, 157(April), 1–13. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>
- Morales-Romero, G., Rodríguez-Flores, P. F., Bejar-Ubaldo, A., & Valdez-Alarcón, J. J. (2016). Molecular characterization of pathogenic bacteria by pulsed field-gel electrophoresis ( PFGE ) Caracterización molecular de bacterias patógenas mediante electroforesis en gel de campos pulsados ( PFGE ), 1(2), 48–56.
- Moreno Switt, A. I., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Hoelzer, K., Warnick, L.

- D., Cummings, K. J., & Wiedmann, M. (2013). Salmonella bacteriophage diversity reflects host diversity on dairy farms. *Food Microbiology*, 36(2), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.014>
- Ngoi, S. T., Shuan, C., Teh, J., Chai, L. C., & Thong, K. L. (2015). Overview of Molecular Typing Tools for The Characterization of Salmonella enterica in Malaysia. *Biomed Environ Sci*, 28(10), 751–764. <https://doi.org/10.3967/bes2015.105>
- Nutrition, C. for F. S. and A. (2013). Laboratory Methods - Environmental Sampling and Detection of Salmonella in Poultry Houses, 1–5. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114716.htm>
- Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>
- Powell, N. G., Threlfall, E. J., Chart, H., & Rowe, B. (1994). Subdivision of Salmonella enteritidis PT 4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. *FEMS Microbiology Letters*, 119(1–2), 193–198. <https://doi.org/http://doi.org/>
- Ribot, E. M., Fair, M. a, Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 59–67. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>
- Roach, D. R., & Donovan, D. M. (2015). Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 5(3), e1062590. <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1062590>
- Rubin, M. A., & Samore, M. H. (2002). Antimicrobial Use and Resistance. *Current Infectious Disease Reports*, 4(6), 491–497. <https://doi.org/10.1007/s11908-002-0034-y>
- Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147–71.

<https://doi.org/10.2217/fmb.12.97>

- Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins: Applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 37(iii), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.005>
- Shariat, N., DiMarzio, M. J., Yin, S., Dettinger, L., Sandt, C. H., Lute, J. R., ... Dudley, E. G. (2013). The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. *Food Microbiology*, 34(1), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.012>
- Shelobolina, E. S., Sullivan, S. a, Neill, K. R. O., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2004). *Salmonella subterranea*. *Society*, 70(5), 2959–2965. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2959>
- Shin, H., Lee, J.-H., Lim, J.-A., Kim, H., & Ryu, S. (2012). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium bacteriophage SPN1S. *Journal of Virology*, 86(2), 1284–5. <https://doi.org/10.1128/JVI.06696-11>
- Sulakvelidze, A. (2011). The challenges of bacteriophage therapy. *Industrial Pharmacy*, 45(31), 14–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649>
- Swaminathan, B., Barrett, T. J., Hunter, S. B., & Tauxe, R. V. (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 7(3), 382–389. <https://doi.org/10.3201/eid0703.017303>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239. <https://doi.org/0095-1137/>
- Valdez-Alarcón, J., Bustos-Martínez, J., Baizabal-Aguirre, V., & et al. (2015). *Staphylococcus aureus* asociado a la mastitis bovina: un enfoque epidemiológico – funcional (Vol. 52).
- Wattiau, P., Boland, C., & Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Applied*

*and Environmental Microbiology*, 77(22), 7877–7885.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.05527-11>

Williamson, S. J., McLaughlin, M. R., & Paul, J. H. (2001). Interaction of the \varphiHSIC virus with its host: lysogeny or pseudolysogeny? *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1682–1688.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1682>

Yang, H., Yu, J., & Wei, H. (2014). Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(OCT), 1–6.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00542>

Yuan, Y., Peng, Q., Wu, D., Kou, Z., Wu, Y., Liu, P., & Gao, M. (2015). Effects of actin-like proteins encoded by two *Bacillus pumilus* phages on unstable lysogeny, revealed by genomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 339–350. <https://doi.org/10.1128/AEM.02889-14>

## **X. ANEXOS**

10.1 Oficio de entrega/recibido del protocolo estandarizado de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados al Laboratorio Estatal de Salud Pública.

Este protocolo estandarizado de PFGE para *Salmonella enterica*, se entrego el 25 de Noviembre de 2015 al Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán, el cual consiste en la transferencia de tecnología para estudios a desarrollar por el Laboratorio Estatal.



**PROCOLO DE ELECTROFORÉSIS EN GEL EN  
CAMPOS PULSADOS PARA *Salmonella* spp.**

**FONDOS MIXTOS  
MICH-2012-C05-196879**

**Dr. Juan José Valdez Alarcón, Responsable Técnico  
Dr. Irvin Eduardo Jácome Galarza, Laboratorio Estatal de  
Salud Pública  
M.C. Gaspar Morales Romero.**

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
13 de noviembre 2015



Km. 9.5 s/n carretera Morelia-Zinapécuaro  
C.P. 58893, La Palma, Tarímbaro, Michoacán  
Tel/Fax: (443) 295-8029

Recibí  
Gloria Alicia  
Figueroa Aguil  
gla  
24 nov 2015

10.2 Artículo: Molecular characterization of pathogenic bacteria by pulsed field-gel electrophoresis (PFGE)/Caracterización molecular de bacterias patógenas mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). 1(2):48-56. Publicado en la revista Mexican Journal of Biotechnology, 2016.

Este artículo se publicó en la revista mexicana "Mexican Journal of Biotechnology" 1(2):48-56. (2016). En seguimiento al trabajo que se presentó en el II Encuentro Internacional sobre Biotecnología, realizado el 9 de Diciembre de 2015 en el estado de Tlaxcala.

## Molecular characterization of pathogenic bacteria by pulsed field-gel electrophoresis (PFGE)

### Caracterización molecular de bacterias patógenas mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Gaspar Morales-Romero<sup>1\*</sup>, Paulina Fabiola Rodríguez-Flores<sup>2</sup>, Aida Bejar-Ubaldo<sup>2</sup>, Irving Eduardo Jácome-Galarza<sup>3</sup>, Juan Luis Jaime Sánchez<sup>3</sup>, Gloria Alicia Figueroa-Aguilar<sup>3</sup>, Juan José Valdez-Alarcón<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. <sup>2</sup>Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán; <sup>3</sup>Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán. [gmr\\_0123@hotmail.com](mailto:gmr_0123@hotmail.com)

#### ABSTRACT

The growing need for surveillance of re-emerging infectious diseases necessitates the application of molecular characterization methods such as Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). In the first collection, analysis macrorestriction *S. aureus* reveals a medium frequency (0.54) of pulsetype II, compared to the second collection where increased genetic heterogeneity exists. *S. enterica* presented some identical pulsotypes and other pulsotypes presented a genetic diversity (DI = 0.95), which suggests that there is epidemiological unrelated, with pulsetypes to particles serotypes. In addition, this study will help us create our database according to the PulseNet International Center for Disease Control and Prevention (CDC, USA).

Keywords: infections, Electrophoresis, Epidemiology, Pulse-types.

#### RESUMEN

La creciente necesidad de vigilancia de las enfermedades infecciosas re-emergentes hace necesario la aplicación de métodos moleculares de caracterización como la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados-PFGE. En la primera colecta, el análisis de macrorrestricción de *S. aureus* revela una frecuencia media (0.54) del pulsotipo II, en comparación a la segunda colecta donde se observa una mayor heterogeneidad genética. *S. enterica* presentó algunos pulsotipos idénticos y otros pulsotipos presentaron una diversidad genética (DI=0.95), lo que nos sugiere, que no existe una relación epidemiológica con pulsotipos o serotipos particulares. Además, este estudio nos ayudara a crear nuestra base de datos de acuerdo a la PulseNet International del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA).