



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"

División de Estudios de Posgrado

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS:

Elementos Repetitivos para el análisis de Diversidad Genética de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de productos cárnicos y lácteos del Estado de Michoacán.

PRESENTA:

QFB. ELDA GABRIELA VÁZQUEZ NARVÁEZ

DIRECTORA DE TESIS:

D.C MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS.

CO-DIRECTOR DE TESIS:

D.C GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

Morelia, Mich., Julio 2012

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, bajo la dirección de la D en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y el Dr. Gerardo Vázquez Marrufo. Se contó con el apoyo del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT al proyecto “Marcadores genético-moleculares para el diagnóstico y el análisis de diversidad de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y lácteos” con clave SALUD-2009-01-11517

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios por poner en mi camino a personas valiosas en mi vida.

A mis padres Jorge y Elda por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.

A mi hermano Jorge a quien admiro y quien siempre ha compartido mis deseos de superación.

A mi esposo Raúl, por apoyar mis sueños, gracias por tu infinita paciencia y amor, a mis hijos Raúl y Ana Gaby por motivarme a seguir siempre adelante.

A mis directores de tesis la D. en C Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas al D. en C Gerardo Vázquez Marrufo por brindarme sus conocimientos, su tiempo, su infinita paciencia y valiosa amistad.

A mis sinodales la D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza, la D. en C Virginia Robinson Fuentes y el D. en C Omar Chassin Noria, por sus valiosas observaciones para el desarrollo de este trabajo.

A mis profesores por todas sus enseñanzas.

A mis compañeros y Amigos del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana Aracely, Silvia, Margarita, Saila, Andrei, Carmen, Mar, Abraham, Edgar con quienes he compartido momentos que siempre llevaré en mi memoria, en especial a Ana por brindarme sus conocimientos y tiempo de manera incondicional, siempre con una sonrisa, a Nallely y Mina por su apoyo para la presentación de este trabajo.

Gracias a todos, los que de un modo u otro estuvieron cerca de mí para poder realizar este sueño que hoy es una realidad.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

RESISVET: Resistencia veterinaria.

FOODNET: The Foodborne Disease Active Surveillance Network

CDC: Centers for disease Control and prevention.

WHO: World Health Organization.

ADN: Ácido Desoxiribonucleico.

PFGE: Electroforesis de campos pulsados

RAPD: Amplificación al azar de patrones polimórficos.

ERIC: Secuencias consenso intergénicas de enterobacterias.

REP: Elementos repetitivos palindrómicos.

BOX: Elementos repetitivos en mosaico.

PB: Pares de bases.

M: Marcador de peso molecular.

SDS: Dodecilsulfato de sodio.

°C: Grado Celsius.

μL: microlitro.

mL: mililitro.

g: gramos.

v/v: Relación volumen/volumen

%: porcentaje

INDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	2
I.1. GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>SALMONELLA</i>	2
<i>I.1.1. Características bioquímicas.....</i>	<i>2</i>
<i>I.1.2. Distribución.....</i>	<i>2</i>
<i>I.1.3. Características antigénicas.....</i>	<i>2</i>
I.2. CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>SALMONELLA</i>	4
1.3. EPIDEMIOLOGÍA DE INFECCIONES CAUSADAS POR <i>S. ENTERICA</i>	5
I.4. SECUENCIAS REPETITIVAS INTERCALADAS EN EL GENOMA BACTERIANO	7
<i>I.4.1. Secuencias REP.....</i>	<i>9</i>
<i>I.4.2. Consenso Intergénico Repetitivo de Enterobacterias (ERIC).....</i>	<i>10</i>
<i>I.4.3. Elementos BOX.....</i>	<i>12</i>
I.5. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	13
<i>I.5.1. Identificación microbiológica y serológica.....</i>	<i>13</i>
<i>I.5.2. Identificación genético molecular.....</i>	<i>13</i>
II. ANTECEDENTES.....	17
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. HIPOTESIS.....	24
V. OBJETIVOS	24
V.1. OBJETIVO GENERAL	24
V.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO	25
VI.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	26
VI.3. ENSAYOS REP-PCR	26
<i>VI.3.1. Ensayo ERIC-PCR.....</i>	<i>26</i>
<i>VI.3.2. Ensayo BOX-PCR.....</i>	<i>27</i>
<i>VI.3.3. Ensayo REP-PCR.....</i>	<i>27</i>
VI.4. ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE BANDEO.....	27
VI.5. ELABORACIÓN DE DENDOGRAMAS.....	28

VI.6. PRUEBA DE MANTEL.....	28
VII. RESULTADOS	30
VII.1. ADN EXTRAÍDO DE LAS CEPAS DE ESTUDIO	30
VII.2. RESULTADOS DEL ENSAYO BOX-PCR.....	30
VII.3. RESULTADOS DEL ENSAYO REP-PCR.....	33
VII.4. RESULTADOS DEL ENSAYO ERIC-PCR.	35
VII.5 RESULTADOS OBTENIDOS DE LA COMBINACIÓN DE LOS ENSAYOS DE ERIC-PCR, REP-PCR Y BOX-PCR.	37
VII.6. ANÁLISIS DE LOS SEROTIPOS MAYORITARIOS.....	40
VII.7. CORRELACIÓN ENTRE DISTANCIA GENÉTICA Y DISTANCIA GEOGRÁFICA.	44
VIII. DISCUSIÓN.....	46
IX. CONCLUSIONES	52
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
XI ANEXOS.....	59
XI.1 MATRIZ BINARIA DEL ENSAYO ERIC	59
XI.2 MATRIZ BINARIA DEL ENSAYO REP	60
XI.3 MATRIZ BINARIA DEL ENSAYO BOX	61

INDICE DE FIGURAS

1	Antígenos somáticos y flagelares.....	3
2	Elementos repetitivos en el cromosoma bacteriano.....	8
3	Secuencia REP.....	9
4	Secuencia ERIC.....	11
5	Secuencia BOX.....	13
6	Número de cepas de <i>Salmonella enterica</i> obtenidas en los distintos tipos de alimentos muestreados en el estado de Michoacán, 2008 y 2009.....	19
7	Dendograma generado a partir de los ensayos de amplificación RAPD de las cepas de <i>S. enterica</i> aisladas.....	20
8	Dendograma generado en base al ensayo RAPD de los aislados del serotipo Typhimurium.....	21
9	ADN extraído de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en estudio.....	30
10	Patrones de bandeo obtenidos con el ensayo BOX-PCR.....	31
11	Dendograma generado a partir de los ensayos de BOX-PCR de las cepas de <i>S. enterica</i>	32
12	Patrones de bandeo obtenidos con el ensayo REP-PCR.....	33
13	Dendograma generado a partir de los ensayos de REP-PCR.....	34
14	Patrones obtenidos con el ensayo ERIC-PCR.....	35
15	Dendograma generado a partir de los ensayos de amplificación ERIC-PCR.....	36
16	Dendograma generado a partir de los amplicones obtenidos con los ensayos ERIC-PCR, BOX-PCR y REP-PCR.	39
17	Dendograma generado para las cepas de <i>S. Tiphymurim</i>	40
18	Dendograma generado para las cepas de <i>S. Anatum</i>	42
19	Dendograma generado para las cepas de <i>S. Agona</i>	43
20	Correlación entre distancia genética y distancia geográfica.....	44

INDICE DE TABLAS

1	Jurisdicciones Sanitarias y municipios que las componen en el estado de Michoacán....	18
2	Cepas utilizadas en este trabajo	25
3	Genotipos de los aislados de <i>Salmonella enterica</i>	38
4	Cepas con relación entre localidad jurisdicción y tipo de alimento	41
5	Genotipos de los serotipos mayoritarios.....	43

RESUMEN

Salmonella es considerado en la actualidad como un patógeno emergente debido al aumento en los últimos años en el aislamiento de esta bacteria a partir de alimentos contaminados de origen animal. El control de la salmonelosis requiere de métodos que permitan una detección oportuna y tipificación adecuada del agente causal. Entre estos métodos se encuentran los ensayos de amplificación rep-PCR (REP-PCR, ERIC-PCR y BOX-PCR), basados en elementos o secuencias repetitivas de ADN, presentes en múltiples copias en distintas posiciones intergénicas del genoma bacteriano. La combinación de estos métodos permite discriminar hasta el nivel de genotipo, dato útil en la detección de brotes, fuentes de contaminación o alimentos de alto riesgo. El objetivo de este trabajo fue determinar los genotipos presentes en 102 cepas de *Salmonella enterica* aisladas de 8,856 muestras de productos cárnicos y lácteos del estado de Michoacán, México obtenidas en 2008 y 2009. Para los ensayos de rep-PCR se utilizaron los iniciadores REP 1R-I/REP 2-I; ERIC IR-2/ERIC 2 Y BOX A1R, las bandas se detectaron con el software "Quantity One" y los dendogramas se generaron con el software PAST. Se obtuvieron entre 3 y 14 bandas (350 pb- 8 Kb) por cepa para BOX, 3 a 14 bandas (200 pb- 10.5 Kb) por cepa para REP y de 3 a 13 bandas (50pb a 5 Kb) para ERIC. De los tres marcadores, el ensayo ERIC mostró tener un mayor poder de discriminación ya que permitió ordenar a las cepas en 4 grupos y 24 genotipos a un corte de 95% de similitud, con un índice de discriminación (D) de 0.959. El valor de D obtenido al combinar el análisis de los tres marcadores fue de 0.984. Los patrones de agrupamiento generados no mostraron relación entre el genotipo y el serotipo, encontrándose cepas de distintos serotipos dentro de un mismo genotipo. Al analizar los genotipos de los serotipos mayoritarios se encontró que para el caso de los serotipos Typhimurium y Anatum, hay genotipos con una amplia distribución en el estado de Michoacán, lo que indica una gran capacidad de dispersión de estos. La prueba de Mantel reveló que no existe relación entre la distancia geográfica y la distancia genética de los aislados analizados. Los resultados del presente trabajo muestran la importancia de evaluar las relaciones genéticas en cepas de *S. enterica* en el estado de Michoacán con la finalidad de optimizar los programas de vigilancia y prevención epidemiológica.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades del género *Salmonella*

I.1.1. Características bioquímicas

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* son bacilos Gram negativos no esporulados de la familia *Enterobacteriaceae*, son móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos, no fermentan la lactosa y la mayoría produce ácido sulfhídrico y gas por la fermentación de la glucosa. Además, son oxidasa y catalasa negativas y reducen nitratos a nitritos. Son capaces de tolerar concentraciones más altas de bilis que la mayor parte de los bacilos entéricos, propiedad aprovechada para los medios de aislamiento. Pueden sobrevivir por varios días a temperatura ambiente en materia fecal, agua y alimentos descompuestos (Huerta, 2003).

I.1.2. Distribución

El género *Salmonella* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y existe en el aparato digestivo de seres humanos, animales domésticos, mamíferos silvestres, reptiles, aves e insectos. *Salmonella* se presenta en todo el mundo variando su frecuencia de un país a otro, adquiriendo importancia relevante en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuadas, ni cuentan con medidas de salud pública. Dichos padecimientos afectan a todos los grupos de edad, sin embargo se observa mayormente en niños y en población de la tercera edad (Huerta, 2003).

I.1.3. Características antigénicas

Los microorganismos expresan una gran variedad de antígenos presentes en distintas estructuras celulares como la pared, la cápsula y las fimbrias, aunque los antígenos también pueden ser productos de excreción, como exotoxinas y enzimas extracelulares. *Salmonella* es un microorganismo complejo que produce cierto número de factores de virulencia, entre los que podemos mencionar están los antígenos de superficie, invasividad, endotoxinas, enterotoxinas y supervivencia intracelular entre otras.

Químicamente los antígenos (Ag) pueden ser proteínas, hidratos de carbono y complejos de polipéptidos y carbohidratos. Como son moléculas complejas, tienen más de una subestructura que

puede servir como determinante antigénico. Debido a esto en los sueros inmunes se encuentran anticuerpos que reaccionan contra distintos determinantes antigénicos de la misma molécula. La base de la serotipificación para todas las Enterobacterias es similar, e involucra la detección de antígenos somáticos, capsulares y flagelares. En el caso de *Salmonella*, las serovariedades surgen como consecuencia de una asociación particular de factores somáticos O y flagelares H, (Fig. 1) (Caffer, 2001).

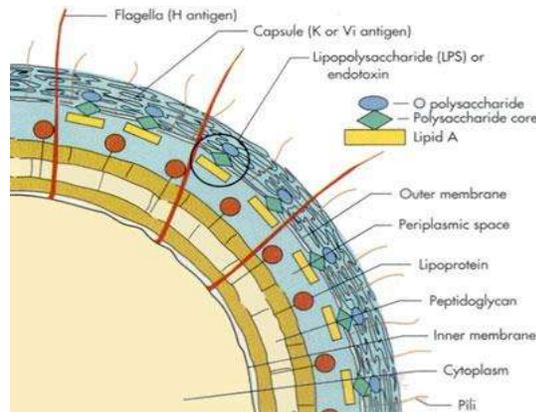


Figura 1. Antígenos somáticos y flagelares

a) Antígenos Somáticos

Como otras Enterobacterias, *Salmonella* tiene antígenos somáticos O, formados por fosfolípidos y polisacáridos de la pared celular y su composición es aproximadamente: 60% de polisacáridos, 20-30 % de lípidos y 3.5 - 4 % de hexosamina. Son cadenas laterales de polisacáridos de envoltura (LPS) que se encuentran en todas las bacterias Gram negativas. La cadena de polisacáridos del Ag O es una cadena de unidades repetitivas de oligosacáridos de 3 a 5 azúcares de cadenas lineales o ramificadas. La naturaleza de los grupos y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica. Como esta estructura difiere ampliamente en las distintas serovariedades, hay diferencias en la especificidad somática O de la bacteria. Estos antígenos son termoestables y resistentes a ácidos diluidos y alcoholes.

b) Antígenos de superficie

A los antígenos de superficie K también se les denomina capsulares y comprenden a los antígenos que se encuentran en la cápsula, el más importante es el Vi que se encuentra en *S. Typhi* y *S. Paratyphi* y algunas cepas de *S. Dublin*. Hay aproximadamente 60 antígenos O que se

denominan con números y letras. El esquema de Kauffman-White clasifica a las distintas variedades de *Salmonella* sobre la base de antígenos somáticos, teniendo cada grupo un determinante mayor, que es un antígeno somático que reacciona en forma fuerte y uno o más antígenos somáticos menores. La identificación de serotipos específicos de acuerdo con el esquema de Kauffman- White requiere también la definición de antígenos flagelares de las fases 1 y 2 (Caffer, 2001).

c) Antígenos Flagelares H

El antígeno H es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión “gancho” y un filamento. El “gancho” une el cuerpo basal con el filamento. En la serotipificación flagelar de *Salmonella* se usa solamente la especificidad antigénica del filamento. El filamento está constituido por flagelina, proteína de alto peso molecular. Se han encontrado más de 60 proteínas flagelares con distintas especificidades antigénicas, las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones de la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de flagelina. Estos antígenos son sensibles al calor. Unas pocas variedades de *Salmonella* poseen una sola fase flagelar, estas cepas se llaman monofásicas, por ejemplo *S. Enteritidis* (9, 12:g,m:-) y *S. Typhi* (9,12 Vi]: d:-. La gran mayoría posee dos especificidades en su antígeno flagelar, o sea, son cepas difásicas por ejemplo *Salmonella* Typhimurium (1,4;5,12:1,2) y *S. Hadar* (6,8:Z10.e,n,x) expresan la fase 1 (identificadas por los ejemplos por las fases i ó z10 y la fase 2(por las fases 1 y 2 y e, n, x respectivamente (Caffer, 2001).

I.2. Clasificación del género *Salmonella*

Estudios de hibridación de ADN han demostrado que el género *Salmonella* está constituido por dos especies: *Salmonella enterica* y *S. bongori*. La especie *S. enterica* está compuesta por seis subespecies que son: *S. enterica* (I), *S. arizonae* (IIIa), *S. diarizonae* (IIIb), *S. houtenae* (IV), *S. salamae* (II) y *S. indica* (VI). La especie de *S. bongori* sólo posee la subespecie V (Popoff, 2004). En la actualidad se han descrito más de 2 500 serotipos de *Salmonella*, encontrándose el 99% de estos dentro de la especie *S. enterica* subespecie *enterica*, la cual contiene la mayoría de los serotipos que son patógenos de humano (Popoff *et al.*, 2001; Grimont y Weill, 2007).

1.3. Epidemiología de infecciones causadas por *S. enterica*

Las enfermedades diarreicas agudas son muy comunes en todo el mundo, ocasionando alrededor de 1.8 millones de muertes infantiles anualmente, principalmente en países en vías de desarrollo (WHO, 2002). Un alto porcentaje de las enfermedades diarreicas son originadas por alimentos contaminados. Uno de los agentes patógenos comúnmente asociado a alimentos contaminados es *Salmonella spp.* (WHO, 2008).

Salmonella se transmite al ser humano por vía fecal - oral mediante alimentos o agua contaminados. Debido a que *Salmonella* es sensible al ácido gástrico, resulta necesario un inóculo grande que consta de 10⁶ bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática. Sin embargo, la dosis infecciosa necesaria es menor en individuos con factores de riesgo como inmunodepresión o procesos subyacentes como linfoma, leucemia, drepanocitosis, la edad, o disminución de la acidez gástrica (Huerta, 2003).

En los EE.UU han desarrollado una red denominada The Foodborne Disease Active Surveillance Network (FoodNet), debido a que las enfermedades transmitidas por alimentos forman parte del Programa de enfermedades emergentes infecciosas del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC, por sus siglas en inglés). Esta red de vigilancia se desarrolló en 1986 y constituye un modelo para conducir un programa de vigilancia, además de ser una institución específica para la realización de estudios, el análisis de datos y la investigación de brotes y epidemias.

Salmonella Typhimurium DT 104, un serotipo resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfamidas y tetraciclinas, causa una morbilidad y mortalidad mayores que el resto de los serotipos. En países en desarrollo provoca aproximadamente 22 millones de casos de fiebre tifoidea anualmente, con 220 000 muertes anualmente (Crump *et al.*, 2004; Parry, 2004).

Según datos de la Autoridad de Seguridad Alimentaria en Europa (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf>), en el 2008 la Salmonelosis fue la segunda enfermedad zoonótica más frecuente en humanos, causando aproximadamente 131 468 casos confirmados. Los casos más frecuentes por salmonelosis se han detectado en niños entre 0 y 4 años. La causa principal de esta enfermedad es por infección alimentaria, siendo *Salmonella*, después de *Campylobacter*, el patógeno con mayor frecuencia relacionado con enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Los alimentos con mayor incidencia por este patógeno son los

huevos, con un 23.1% en huevos crudos y alimentos preparados con huevo, seguido de carnes crudas de pollo, pavo, cerdo y res con una incidencia de 5.1%, 5.6%, 0.7% y 0.2% respectivamente. En el caso de los quesos, para ese año la incidencia de *Salmonella* fue menor al 1 %. En frutas, vegetales y yerbas el dato correspondiente fue 0.7%, mientras que en mariscos se detectó menos del 1%. En relación a la época del año, los meses con mayor incidencia de salmonelosis fueron de Junio a Octubre. En Estados Unidos *Salmonella enterica* es la principal bacteria causante de ETAs (FDA, 2009).

En México las enfermedades diarreicas constituyen casi la mitad de las infecciones en niños, en Michoacán la tasa de mortalidad es de 26 de cada 100000 niños menores de 5 años. La red de vigilancia de *Salmonella* en México, RESISVET, informa un aislamiento de *Salmonella* del 12.3% en muestras de diarreas en hospitales y 5.35% en niños asintomáticos (Zaidi *et al.*, 2008).

La salmonelosis puede manifestarse mediante distintos síndromes que incluyen gastroenteritis, bacteriemia, fiebre tifoidea e infecciones localizadas en distintas áreas del cuerpo (Darwin y Miller, 1999). La manifestación más común de salmonelosis no tifoidea es una gastroenteritis de leve a moderada, con presentación de diarrea, dolor abdominal, vómito y fiebre. Los síntomas de gastroenteritis aparecen normalmente entre las 6 a 72 h después de ingerir alimentos contaminados con la bacteria (Pegues *et al.*, 2005) y aunque pueden remitir en un lapso de 6 a 7 días, se puede desarrollar septicemia e infecciones invasivas de órganos originando problemas de salud más serios como osteomielitis, neumonía y meningitis (Cohen *et al.*, 1987).

Los grupos sociales más susceptibles a estas manifestaciones severas de la enfermedad son los niños, los adultos mayores y las personas inmunocomprometidas, las cuales requieren de terapia antimicrobiana para superar la enfermedad (Beenson y Chin, 1995). La salmonelosis es una enfermedad transmitida por alimentos contaminados que ha sido reportada durante décadas; sin embargo, dicho padecimiento se considera emergente debido en gran parte al consumo de alimentos contaminados de origen animal que incluye pollos y huevo (WHO, 2002). Entre los factores que han contribuido a esta situación se encuentran la globalización del tráfico de alimentos y la introducción accidental de patógenos en nuevas áreas geográficas. También se han considerado los cambios en las poblaciones microbianas, lo que permite que surjan cepas más virulentas y con resistencia a antibióticos o con la capacidad de sobrevivir en condiciones adversas. Otro factor importante es la movilidad internacional de personas expuestas a patógenos; por ejemplo, se estima que cerca del

90% de los casos de salmonelosis que se presentan en Suecia son importados de viajeros que fueron a lugares de alta incidencia del patógeno.

En México, los estudios sobre *Salmonella* y su importancia en la Salud Pública se han enfocado principalmente en registrar la incidencia de ésta en casos de diarrea, así como a distinguir los serotipos más frecuentes. En un primer reporte se encontró que el serotipo más común encontrado en los pacientes ingresados en los Servicios de Salud Pública, sin distinción de edad, fue *S. Typhimurium*, mientras que el menos frecuente fue *S. Ohio* (Gutiérrez- Gogco et al., 2000).

I.4. Secuencias repetitivas intercaladas en el genoma bacteriano

En 1968 estudios de la cinética de la renaturalización del ADN se observó un gran número de secuencias repetidas en porciones de genomas eucarióticos (Britten y Kohne, 1968). En la actualidad se conocen un gran número de elementos repetitivos en otros genomas procarióticos, algunos de los cuales son de varias kbp de largo y pueden tener secuencias idénticas de nucleótidos y están presentes en un bajo número de copias. Tales duplicaciones incluyen operones que codifican para subunidades de RNA ribosomal, genes para otras funciones celulares esenciales, secuencias de inserción, transposones, genes simbióticos para fijación de nitrógeno, etc. Durante los últimos 15 años se han encontrado un gran número de secuencias repetitivas intercaladas (menos de 500 bp) en múltiples sitios en el genoma de especies de distintos grupos biológicos. Estos elementos ocupan por arriba del 5% del genoma y han sido localizados en regiones intergénicas y extragénicas. Estas secuencias se han encontrado también en numerosos procariotes, incluyendo cianobacterias, *Neisseria spp.*, *Mycobacterim spp.*, *Bordetella pertussis*, *Rhodomicrobium vannielli* *Agrobacterium spp.* y *Rhizobium spp.* (Bruijnn et al., 1999).

Las secuencias relativamente cortas de polinucleótidos representan secuencias altamente repetitivas en genomas procarióticos. El más común es el TGG encontrado en *Escherichia coli*, fagos, virus y genomas eucarióticos. Estas secuencias cortas con funciones biológicas conocidas podrían ser preservadas por selección natural. Las secuencias repetidas en tándem representan elementos largos y que también están altamente repetidas en el genoma bacteriano entre ellas se encuentran se encuentran el poly- trinucleótido, (GTG)₅ o (GCC)₅, los cuales están altamente repetidos en el genoma de *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* y *Shigella sp.* La mayor secuencia polimórfica en tándem (MTPR) está presente en clusters separados por 5-pb en el cromosoma de micobacterias (Bruijn et al., 1999).

Varios genomas bacterianos incluyen elementos repetitivos cortos (menos de 200 bp) y se encuentran generalmente en el extremo 3' de las unidades de transcripción (Fig. 2).

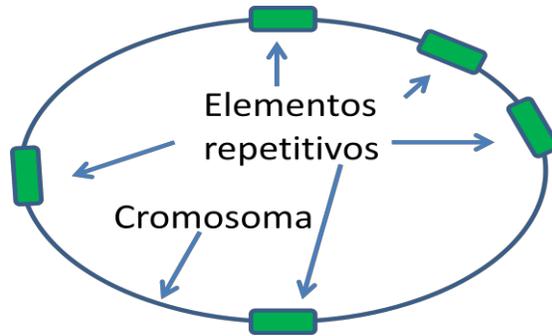


Figura 2. Elementos repetitivos en el cromosoma bacteriano

I.4.1. Secuencias REP

Los primeros elementos repetitivos descritos y extensamente estudiados fueron los palíndromos extragénicos repetitivos (REP por sus siglas en inglés) en *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* (Higgins *et al.*, 1982) o como PU (Palindromic Unit) (Gilson *et al.*, 1984). La secuencia REP fue identificada por la comparación de secuencias de ADN de regiones intergénicas de diferentes operones (Higgins *et al.*, 1982).

Los elementos REP consisten en 38 secuencias consenso palindrómicas (Fig. 3) que pueden formar una estructura estable de tallo – asa, con un asa variable de 5-pb en el centro de la secuencia consenso (Stern *et al.*, 1984). Las secuencias REP están frecuentemente presentes en clusters en el genoma de *E. coli* por la extrapolación de datos disponibles en su secuencia genómica (Dimri *et al.*, 1992), se han calculado más de 500 secuencias individuales de REP en 259 elementos REP en el cromosoma de *E. coli*. Esta frecuencia de repetición corresponde a un elemento REP por cada 10 genes. Las localizaciones entre las secuencias REP varían entre cepas de *E. coli*, lo que permite observar los diversos patrones de fingerprinting producidos mediante la amplificación por PCR con los iniciadores complementarios a REP (Versalovic *et al.*, 1995). Las posibles funciones de las secuencias REP incluyen la regulación de la expresión de genes por el control de la estabilidad del RNAm (Newbury *et al.*, 1987 Higgins *et al.*, 1988) y la estabilización de la estructura del cromosoma (Gilson *et al.*, 1990; Yang y Ames, 1988; Yang y Ames, 1990).



Figura 3. Secuencia REP

La función de los elementos REP no está completamente determinada pero hay importantes procesos en los cuales están involucrados. Se propuso que las secuencias REP eran atenuadores transcripcionales aunque más tarde se determinó que no son terminadores específicos. Basados en su papel como estabilizadores del RNAm, se ha sugerido que los elementos REP están involucrados en la expresión apropiada del gen. Las secuencias REP son sitios de unión para la ADN polimerasa, para la ADN girasa y para la integración del Host Factor (IHF), los cuales juegan un papel clave en la

fisiología del ADN bacteriano. También hay algunos casos en los cuales las secuencia REP aparecen como blancos para eventos de transposición y recombinación, en este sentido se ha visto que las secuencias IS1397 e IS621 se insertan específicamente en las secuencias de *Escherichia coli* y que ISKpn1 se inserta dentro de las secuencias REP de *Klebsiella pneumoniae*. Las secuencias REP también aparecen como uniones de recombinación del fago lambda y la amplificación del plásmido F_128 es iniciado por la combinación REP-REP (Tobes y Pareja, 2006). Los elementos REP son sitios de unión para reguladores globales y comparten características comunes tales como tamaño, estructura palindrómica y múltiples sitios en el espacio extragenómico del genoma, lejos de sus genes correspondientes.

1.4.2. Consenso Intergénico Repetitivo de Enterobacterias (ERIC)

En 1990 se reportó el descubrimiento de un novedoso grupo de secuencias altamente conservadas de ADN dentro de las regiones intergénicas de *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* y otras bacterias. Esas unidades repetitivas intergénicas (IRUs) tienen de 124 a 127 nucleótidos y tienen la capacidad de formar estructuras de tallo-lazo (Sharples y Lloyd, 1990). Esos elementos repetitivos son conocidos como ERIC, por sus siglas en inglés (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*). Demostrando su utilidad para la rápida identificación de especies y cepas bacterianas y para el análisis del genoma procariótico (Versalovic *et al.*, 1991).

Las secuencias ERIC son una clase de elementos repetitivos en el ADN de enterobacterias de 126 bp. Una investigación en la secuencia del ADN de la base de datos de GeneBank identificó 17 secuencias bacterianas que mostraban un alto grado de similitud al final del extremo 3' de la secuencia *tls*. Ocho de esas secuencias se encontraron en *E. coli*, 5 en *S. Typhimurium*, dos en *Yersinia pseudotuberculosis* y una de *Vibrio cholerae* y *Klebsiella pneumoniae* (Sharps y Lloyd, 1990). Las secuencias ERIC tienen una secuencia invertida repetida que puede tener el potencial de formar estructuras tallo-asa cuando se transcribe el RNA. Aunque todos los ERICs incluyen esa secuencia puede variar entre estos. Los sitios conservados están distribuidos a lo largo de la secuencia ERIC, pero se encuentran más frecuente dentro de una región de simetría dada (Fig. 4).



Figura 4. Secuencia ERIC

Los ERICs se encuentran en regiones cercanas a los genes y no correlacionan con la función de una unidad de transcripción y se encuentran fuera de los marcos de lectura abiertos y están siempre localizados en secuencias transcritas o en regiones intercistrónicas de operones policistrónicos entre el promotor y el gen estructural o en secuencias 3' no traducidas por lo que se sugiere que los ERICs pueden estar exclusivamente localizados en regiones transcritas del genoma, además pueden encontrarse en cualquier orientación con respecto a la dirección de la transcripción (Hulton *et al.*, 1991).

Algunas de las similitudes entre las secuencias REP y ERIC observadas en *E. coli* y *S. Typhimurium* son: (i) ambas están localizadas en regiones transcritas no codificantes del cromosoma, (ii) la localización cromosomal difiere entre especies, (iii) ambas pueden encontrarse en cualquier orientación con respecto de la transcripción, y (iv) ambas incluyen una secuencia conservada invertida repetida con potencial de formar estructuras tallo-asa. Algunas diferencias entre REPs y ERICs: (i) las secuencias REP son mucho más cortas (33 pb comparadas con 126 bp), (ii) múltiples secuencias REP se encuentran localizados frecuentemente en cromosomas individuales mientras que en los ERICs no ocurre así. (iii) al menos en *E. coli* el número estimado de secuencias REP por cromosoma es al menos 10 veces más que en ERIC.

Los elementos repetitivos intercalados pueden ser clusters en estructuras de mosaicos complejos que incluye la combinación de diferentes elementos repetitivos. Bacterial Interspersed Mosaic Elements (BIME) fueron descritas (Gilson *et al.*, 1991 a, 1991 b). Aproximadamente 500 de esos mosaicos fueron encontrados en el genoma de *E. coli*. Esos elementos BIME están conservados en otras bacterias Gram negativas tales como *Klebsiella pneumoniae* (Bachelier *et al.*, 1993). Cada BIME estaba exclusivamente compuesto por una combinación de REPs y otros 7 elementos repetitivos.

I.4.3. Elementos BOX

Otros ejemplos de elementos en mosaico incluyen REP-MP1 y BOX. REP MP-1 existe como un elemento núcleo de 300-bp flanqueado por secuencias cortas repetitivas en el genoma de *Mycoplama pneumoniae* (Forsyth y Geary, 1996). Estos elementos no están relacionados con las dos familias más representativas de secuencias repetitivas de ADN presentes en el genoma de Enterobacterias. Las secuencias BOX tienen el potencial de formar estructuras estables de tallo-asa y una de esas al menos es transcrita. La mayoría de esos elementos están localizados junto a genes que su producto ha sido implicado en algunas de las etapas del proceso de transformación genética o en virulencia de *S. pneumoniae*. Esta localización indica la posibilidad que las secuencias BOX sean elementos regulatorios compartidos por varios genes controladores, incluyendo competencia-especificidad y virulencia-relacionada a genes (Martin *et al.*, 1992). Las secuencias de los elementos BOX son totalmente diferentes a las secuencias repetitivas procarioticas REP y ERIC, aunque son similares con respecto al tamaño, número de copias y su potencial de formar estructuras tallo-asa (Koeuth *et al.*, 1995).

Los elementos BOX están en forma modular en la naturaleza y representan el primer elemento repetitivo encontrado en una bacteria Gram positiva, que fue *Streptococcus pneumoniae* (Martin *et al.*, 1992). Como muestra la figura 5, los elementos BOX constan de 3 subunidades box A (59 bp), box B (45 bp) y box C (50 bp). Los elementos BOX son una combinación de subunidades repetitivas encontrándose todos presentes en el genoma de *S. pneumoniae*. Se demostró una amplia conservación de la subunidad box A entre diversas bacterias (Koueth *et al.*, 1995). Organismos no relacionados con patógenos Gram positivos, tales como *E. coli* y *Salmonella Typhimurium* contienen múltiples copias de boxA como subsecuencias dispersas en sus respectivos genomas.

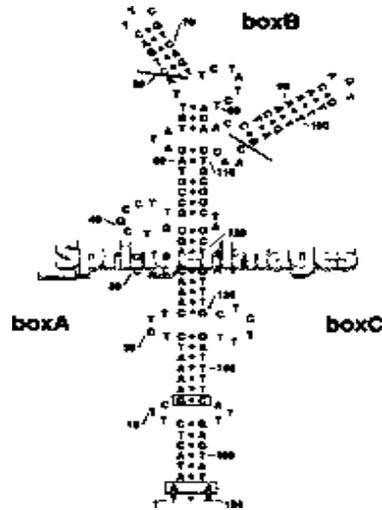


Figura 5. Secuencia BOX

1.5. Métodos de identificación de *Salmonella enterica*

1.5.1. Identificación microbiológica y serológica

La identificación de *Salmonella* se realiza comúnmente mediante el cultivo en medios selectivos, seguido de la realización de pruebas bioquímicas (descritos en el punto 1.1.1), y pruebas inmunológicas, proceso que puede tardar de 5 a 7 días.

La serotipificación constituye un complemento importante de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, también es de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión. El uso de las reacciones antígeno – anticuerpo para la serotipificación de bacterias se basa en que los microorganismos presentan diferencias en su constitución antigénica, aún entre grupos de microorganismos relacionados.

1.5.2. Identificación genético molecular

a) Amplificación de regiones específicas

En el caso de las técnicas genético moleculares aplicadas a la tipificación de aislados de *Salmonella*, la especificidad de los iniciadores diseñados ha ido mejorando con el tiempo, lo que ha originado ensayos de PCR más selectivos. Así, pares de iniciadores dirigidos al gen de la subunidad

16S de RNA ribosomal, y al gen *stn* que codifica para la enterotoxina y al operón del transporte de histidina, han mostrado una alta especificidad hacia *Salmonella* (Ziemer y Steadham, 2003).

Esta especificidad también se ha observado con iniciadores dirigidos al gen *fimY*, el cual es uno de los genes involucrados con proteínas de fimbria de la membrana extracelular (Yeh *et al.*, 2002). El ensayo de PCR en tiempo real con iniciadores dirigidos a distintas regiones genéticas ha sido empleado para la detección de *Salmonella* en alimentos de origen animal, incluyendo productos cárnicos y leche (Malormy *et al.*, 2004; Karns *et al.*, 2005; Josefén *et al.*, 2007). Una de las ventajas de la PCR en tiempo real sobre la PCR convencional es la posibilidad de cuantificar la carga bacteriana de una muestra (Malormy *et al.*, 2008). No obstante, los protocolos en tiempo real presentan un tiempo de ejecución semejante al descrito anteriormente para varios protocolos de PCR convencional. En la actualidad, las técnicas de biología molecular más empleadas para el establecimiento de diferencias genéticas entre aislados de *Salmonella*, son la electroforesis en geles de campo pulsante (PFGE, por sus siglas en inglés) y aquellas basadas en el ensayo de PCR. Esta técnica ha sido aceptada como el estándar de oro para la genotipificación de aislados de *Salmonella* por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos (Cimons, 2000) y es recomendado por la Organización de la Salud para estudios epidemiológicos de enfermedades y brotes ocasionados por alimentos contaminados (WHO, 2008). Existen distintos trabajos que reportan el uso de PFGE aplicado al análisis de relaciones genéticas entre aislados de *Salmonella* (Murakami *et al.*, 1999; Liebana *et al.*, 2001; Perron *et al.*, 2007). No obstante que la técnica de PFGE ha mostrado un gran poder de discriminación en diferentes serotipos de *S. enterica*, también se han documentado casos en los que no se ha podido distinguir entre aislados del serotipo Enteritidis (Liebana, 2002).

b) Tipificación basada en la amplificación de elementos repetitivos (rep-PCR)

Las técnicas de secuencias repetitivas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (rep-PCR) fue introducida por Versalovic *et al.* (1991).

Estas técnicas pueden discriminar cepas a nivel de cepa debido a la distribución de esos elementos en los genomas de varios miembros de Eubacterias e incluyen la amplificación de elementos REP, ERIC y BOX. Estos métodos están basados en la amplificación de las secuencias de ADN por PCR con un grupo de iniciadores complementarios y secuencias altamente conservadas repetitivas de ADN presentes en múltiples copias en distintas posiciones intergénicas en el genoma

de la mayoría de las bacterias Gram negativas y varias de las Gram positivas (Oliveira., *et al* 2007). Estas técnicas utilizan múltiples amplicones de ADN de diferentes tamaños, que contienen una secuencia única de un segmento cromosomal que se localiza entre las secuencias repetitivas, el último de los cuales es complementario a los iniciadores de la secuencia repetitiva (Versalovic *et al.*, 1991).

Los amplicones de diferentes tamaños son separados por electroforesis generando patrones de bandeo específicos para clonas bacterianas individuales. El propósito de las técnicas rep-PCR es diferenciar las cepas bacterianas a partir de cantidades de muestra relativamente pequeñas, una vez que los patrones son obtenidos, la interpretación de los resultados es conocer si las cepas están relacionadas clonalmente o son diferentes. En un estudio donde se compararon 4 métodos moleculares para la diferenciación de *Salmonella* sp, se encontró que la combinación de RAPD y ERIC ofrece un mejor poder de discriminación de cepas de *Salmonella* así que esa combinación de procedimientos se pueden recomendar para estudios de laboratorios no especializados ya que son fáciles de desarrollar (Lim *et al.*, 2005).

Se han realizado diversos estudios para evaluar el poder discriminatorio de los elementos repetitivos con el objetivo de distinguir entre serotipos mediante la realización los ensayos rep-PCR. Algunos autores encuentran correspondencia entre el patrón generado con el par de iniciadores ERIC1R/ERIC2 y el serotipo (Van Lith y Aarts, 1994) y en otros casos no se encuentra correlación (Millemann *et al.*, 1996; Burr *et al.*, 1998). El análisis realizado con la combinación de los elementos repetitivos ERIC y (GTG)₅ muestra que los aislados dentro de un mismo serotipo no generan el mismo patrón de amplificación y la heterogeneidad en los patrones de amplificación dentro de un mismo serotipo es limitada, por lo que la combinación de patrones ERIC/(GTG)₅ puede ser utilizada en estudios epidemiológicos para disminuir el número de cepas que necesitan ser caracterizadas por serotipos (Rasschaert *et al.*, 2005). Weigel *et al.* (2004) comparan los patrones obtenidos por PFGE con tres marcadores distintos de elementos repetitivos con la finalidad de evaluar la capacidad de estas técnicas para detectar diversidad genética en diferentes aislados de *Salmonella*. En dicho estudio encuentran que tanto la PFGE como los elementos repetitivos analizados generan patrones de amplificación altamente reproducibles, tanto en el número como en el tamaño de los fragmentos. Los resultados de los ensayos con los elementos REP mostraron mayor variación entre los aislados de estudio y tuvieron un mayor poder de discriminación. En general, varios de los trabajos citados concluyen que tanto la rep-PCR como la PFGE, tienen un mayor poder discriminatorio que la

ribotipificación mediante PCR. Al comparar distintos métodos de PCR para diferenciar entre aislados de *Salmonella* spp. se encontró que el ensayo ERIC ofrecía un buen poder de discriminación y son relativamente rápidos de desarrollar, por lo que constituyen una herramienta útil en estudios epidemiológicos (Lim *et al.*, 2005).

II. ANTECEDENTES

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. Se notifica con mayor frecuencia en los países desarrollados, ya que poseen mejores sistemas de notificación. Es una enfermedad de origen alimentario, porque los alimentos contaminados constituyen el principal modo de transmisión. Desde el punto de vista epidemiológico, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60-80% de los casos son esporádicos; a veces producen grandes brotes en hospitales, jardines maternas, restaurantes por los alimentos contaminados en su origen o con menor frecuencia durante su manipulación por un portador. *Salmonella* primariamente es patógena de animales inferiores, constituyen el principal reservorio de *Salmonella* no tifoidea que infectan al hombre, si bien la infección puede transmitirse de persona a persona. Se ha aislado *Salmonella* de casi todas las especies animales, incluyendo aves de corral (gallinas, pavos y patos), vacas, cerdos, mascotas (tortugas, gatos, perros, ratones, cobayo y hamsters), otros pájaros, lagartos y serpientes. Se transmite por la ingestión de alimentos provenientes de animales infectados, incluye huevos crudos o parcialmente cocidos y sus productos; carne y sus derivados; leche cruda y productos lácteos; agua contaminada; aves de corral. También se han informado brotes por el consumo de frutas; jugo de frutas y hortalizas crudas contaminadas. Otra fuente de contaminación son los productos farmacéuticos de origen animal no esterilizados (polvo de tiroides, hormonas pancreáticas sustancias corticoadrenales, etc). Aún que *Salmonella* ha sido reconocida como causa de enfermedad intestinal por muchos años y los métodos de control están bien establecidos. A pesar de esto *Salmonella* aparece como la primera causa reportada de enfermedades por contaminación alimentaria en el mundo y ocasionando brotes. Esta bacteria tiene un impacto importante tanto en la economía como en el sector salud. En países en desarrollo provoca aproximadamente 22 millones de casos de fiebre tifoidea anualmente, con 220 000 muertes anualmente (Crump et al., 2004; Parry, 2004).

A la fecha, en México existen dos estudios de *Salmonella* en los que se evalúan las relaciones genéticas entre aislados provenientes de distintos tipos de muestras, el primero de ellos se hizo en cuatro estados, incluyendo Sonora, San Luis Potosí, Michoacán y Yucatán (Zaidi *et al.*, 2008). En dicho estudio se analizaron por PFGE, 311 aislados de *S. Typhimurium*, encontrando que 102 eran comunes entre humanos y alimentos de origen animal los cuales se distribuían en 14 clusters

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

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

(genotipos). De manera interesante, aunque se encontraron genotipos particulares de los estados estudiados, uno de los patrones se encontró en todos los estados, lo que habla de la capacidad de dispersión de algunas de las clonas por todo el país. En el caso particular de Michoacán, no se encontraron genotipos exclusivos del Estado y el otro genotipo encontrado aquí, también se presentó en San Luis Potosí y Yucatán. El segundo estudio se hizo en alimentos que incluye la identificación

bioquímica, serológica y molecular por medio de RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) encontrándose que esta metodología para el estudio de genotipos, fue una herramienta útil en la determinación de los mismos, mostrando un alto poder discriminatorio (Regalado-Pineda, 2011).

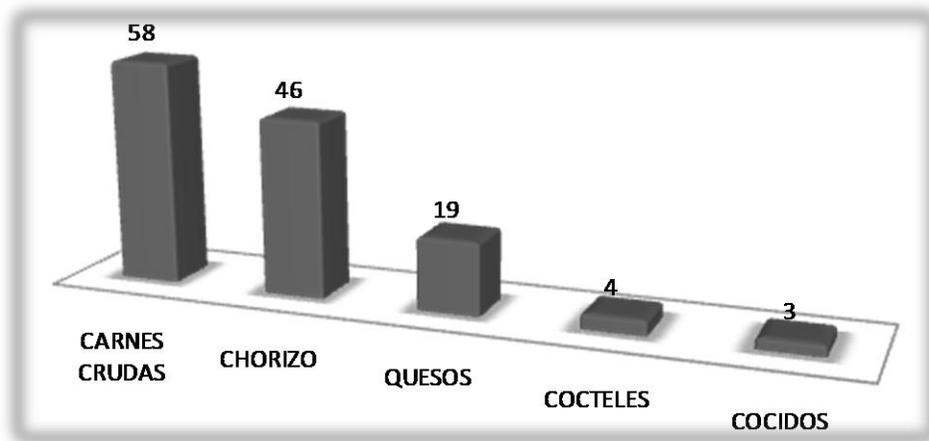


Figura 6. Número de cepas de *Salmonella enterica* obtenidas en los distintos tipos de alimentos muestreados en el estado de Michoacán, 2008 y 2009.

En el trabajo realizado por Regalado-Pineda (2011) en las distintas jurisdicciones sanitarias del Estado de Michoacán (Tabla 1), se analizaron un total de 8 856 muestras de alimentos que incluyen productos cárnicos cocidos (carne de res, cerdo, pollo, embutidos, pescado camarón y pulpo) con 6 556 muestras y en menor cantidad cocteles de mariscos crudos (ostiones) con únicamente 102 muestras y productos lácteos con 1322 muestras.

Del total de muestras analizadas se aislaron 130 cepas de *S. enterica* lo cual refleja una incidencia de 1.46% en el estado de Michoacán. De carnes crudas de res, tanto fileteadas, en trozo o molida, se obtuvieron la mayoría de las cepas (58) seguida de muestras de chorizo (46), de los quesos analizados, tanto de marca como artesanales, se aislaron un total de 19 cepas únicamente en los quesos de elaboración artesanal en el estado. De las muestras que menor cantidad de aislados se obtuvo fue de los productos cárnicos cocidos, de los que se recuperaron 3 cepas, mientras que de los cocteles solo se aislaron 4 cepas (Fig. 6).

La región con mayor incidencia fue la jurisdicción 8 con la presencia del 4% del total de muestras analizadas en esta zona, en las jurisdicciones 1, 4, 7 se observó solo el 1% de incidencia de *S. enterica* para el total de muestras analizadas en cada una de éstas. Se obtuvieron 34 serotipos, el de mayor frecuencia fue Typhimurium con 16 cepas, seguido de Anatum con 15 y

Agona con 11. También se obtuvieron 20 cepas que no se pudieron serotipificar. La diversidad genética de los aislados se analizó mediante ensayos RAPD observándose cinco grupos principales y 28 genotipos, (Fig. 7). No se encontró una correlación entre el serotipo, genotipo y el tipo de muestra o jurisdicción de donde se obtuvieron.

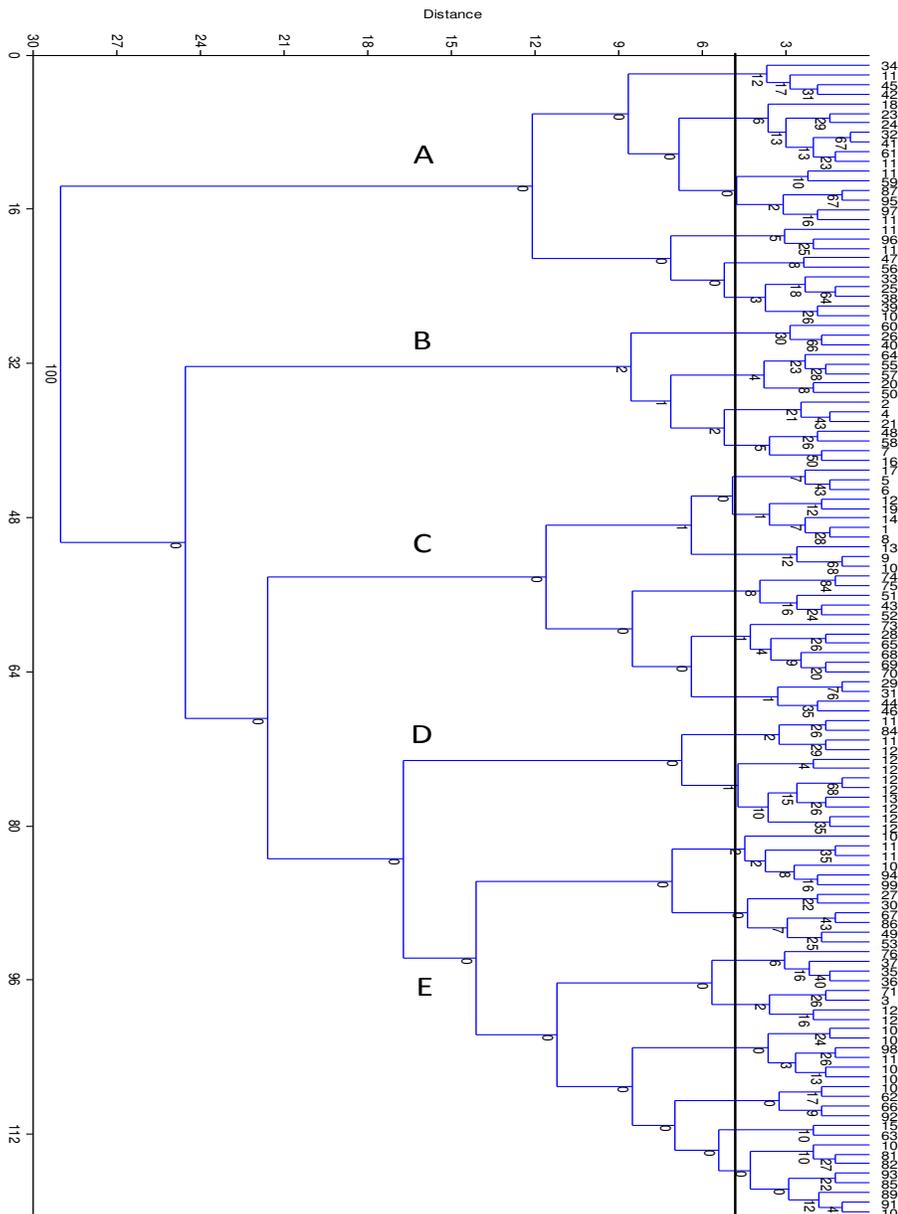


Figura 7. Dendrograma generado a partir de los ensayos de amplificación RAPD de las cepas de *S. enterica* aisladas (Regalado-Pineda, 2011).

El análisis de agrupamiento del serotipo mayoritario (*S. Typhimurium*) generó 4 genotipos identificados como G1, G2, G3 y G4 los cuales mostraron un patrón de dispersión heterogéneo en el estado, el genotipo G1, mostró una distribución restringida a la región norte del estado, abarcando las jurisdicciones 1, 2 y 6 (Fig. 8).

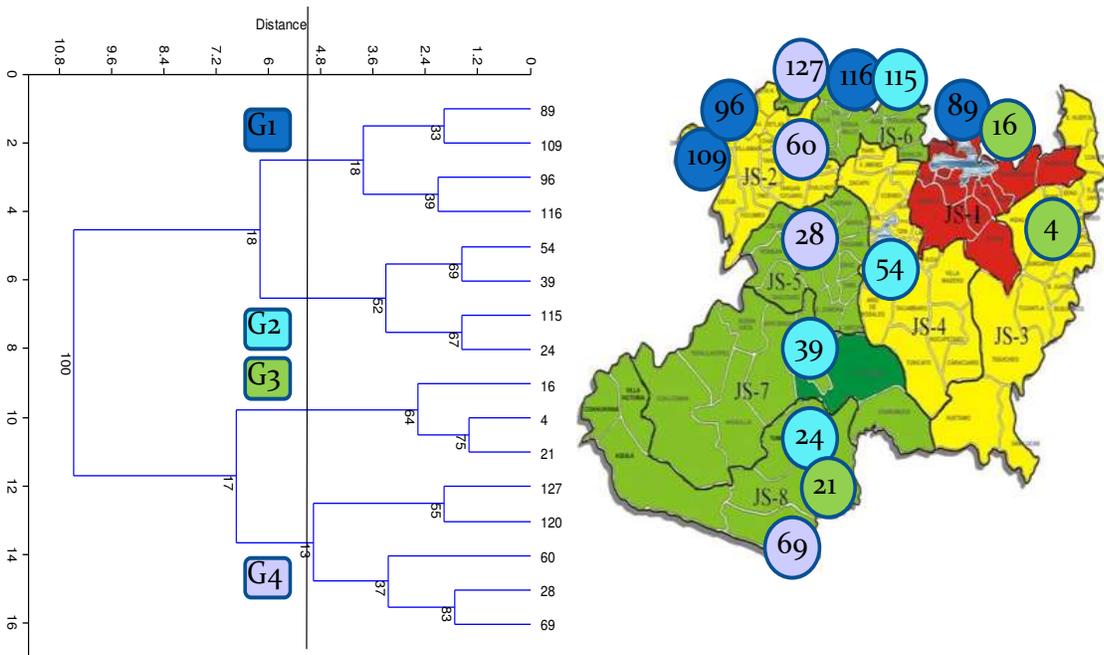


Figura 8. Dendrograma generado en base al ensayo RAPD de los aislados del serotipo *Typhimurium*. (Regalado-Pineda, 2011).

En el caso de los genotipos G2 y G4 se observó una dispersión norte-sur, aunque con diferencias en la presencia de algunas de las jurisdicciones. El genotipo G3 se presentó en las jurisdicciones 1, 3 y 8. Las primeras dos adyacentes en la región noroeste del estado, pero la tercera distante de éstas ubicada.

III. JUSTIFICACIÓN

Aunque *Salmonella* ha sido reconocida como causa de enfermedad intestinal por muchos años y los métodos de control están bien establecidos, este patógeno aparece como la primera causa reportada de enfermedades por contaminación alimentaria en el mundo y ocasionando brotes. Esta bacteria tiene un impacto importante tanto en la economía como en el sector salud.

Además dos cambios importantes en la epidemiología de la salmonelosis no asociada a tifoidea han ocurrido en la mitad del siglo XX en Europa y los Estados Unidos, la emergencia de infecciones por alimentos con *S. Enteritidis* y la múltiple resistencia a antibióticos por cepas de *S. Typhimurium*. Por los años 80 s *S. Enteritidis* 09,12:g.m emergió en los alimentos en Europa y en América. Para 1990 en Europa y para 1993 en Estados Unidos, era el serotipo más frecuentemente reportado, lo cual se ha modificado en años recientes. Es posible que algunos de estos cambios epidemiológicos se estén también generando en México, no obstante la información en ese sentido en el país es limitada en el espacio y en el tiempo, comparado con los países desarrollados. En México, los estudios sobre *Salmonella* y su importancia en Salud Pública se han enfocado principalmente a registrar la incidencia de ésta en casos de diarrea, así como a distinguir los serotipos más frecuentes.

En los países desarrollados, las herramientas moleculares para la tipificación de *S. enterica* se han utilizado para evaluar las relaciones genéticas entre aislados provenientes de muestras clínicas y alimentos. En México es importante contar con herramientas genético moleculares que permitan establecer relaciones con aislados clínicos provenientes de pacientes con procesos de infección, estudiar la dinámica de la transmisión de enfermedades en amplias áreas geográficas, estudios de brotes en hospitales, estudio de microorganismos nuevos o emergentes pero sobre todo conocer fuentes de infección lo que permitiría diseñar estrategias de prevención y medidas oportunas para el control de enfermedades infecto-contagiosas.

En Michoacán se han iniciado los estudios para la tipificación genético-molecular de *Salmonella enterica* en alimentos (Regalado- Pineda, 2011). No obstante, es necesario ampliar la información obtenida utilizando diversas técnicas de análisis genético que permitan distinguir entre aislados de *S. enterica* y establecer las posibles relaciones entre estos, con la finalidad de hacer más robustas las inferencias sobre abundancia y distribución de genotipos en el estado, establecer patrones de dispersión, detectar brotes, identificar fuentes de contaminación e identificar alimentos

de alto riesgo, todos estos aspectos indispensables en estudios epidemiológicos. Así, dado lo anterior, es de esperar que la información genético molecular generada ayude establecer estrategias de prevención y control de las enfermedades ocasionadas por *Salmonella* al ingerir alimentos contaminados en Michoacán.

IV. HIPOTESIS

Existe una correlación entre los serotipos de las cepas de *Salmonella enterica* aisladas en el estado de Michoacán y los genotipos obtenidos mediante el análisis de los elementos repetitivos presente en el genoma de éstas.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Determinar la diversidad genética de cepas de *Salmonella enterica* aisladas a partir de productos cárnicos y lácteos del estado de Michoacán.

V.2. Objetivos específicos

- i) Comparar la eficiencia de los elementos repetitivos de ADN (BOX, REP Y ERIC) para diferenciar entre los aislados de *S. enterica* en estudio.
- ii) Establecer la relación entre la distancia genética y los serotipos de las cepas estudiadas.
- iii) Determinar la relación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las cepas de estudio.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. Material Biológico

En este trabajo se utilizaron 102 aislados de *Salmonella sp* de las 130 cepas obtenidas de 8,856 muestras de alimentos (productos cárnicos y lácteos) en el período 2008-2009 en el estado de Michoacán (Regalado *et al.*, 2010). Se eliminaron 28 cepas por contaminación y/o falta de datos epidemiológicos. De los 30 serotipos encontrados el de mayor frecuencia fue Typhimurium y *Salmonella* grupo “B” ambos con 13 cepas, seguido de Anatum con 12 y Agona con 9 (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo

SEROTIPO	NÚMERO DE AISLADOS	SEROTIPO	NÚMERO DE AISLADOS
Typhimurim	13	Havana	2
Serogrupo B	13	Senftenberg	1
Anatum	12	Newport	1
Agona	9	Reading	1
Vejle	7	Borismorbotficans	1
Derby	6	Mbandaka	1
Give	6	Enteritidis	1
Panama	4	Poona	1
Muenster	3	Meleagridis	1
Serotipo C1	2	Serogrupo 35	1
Montevideo	2	Sinstorf	1
London	2	Serogrupo D	1
Reading	2	Saint Paul	1
Adelaide	2	Oranienbug	1
Serogrupo E1	2	Weltevreden	1
Muenchen	2		

VI.2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de fenol-cloroformo (Sambrook y Rusell, 2001) el cual se describe a continuación. Las colonias bacterianas se crecen en LB sólido y se cosechan con ayuda de una espátula previamente esterilizada, se colocan en 400 µL de regulador de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, agitando vigorosamente durante 10 min. A continuación se agregan 400 µL de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y se agita en el vórtex durante 5 min. Se centrifugan a 1 500xg por 10 min y se transfiere el sobrenadante (fase acuosa) a otro tubo limpio. El ADN se precipita con 1 volumen de isopropanol frío incubando 10 min a -20 °C y centrifugando a 1 500xg por 10 min. El sobrenadante se desecha y la pastilla se lava con 250 µL de etanol al 70% y se deja secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en un volumen mínimo de agua, aproximadamente 20 µL. El ARN presente en las muestras se dirigió con RNasa (Bio-Rad, USA) incubando las muestras a 37°C por 1 h. La integridad del ADN obtenido se visualiza desarrollando una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Sambrook y Rusell, 2001). Las imágenes de los geles se obtuvieron empleando un fotodeocumentador CHEMI-DOC Molecular viewer (BIO-RAD USA). Se obtuvo una única banda de alto peso molecular libre de ARN. El ADN aislado se guarda a una temperatura de -20 °C hasta su utilización.

VI.3. Ensayos rep-PCR

VI.3.1. Ensayo ERIC-PCR

Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 25 µL y contienen: buffer 10X (Tris-HCl 20 Mm pH 8.4, KCl 50 Mm), MgCl₂ 1.5mM, 0.2 mM de cada deoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 10 pmol de cada iniciador ERIC 1R/ ERIC 2 (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC /AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC), 2 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, USA) y 25 ng de ADN templado. Las condiciones de amplificación que se utilizan para este ensayo son: desnaturalización inicial a 95°C por 7 min; 30 ciclos de a 90°C por 30 seg, 50°C por 1 min y 65°C por 8 min; con una extensión final de 65°C por 16 min (modificado de Versalovic *et al.*, 1991), en un Termociclador Gene-Amp. PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA).

VI.3.2. Ensayo BOX-PCR

Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 25 μ L y contienen: Buffer 10X (Tris-HCl 20 Mm pH 8.4, KCl 50Mm), MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM cada deoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 10 pmol del iniciador BOX A1R: CTACGGCAAGGCGCTGACG, 2U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, USA), 25 ng de ADN templado. Las condiciones de amplificación que se utilizan para este ensayo son: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 59 °C por 1 min y 65 °C por 8 min, con una extensión final de 16 min (modificado de Oliveira *et al.* 2007), en un Termociclador GeneAmp.PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA).

VI.3.3. Ensayo REP-PCR

Las reacciones se llevan a cabo en un volumen final de 25 μ l y contienen: buffer Tris-HCl 20 Mm, pH 8.4, KCl 50 Mm), MgCl₂ 1.5mM, 0.2 mM de cada deoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 20 pmol de cada iniciador (REP 1R-1: IIIICGICGICATCIGGC y REP 2-1: ICGICTTATCIGGCCTAC), 2 U Taq ADN polimerasa (Invitrogen USA), 25 ng de ADN templado. Las condiciones de amplificación que se utilizan para este ensayo son: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 47 °C 1 min, y extensión a 65 °C por 8 min, con una extensión final de 65 °C por 16 min (modificado de Oliveira *et al.*, 2007), en un termociclador GeneAmp. System 2700 (Applied Biosystems, USA).

La cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028 se incluye en cada grupo de reacciones como parámetro interreacciones y cada ensayo tiene controles de reacción negativos. Los productos de amplificación se corren por electroforesis en un gel de agarosa al 2.0% a 70 V/cm. Los geles se tiñen con bromuro de etidio (1.5 μ /mL) y se visualizan en un transiluminador UV. El tamaño de los amplicones se determina por comparación con un marcador de peso molecular de ADN (escalera de 1Kb de, Invitrogen).

VI.4. Análisis de los patrones de bandedo

La imagen de los amplicones en los geles se captura con un Chemidoc marca BIO RAD y se utiliza la versión 4.5 del software "Quantity One" para la detección de bandas, permitiendo un 5% de tolerancia. Una vez definidas las bandas de amplificación el software permite la generación de curvas densitométricas para cada uno de los carriles del gel. Las curvas densitométricas generadas para cada carril pueden ser sobrepuestas para comparar el patrón de amplificación entre estos como

un patrón de picos. El software también incluye la función MATCH, mediante la cual una vez que se ha completado el análisis densitométrico permite generar una matriz binaria de 1 y 0. Adicionalmente el software permite ajustar el porcentaje de diferencia entre el tamaño de las bandas generadas entre carriles para considerar cuando dos bandas de diferentes carriles deben ser consideradas como la misma. En este trabajo dicho porcentaje de tolerancia se ajustó al 5%. Todo este proceso de análisis permite minimizar la subjetividad que puede introducirse mediante el análisis exclusivamente visual de los geles. Los patrones de amplificación obtenidos para cada uno de los ensayos REP, ERIC y BOX-PCR, se transforman en un código binario dependiendo de la ausencia o presencia de cada banda y se asigna 0 ó 1 respectivamente.

VI.5. Elaboración de Dendogramas

A partir del código binario obtenido en los diferentes ensayos se genera un dendograma utilizando el software PAST (Hammer 2008). Con dicho paquete se calculan las distancias genéticas mediante el algoritmo de Dice y se genera un patrón de agrupamiento mediante el criterio de Ward. Con base en diversos trabajos de la literatura (Lim et al., 2005) se considera una similitud genética mínima del 95% para asignar un aislado dentro de un genotipo. El análisis bootstrap se realiza mediante el mismo software utilizando 1000 réplicas.

Para determinar el poder de discriminación de los marcadores ERIC, REP y BOX generados en los aislados de estudio, se calcula el índice de diversidad de Simpson (D) de acuerdo a la fórmula:

$$D = 1 - 1 / N (N-1) \sum n (n-1)$$

Como se describe en Hunter y Gastón (1988). Donde N es el No. total de individuos (cepas) y n es el No. de cepas dentro de cada genotipo.

VI.6. Prueba de Mantel

La evaluación de la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de los aislados de estudio se realizó la Prueba de Mantel. Para evaluar si existía correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de los aislados de estudio se realizó una prueba de

Mantel. En este tipo de análisis, se grafica la distancia genética contra la distancia geográfica de todas las combinaciones de pares de aislados. Una correlación positiva indicaría que a medida que aumenta la distancia geográfica entre los pares de aislados comparados, también aumenta la distancia genética. Una correlación positiva ideal se mostraría como una recta que pasa por el origen con un ángulo de 45° con respecto a cada uno de los ejes en un gráfico x (distancia genética) contra y (distancia geográfica). La pendiente de dicha recta tendría un valor de 1 y en el análisis de Mantel la pendiente es considerada el factor de correlación (R^2). A medida que dicha correlación positiva se pierde, la recta se va “acostando” hasta ser completamente horizontal, en el caso de que no exista ninguna correlación entre las dos distancias medidas. Conforme la correlación se va perdiendo el valor de R^2 se va alejando de 1. Este análisis se realizó con ayuda del paquete estadístico GenAlex ver 6.0 (Peakall and Smouse 2006).

VII. RESULTADOS

VII.1. ADN extraído de las cepas de estudio

El ADN extraído de las 102 cepas de *Salmonella* fue en todos los casos de alto peso molecular y de buena calidad (figura 9).

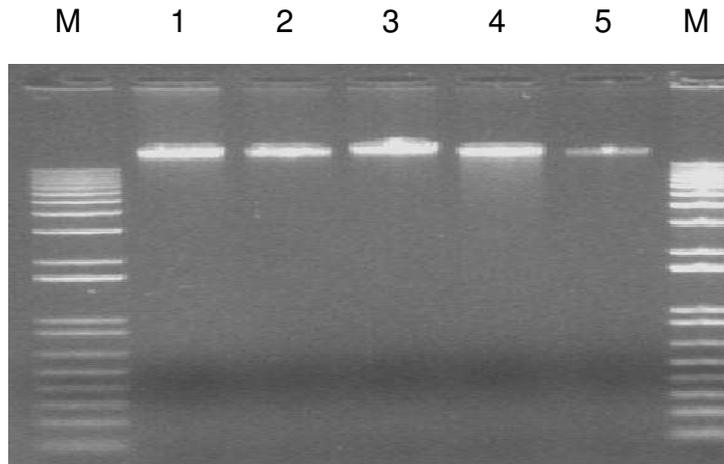


Figura 9. ADN extraído de las cepas de *Salmonella enterica* en estudio. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los carriles: M marcador de peso molecular 1Kb Plus ADN ladder (Invitrogen, USA); 1-5 ADN obtenido de cepas de *Salmonella enterica* de estudio.

VII.2. Resultados del ensayo BOX-PCR.

Los patrones de amplificación obtenidos con el ensayo BOX-PCR, generaron un mínimo de 3 bandas y un máximo de 14 bandas por cepa, con pesos que van desde los 350 pb hasta las 8Kb. En la figura 10 se muestran algunos de los patrones de bandeo obtenidos con este marcador.

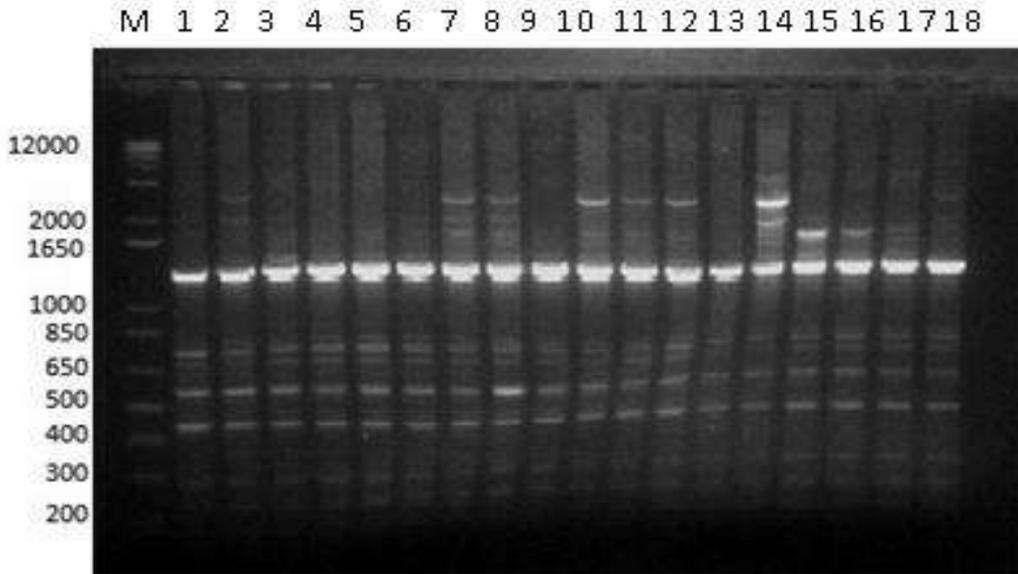


Figura 10. Patrones de bandeo obtenidos con el ensayo BOX-PCR. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra carriles: M, marcador de peso molecular 1Kb Plus ADN ladder (Invitrogen, USA); 1-18, amplicones obtenidos con el ensayo BOX-PCR de las cepas de *Salmonella enterica*.

El dendograma generado con los patrones de amplificación BOX (figura 10) muestra que las cepas se distribuyeron en 3 grupos principales. El grupo A está formado por 30 cepas de 17 serotipos distintos, siendo los mayoritarios Typhimurium (6), Agona (4) y Vejle (3). El grupo B contiene 37 cepas de 17 serotipos distintos, siendo los mayoritarios Anatum (8), serogrupo "B" (5) y Agona (5). El grupo C tiene 38 cepas de 15 serotipos diferentes siendo los mayoritarios serogrupo "B" (6), Give (5) y Typhimurium (5). Se observa que el grupo A y C comparten el serotipo Typhimurium, A y B comparten a Agona pero el grupo A es el único que contiene al serotipo Vejle y el grupo C es el único que contiene al serotipo Give. Los grupos B y C comparten al serogrupo "B", además se puede observar que a un 95% de similitud se distinguen 20 genotipos (Fig. 11).

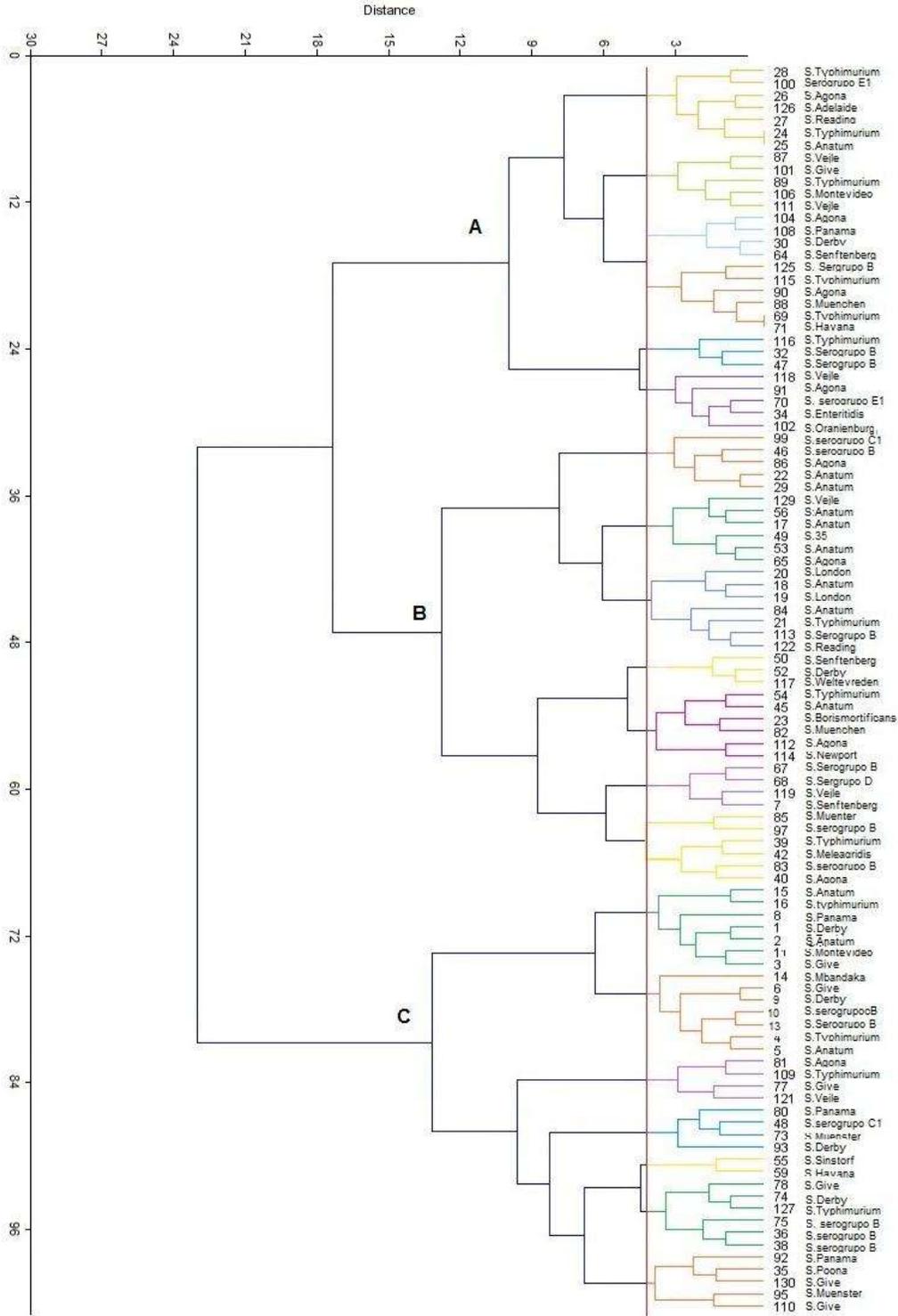


Figura 11. Dendrograma generado a partir de los ensayos de BOX-PCR de las cepas de *S. enterica*.

El índice de discriminación de Simpson (D) calculado de acuerdo a los resultados del ensayo BOX fue de 0.964, lo cual indica un buen poder de discriminación entre los aislados de la población estudiada (Tabla 3).

VII.3. Resultados del ensayo REP-PCR.

Los patrones de amplificación obtenidos con el ensayo REP-PCR, generaron un mínimo de 3 bandas y un máximo de 14 bandas por cepa, con pesos que van desde los 200 pb hasta las 10.5 Kb. En la figura 12 se muestran algunos de los patrones de bandeo obtenidos con este marcador.

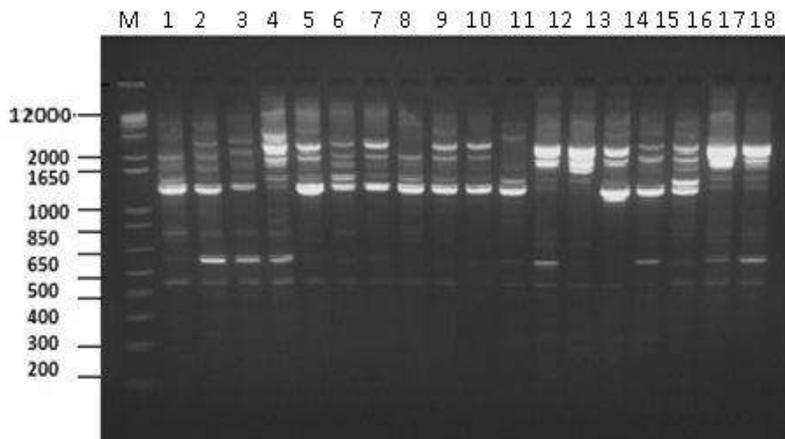


Figura 12. Patrones de amplificación obtenidos mediante el ensayo REP-PCR. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra carriles: M, marcador de peso molecular 1Kb ADN Plus ladder (Invitrogen, USA); 1-18 amplicones obtenidos con el ensayo de REP-PCR de las cepas de *Salmonella enterica*.

El dendograma generado con los patrones de amplificación de REP (figura 13) muestra que las cepas se distribuyeron en 3 grupos. El grupo A está conformado por 27 cepas y 14 serotipos distintos, siendo los mayoritarios Anatum (4), del serogrupo “B” (4) y Typhimurium (3). El grupo B esta constituido por 37 cepas y con 20 serotipos distintos, siendo los mayoritarios Typhimurium (5), Anatum (5), Agona (4) y Vejle (4). Al grupo C lo forman 38 cepas con 17 serotipos distintos, siendo los mayoritarios del serogrupo “B” (6), Typhimurium (5) y Agona (5). Se observa que los grupos A, B y C comparten al serotipo Typhimurium, mientras que el grupo A y B comparten al serotipo Anatum,

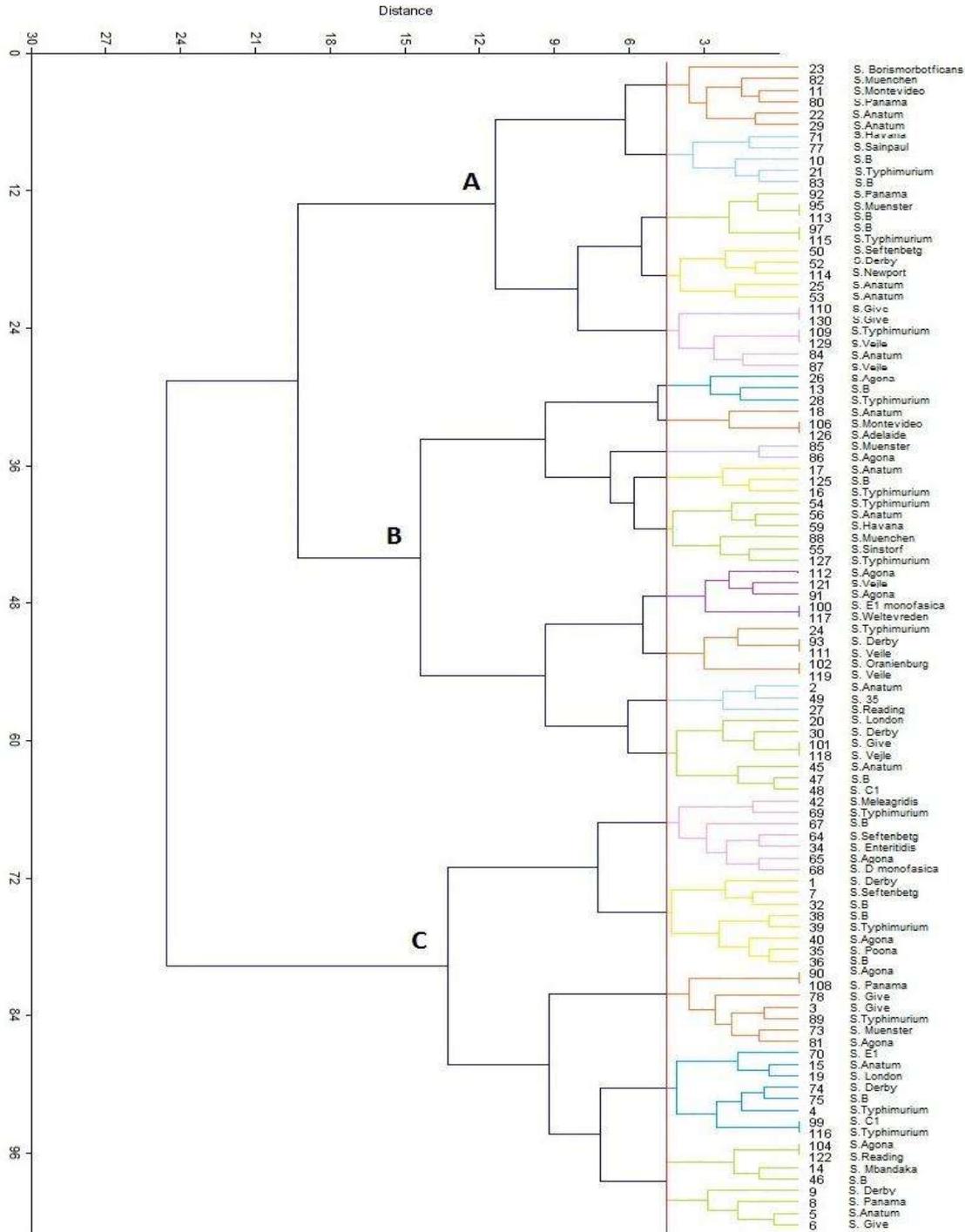


Figura 13. Dendrograma generado a partir de los ensayos de REP-PCR.

los grupos B y C comparten al serotipo Agona, pero el grupo B es el único con el serotipo Veille, además un 95% de similitud se distinguen 19 genotipos.

El índice de discriminación de Simpson (D) calculado de acuerdo a los resultados del ensayo REP fue de 0.953, lo cual representa un valor que indica un buen poder de discriminación entre los aislados de la población estudiada (Tabla 3).

VII.4. Resultados del ensayo ERIC-PCR.

Los patrones de amplificación obtenidos con el ensayo ERIC-PCR, generaron un mínimo de 3 bandas y un máximo de 13 bandas por cepa, con pesos que van desde los 50 pb hasta las 5Kb. En la figura 14 se muestran algunos de los patrones de bandeo obtenidos con este marcador.

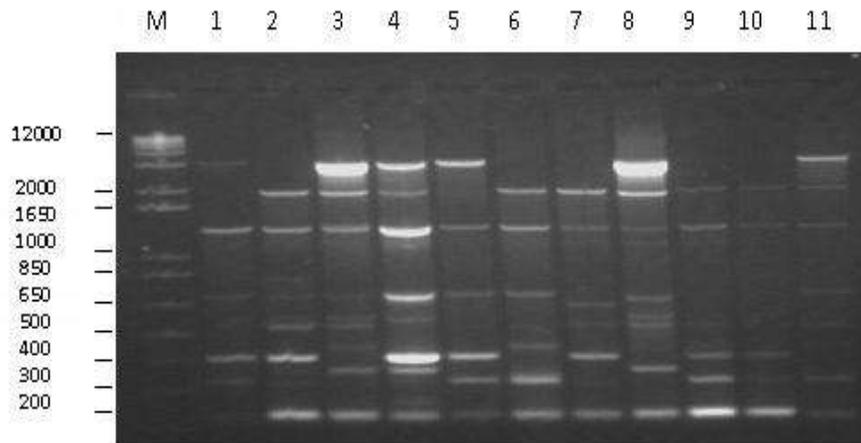


Figura 14. Patrones de amplificación obtenidos mediante el ensayo ERIC-PCR. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra carriles: M, marcador de peso molecular 1Kb ADN Plus ladder (Invitrogen, USA); 1-11 amplicones obtenidos con el ensayo de ERIC-PCR de las cepas de *Salmonella enterica*.

El dendograma generado con los patrones de amplificación ERIC (Fig. 15) muestra que las cepas se distribuyeron en 4 grupos (A, B, C y D) el grupo A con 15 cepas y con 12 serotipos diferentes siendo los mayoritarios Anatum (3), serogrupo "B"(2) y Agona (2), el grupo B con 35 cepas y con 20 serotipos diferentes siendo los mayoritarios Agona (5), Typhimurium (4), Vejle (4) y Give (4), el grupo C con 27 cepas y con 15 serotipos diferentes y siendo los mayoritarios el serogrupo "B" (5), Anatum (5) y Typhimurium (4) y el grupo D con 24 cepas y 13 serotipos diferentes siendo los mayoritarios Typhimurium (4), serogrupo "B"(4) y Anatum (3). Se observa que los grupos

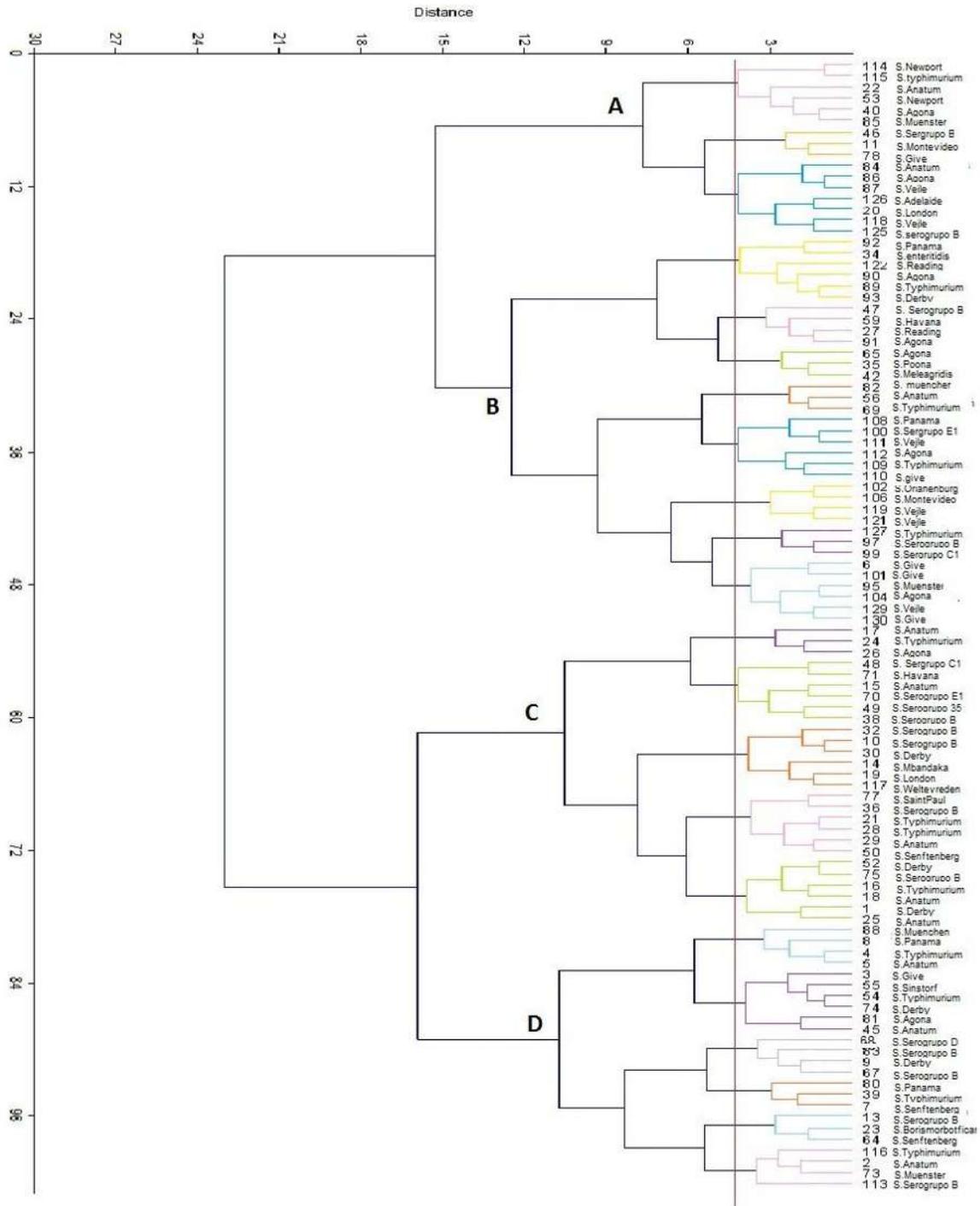


Figura 15. Dendrograma generado a partir de los ensayos de ERIC.PCR

A, C, y D comparten al serotipo Anatum y al serogrupo “B” mientras que los grupos B, C, y D comparten el serotipo Typhimurium y los grupos A y B comparten al serotipo Agona y el grupo B es

el único que contiene a los serotipos Give y Vejle, además a un 95 % de similitud se distinguen 22 genotipos.

El índice de discriminación de Simpson (D) calculado de acuerdo a los resultados del ensayo ERIC fue de 0.959, lo cual indica un buen poder de discriminación entre los aislados de la población estudiada (Tabla 3).

VII.5 Resultados obtenidos de la combinación de los ensayos de ERIC-PCR, REP-PCR y BOX-PCR.

El dendograma generado al combinar los patrones de amplificación de los tres ensayos muestra que las cepas se distribuyeron en 4 grupos principales (Fig. 16). El grupo A está formado por 29 cepas de 14 serotipos distintos, siendo los mayoritarios Anatum (7), Typhimurium (5) y serogrupo "B" (3). El grupo B está formado por 14 cepas con 10 serotipos distintos, siendo los mayoritarios serogrupo "B" (3), Give (2) y Typhimurium (2). El grupo C está constituido por 25 cepas con 16 serotipos distintos, siendo los mayoritarios serogrupo "B" (3), Agona (2), Typhimurium (2), Agona (2). El grupo D incluye 31 cepas y 19 serotipos distintos, siendo los mayoritarios Typhimurium (5), Vejle (4) y Agona (4). Se observa que los grupos A, B, C y D comparten al serotipo Typhimurium, mientras que los grupos A, B y C comparten además al serogrupo "B", el grupo A contiene como mayoritario al serotipo Anatum y lo comparte con el grupo C, el grupo B es el único con el serotipo Give y comparte al serotipo Agona con el grupo D pero es el único que contiene el serotipo Vejle, además a un 95% de similitud se distinguen 44 genotipos. Al calcular el índice de discriminación considerando los patrones de amplificación de los tres marcadores se obtuvo un valor de $D = 0.984$ (Tabla 3).

Tabla No. 3 Genotipos de los aislados de *Salmonella enterica*

Marcador				
Aislados de <i>Salmonella enterica</i>	Genotipos BOX	Genotipos REP	Genotipos ERIC	Genotipos ERIC/REP/BOX
	20	19	22	44
	D=0.964	D=0.953	D=0.959	D=0.984
D. Índice de Discriminación				

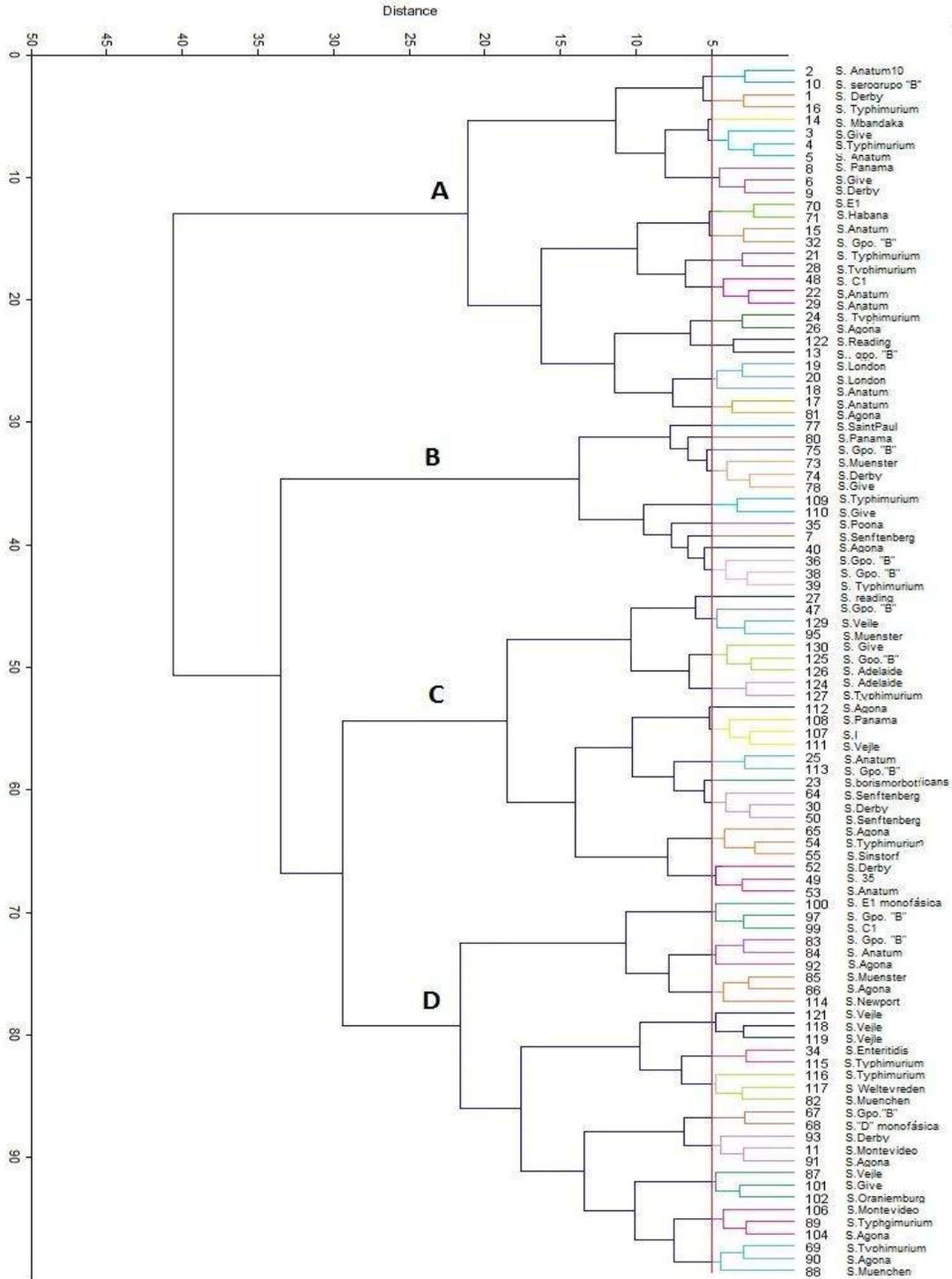


Figura 16. Dendrograma generado a partir de los ensayos ERIC-PCR, BOX-PCR y REP-PCR.

VII.6. Análisis de los serotipos mayoritarios.

Se realizó el análisis de agrupamiento de los 3 serotipos mayoritarios excluyendo a los demás serotipos, con la finalidad de encontrar patrones de distribución de sus genotipos en el estado. Para el serotipo Typhimurium con 13 aislamientos se encontraron 6 genotipos. El genotipo TyG1 se encontró ubicado en la jurisdicción 8 al sur del estado, el genotipo TyG2 en las jurisdicciones 5,1 y 8 el genotipo TyG3 en las jurisdicciones 2 y 7 ubicados al oeste de estado, el genotipo TyG4 se encontró en la Jurisdicción 6 al norte del estado, el genotipo 5 en las jurisdicciones 6 y 8 y el genotipo TyG6 en las jurisdicciones 3 y 4 al este del estado (Fig. 17). Los genotipos TyG4 y TyG5 provienen de la Jurisdicción 6 y del mismo alimento (quesos), pero el TyG4 tiene 2 aislamientos que son del mismo genotipo mismo alimento y misma ciudad (Tanhuato en la Jurisdicción 6).

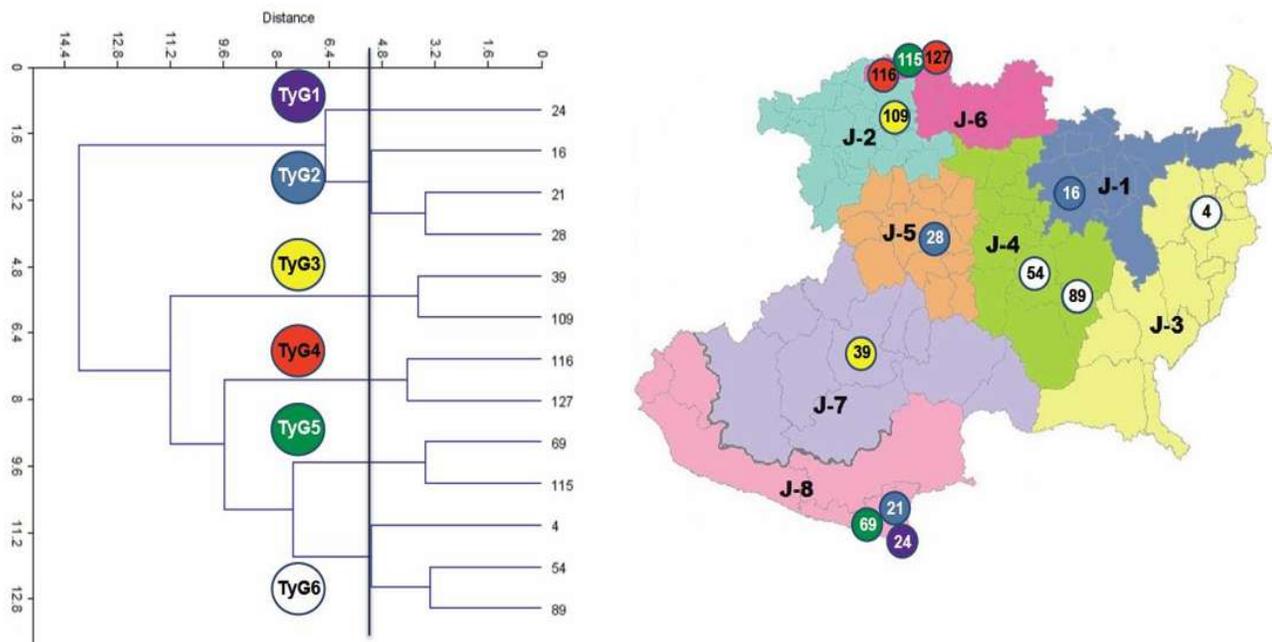


Figura 17. Dendrograma generado para las cepas de *S. Tiphymurim*. Los patrones obtenidos se generaron calculando las distancias genéticas mediante el cálculo de distancias euclidianas y con los valores obtenidos se realizó el patrón de agrupamiento empleando al algoritmo de Ward.

Los genotipos TyG2 y TyG5 se encuentran en la misma región geográfica (Jurisdicción 8) pero provienen de diferentes alimentos. Los demás genotipos están dispersos en el estado (Tabla 4).

Tabla 4. Cepas con relación entre localidad jurisdicción y tipo de alimento

SEROTIPO	GENOTIPO	NO. AISLADO	LOCALIDAD	JURISDICCIÓN	ALIMENTO
S.Typhimurium	TyG2	21	Lázaro Cárdenas	J8	Chorizo
	TyG5	69	Lázaro Cárdenas	J8	Carne de res molida
		116	Tanhuato		
	TyG4	127	La Piedad	J6	Queso Panela
	TyG5	115	Tanhuato	J6	Queso asadero
S. Anatum	AnG1	17	Morelia	J1	Carne de res
	AnG3	29	Morelia	J1	Carne de puerco
	AnG4	02	Morelia	J1	Chorizo
	AnG5	56	Morelia	J1	Carne de res
	S. Agona	AgG1	26	Apatzingán	J7
AgG4		86	Apatzingán	J7	Chorizo
		90	Apatzingán	J7	Chorizo
AgG5		91	Apatzingán	J7	Carne de res

Para el serotipo Anatum con 12 aislamientos se encontraron 5 genotipos. El genotipo AnG1 se encontró ubicado en las jurisdicciones 1 y 3 al noroeste del estado, el genotipo AnG2 en las jurisdicciones 5 y 8 en el centro y sur, el genotipo AnG3 en las jurisdicciones 7, 5 y 1 en sur y noreste del estado, el genotipo AnG4 en las jurisdicciones 1 y 3 al noreste, el genotipo AnG5 en las jurisdicciones 6,1 y 3 al norte y sur (Fig. 18). Se puede observar que las jurisdicciones 1 y 3 comparten los genotipos AnG1, AnG4, y AnG5 y que la jurisdicción 1 contiene a todos los genotipos excepto al genotipo 2 pero provienen de diferentes tipos de alimentos (Tabla 4).

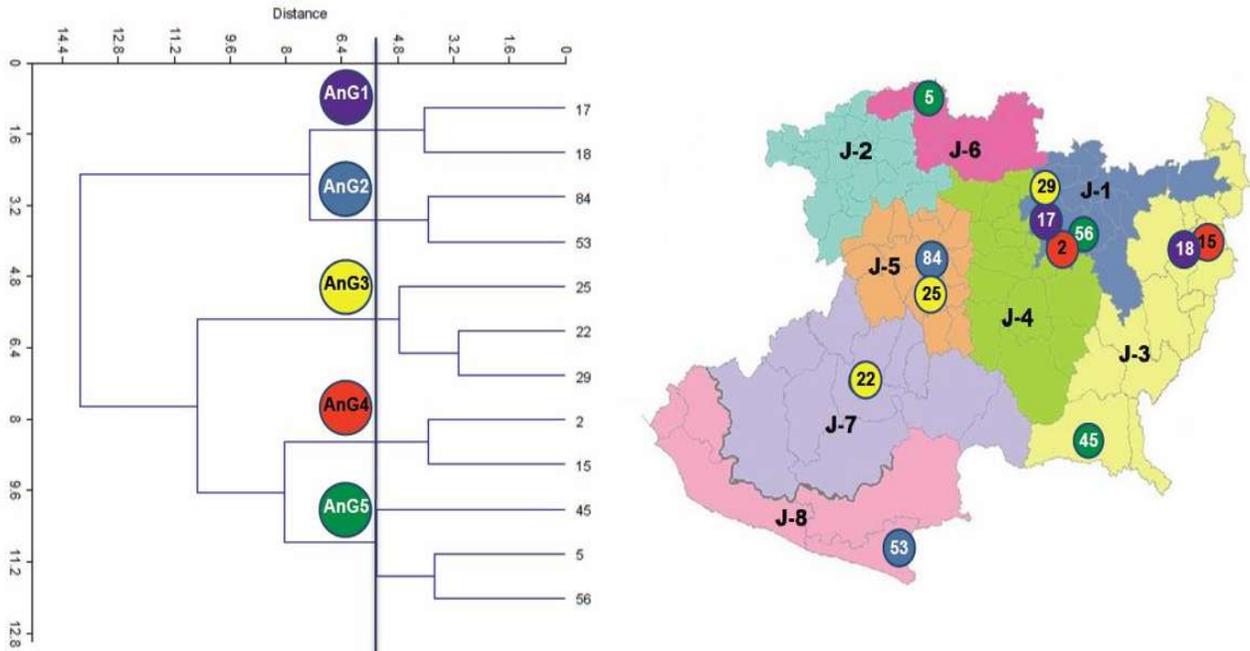


Figura 18. Dendrograma generado para las cepas de *S. Anatum*. Los patrones obtenidos se generaron calculando las distancias genéticas mediante el cálculo de distancias euclidianas y con los valores obtenidos se realizó el patrón de agrupamiento empleando al algoritmo de Ward.

Para el serotipo Agona con 9 aislamientos se encontraron 5 genotipos. El genotipo AgG1 se encontró ubicado en la jurisdicción 7 al sur del estado, el genotipo AgG2 en la jurisdicción 8 al sur del estado, el genotipo AgG3, AgG4 y AgG5 en las jurisdicciones 7 y 8 todas ubicadas al sur del estado (Fig. 19). Como se puede observar todos los genotipos de este serotipo se ubicaron al centro-sur del estado. Se observa que además comparten el mismo alimento (chorizo) y la misma localidad Apatzingán J7 (Tabla 4).

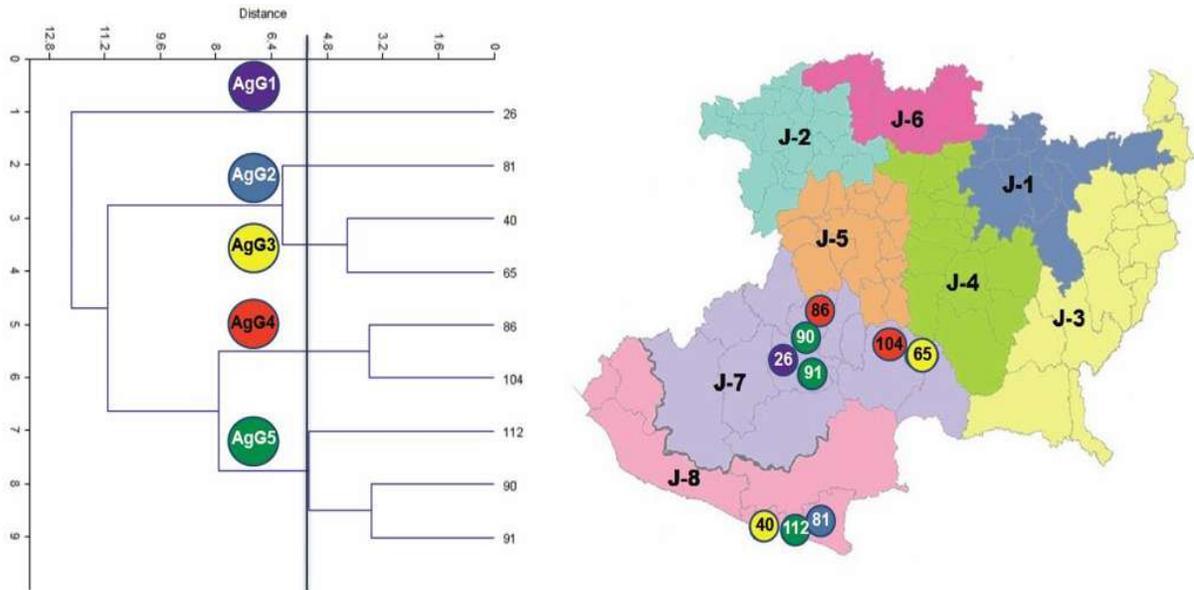


Figura 19. Dendrograma generado para las cepas de S. Agona. Los patrones obtenidos se generaron calculando las distancias genéticas mediante el cálculo de distancias euclidianas y con los valores obtenidos se realizó el patrón de agrupamiento empleando al algoritmo de Ward.

Los valores del índice de discriminación (D) para los genotipos de los serotipos mayoritarios oscilaron entre 0.995 en el caso del marcador BOX en las cepas del serotipo Typhimurium, y 0.998 en el caso de las cepas del serotipo Agona con los marcadores REP y ERIC (Tabla 5). La combinación de los tres tipos de marcadores optimiza el valor de D hasta 0.998-0.999.

Tabla 5. Genotipos de los serotipos mayoritarios

SEROTIPO	M A R C A D O R			
	Genotipos BOX	Genotipos REP	Genotipos ERIC	Genotipos ERIC REP BOX
Typhimurium	3 D= 0.995	3 D= 0.995	4 D= 0.997	6 D= 0.999
Agona	2 D= 0.996	3 D= 0.998	3 D= 0.998	5 D=0.999
Anatum	3 D= 0.996	4 D= 0.997	3 D= 0.996	5 D=0.998

D. Índice de diversidad genética

VII.7. Correlación entre distancia genética y distancia geográfica.

Se obtuvo un primer gráfico de Mantel en el cual se incluyeron las 102 cepas analizadas y la combinación de los tres marcadores genéticos (ERIC, BOX y REP). El gráfico obtenido muestra que no existe correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, generando un valor de R^2 de 0.0007 (Fig. 20A). Al considerar cada uno de los marcadores genéticos de manera independiente para el cálculo de las distancias genéticas empleadas en la prueba de Mantel se obtiene el mismo resultado, en ningún caso se observa correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica.

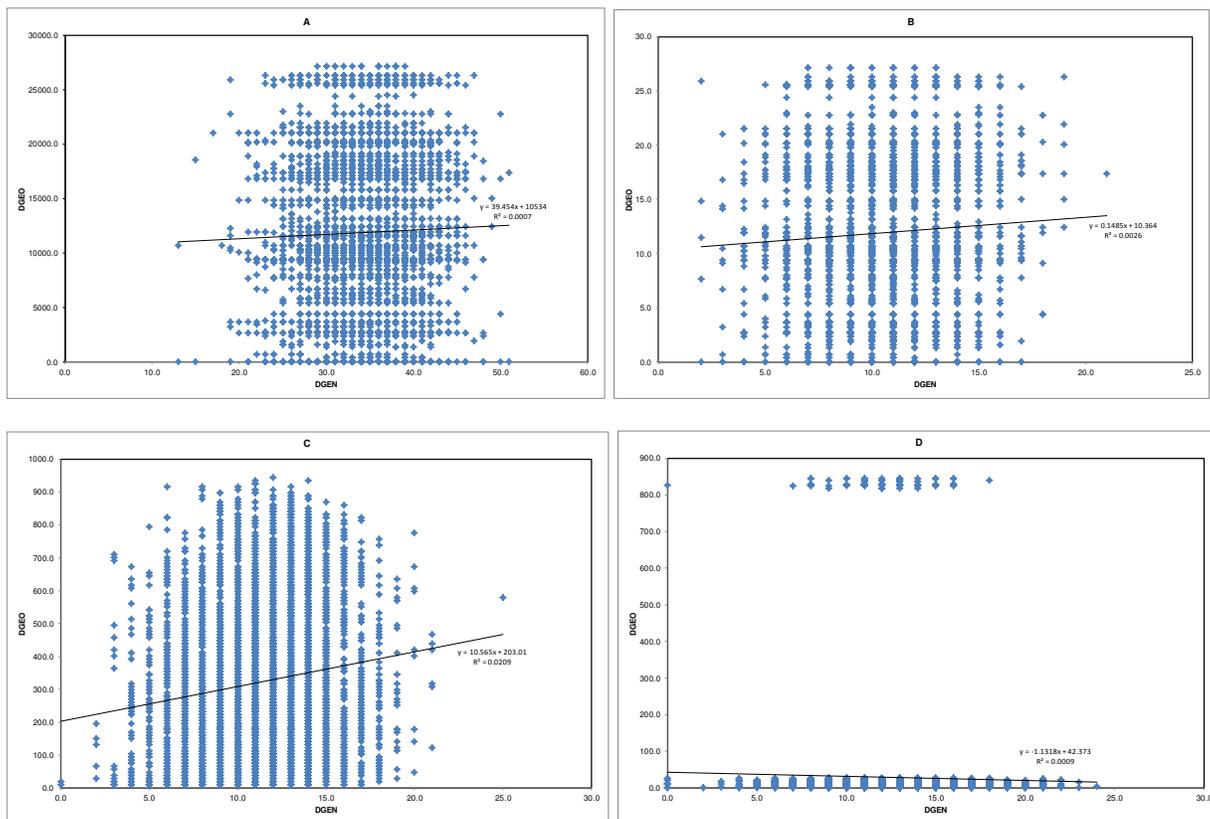


Figura 20. Gráfico del análisis de Mantel para las 102 cepas de estudio con los tres marcadores genéticos (ERIC, BOX y REP). Se muestran los resultados con el valor de R^2 para los 102 aislados de *S. enterica* empleando las distancias genéticas calculadas a partir de los resultados de amplificación obtenidos con los tres marcadores (A) y considerando únicamente los resultados del ERIC (B), BOX (C) y REP (D) de manera independiente. La prueba de Mantel se realizó considerando 9999 permutaciones.

No obstante, de manera interesante, de los tres marcadores el que presenta el valor de R^2 más alto fue el marcador BOX con un valor de 0.0209 (Fig. 20 C), superior en un orden de magnitud al valor

de R^2 del marcador ERIC, el cual fue de 0.0026 (Fig. 2B), y en tres órdenes de magnitud mayor al valor de R^2 que se generó con el marcador REP, con un valor de 0.0009 (Fig. 20 D), siendo el más bajo.

Al realizar el análisis de Mantel de manera independiente con los aislados de cada uno de los tres serotipos mayoritarios (Agona, Anatum y Typhimurium), los resultados son semejantes a los obtenidos con todos los aislados, es decir los valores de R^2 en todos los casos son bajos, mostrando la falta de correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica (datos no mostrados).

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron 102 cepas de *Salmonella enterica* de muestras de alimentos provenientes de todo el estado de Michoacán durante los años 2008 y 2009, siendo importante destacar el hecho de que se determinó la presencia de *S. enterica* principalmente en alimentos crudos de origen animal del estado de Michoacán. Este dato indica la importancia del proceso de cocción en los alimentos, ya que en alimentos cocidos fue prácticamente nulo el aislamiento de este patógeno.

La tipificación genético-molecular de cepas de *S. enterica* aisladas de diferentes fuentes de alimentos es importante para poder implementar medidas de prevención y control de infecciones en la población, así como para tener una idea más precisa de las fuentes de enfermedades gastrointestinales provocadas por dicho patógeno.

Uno de las observaciones iniciales que se generan del patrón de agrupamiento es que los genotipos encontrados no separan a los aislados de acuerdo al serotipo. Los resultados encontrados a ese respecto en la literatura son contradictorios. Por ejemplo, Van Lith y Aarts (1994), estudian 65 aislados pertenecientes a 49 serotipos empleando los iniciadores ERIC1R/ERIC2, encontrando que los aislados de un mismo serotipo poseen el mismo patrón de amplificación, por lo que concluyen que dicho marcador es útil para diferenciar entre serotipos. Por otro lado, Burr et al. (1998) y Milleman et al. (1996) concluyen que no es posible diferenciar entre serotipos de *S. enterica* empleando el marcador ERIC. La capacidad de diferenciación entre aislados de distintos serotipos usando elementos repetitivos para funcionar mejor cuando se comparan ciertos serotipos. Por ejemplo, cuando se comparan con marcadores REP y ERIC aislados de los serotipos Typhimurium, Enteritidis y Virchow, los patrones obtenidos permiten diferenciar entre éstos y, aún más, se encuentran algunos loci asociados a cepas resistentes a antibióticos (Bennasar et al., 2000). El análisis rep-PCR también ha funcionado para agrupar cepas de un mismo serotipo cuando éstas provienen de distintos tipos de muestra, aunque las cepas de los serotipos Newport, Virchow y Heidelberg presentan mayores distancias genéticas (Ben-Darif et al., 2010). En el caso concreto de muestras de alimentos, Learn-Han et al. (2008) logran agrupar la mayoría de cepas estudiadas de los serotipos Agona y Weltevreden provenientes de carne de pollo y vegetales empleando el

marcador ERIC. El mismo resultado se obtuvo con aislados de distintos serotipos provenientes de muestras de alimentos marinos (Bhowmick et al., 2012).

Rasschaert et al. (2005) hacen un trabajo exhaustivo para determinar la capacidad del marcador ERIC de diferenciar entre serotipos, concluyendo que efectivamente no todos los aislados de un mismo serotipo presentan el mismo patrón de amplificación. Sin embargo, dicho grupo de trabajo encuentra que la heterogeneidad de los patrones de amplificación de los aislados de un mismo serotipo es limitada, por lo que proponen que el marcador ERIC puede ser utilizado como método prospectivo para asignar aislados a un serotipo, siempre y cuando se use más de una cepa de referencia.

Existen diferentes argumentos para explicar la discrepancia entre serotipo y genotipo empleando ensayos de rep-PCR. Por un lado se ha propuesto que algunos serotipos como el Enteritidis son polifiléticos, de tal forma que aunque las cepas no están filogenéticamente relacionadas, comparten algunas características genéticas, como los antígenos somáticos y flagelares (Torpdahl y Ahrens, 2004). Por otra parte, se ha sugerido que posiblemente algunos serotipos, como el Thompson, acumulan diferencias genéticas más rápidamente que otros, lo cual lleva a medir distancias genéticas comparativamente más altas entre estos cuando se utilizan ensayos de rep-PCR (Wise et al., 2009). Adicionalmente, se ha postulado que algunas características genéticas pudieron haber co-evolucionado en distintos serotipos, acercándolos genéticamente (Beltran et al., 1988).

El análisis realizado en este trabajo nos permitió evaluar tanto la diversidad genética de los aislados de *S. enterica* en el estado de Michoacán, como el poder de discriminación de los marcadores de rep-PCR utilizados. Los patrones de agrupamiento generados mostraron 19, 20 y 22 genotipos para los ensayos REP, BOX, ERIC, respectivamente, al considerar un corte al 95% de similitud. La combinación de los resultados de los tres tipos de marcadores mostró 44 genotipos al mismo nivel de corte. En relación al poder de discriminación de los marcadores, medido como índice de Simpson (D), se encontró un valor de 0.953 para REP, 0.959 para ERIC, y 0.964 para BOX; mientras que para la combinación de los 3 marcadores el valor encontrado fue de 0.981. Estos valores muestran que los ensayos rep-PCR tuvieron un alto poder de discriminación entre los aislados de estudio.

Cuando se comparan los resultados generados en el presente trabajo con los reportes encontrados en la literatura es importante considerar diferencias en el tipo de muestra(s) de

procedencia de los aislados, el número de aislados analizados, la cantidad de serotipos involucrados en el análisis y la extensión geográfica sobre la cual se realizó el muestreo. En relación al análisis genético molecular, algunos de los factores a tener en cuenta son los algoritmos empleados tanto para el cálculo de la distancia genética como para la construcción del patrón de agrupamiento, así como el nivel de similitud genética considerado para diferenciar los grupos genéticos de los aislados de estudio.

Learn-Han et al. (2008) obtienen un valor de D igual a 0.7836 al analizar mediante ERIC 41 aislados del serotipo Agona y 33 del serotipo Weltevreden provenientes de carne de pollo y vegetales, formando 10 grupos genéticos. Sin embargo, dichos valores fueron generados a una similitud de 60%, criterio de corte significativamente más bajo que el aplicado en este trabajo de 95%. Una posibilidad para el menor poder de resolución encontrado en el trabajo de Learn-Han et al. (2008), comparado con nuestros datos es la extensión geográfica sobre la cual estos muestrearon, ya los aislados de dicho reporte fueron colectados en un radio no mayor de 20 km en tres ciudades distintas de Malasia. El muestreo sobre una menor distancia geográfica aumenta la probabilidad de que los aislados estén más relacionados genéticamente, disminuyendo la capacidad de discriminación del ensayo ERIC.

Otros reportes muestran valores de D iguales a los generados en este trabajo con los tres elementos repetitivos. Al analizar mediante un ensayo rep-PCR semiautomatizado 71 aislados de 21 serotipos distintos de *S. enterica* obtenidos de diferentes tipos de muestras (humanas, alimentos, ambientales) provenientes de lugares no especificados del Reino Unido, se generaron 38 genotipos, con un valor de discriminación de 0.95 (Ben-Darif et al., 2010) a un nivel de similitud del 95%, aunque en el caso de los aislados de los serotipos Newport, Virchow y Heidelberg, el agrupamiento se generó al considerar similitudes más bajas, de 84%, 90% and 89%, respectivamente. De la misma forma, el marcador ERIC tuvo un valor de D de 0.96 a un corte de 50% de similitud en aislados de *S. enterica* provenientes de muestras de alimentos marinos (Bhowmick et al., 2012).

En relación al análisis de los serotipos mayoritarios es interesante la observación de que tanto el serotipo Typhimurium como el Anatum se encuentran distribuidos por todo el estado de Michoacán, mientras que el serotipo Agona solo se ha aislado de la región centro-sur del estado. Esto puede sugerir que este último serotipo tiene una menor capacidad de dispersión dentro del estado que los dos primeros, o bien que ha tenido menos tiempo para dispersarse dentro de Michoacán debido a que su introducción es más reciente que la de los otros dos serotipos.

En los tres serotipos mayoritarios se observa una división semejante en genotipos, en el caso de Typhimurium los 13 aislados se dividen en 6 genotipos, mientras que en Anatum los 12 aislados se dividen en 5 genotipos, el mismo número en que se dividen los 9 aislados de Agona. Aunque el número de aislados analizados en cada caso es reducido, se puede observar, particularmente en el caso de los serotipos Typhimurium y Anatum, una mezcla de genotipos que presentan una amplia distribución por el estado de Michoacán (TyG2 y AnG3), con genotipos restringidos geográficamente (TyG6 y AnG5). Por otra parte, en los tres serotipos mayoritarios, el valor de D para los marcadores rep-PCR osciló, tomados independientemente o de manera conjunta, entre 0.995 y 0.999, valores que muestran claramente el poder de discriminación de dichas herramientas de tipificación.

Los valores del índice de discriminación para analizar aislados de un mismo serotipo de *S. enterica* encontrados en el presente estudio son similares los reportados en la literatura para el elemento ERIC, ya que para los otros dos elementos repetitivos prácticamente no existen antecedentes. En el único estudio encontrado en la literatura en el cual se comparan los tres elementos repetitivos para discriminar entre 118 aislados del serotipo Typhimurium provenientes de muestras de humanos y alimentos, se obtuvieron con el marcador ERIC 21 genotipos con un valor de $D = 0.948$, con REP 18 genotipos y un $D = 0.957$, con BOX 17 genotipos un $D = 0.936$ (Woo y Lee, 2006). En otro estudio, Kumar et al. (2008) analizan 18 aislados del serotipo Typhimurium provenientes de distintas muestras de mariscos y pescado encontrando un índice de discriminación de 0.902.

Valores de índice de discriminación específicos de cepas de los serotipos Agona y Anatum no se encontraron en la literatura, pero los valores para otros serotipos no analizados en este trabajo también, presentan valores altos y menores a nuestros valores de D , empleando el marcador ERIC. En ese sentido, para aislados de los serotipos Rissen y Weltevreden obtenidos de mariscos y peces se han reportado valores de 0.969 y 0.965, respectivamente (Kumar et al., 2009). En el caso del análisis de cepas de muestras clínicas del serotipo Typhi obtenidas durante un periodo de 20 años, el valor de D reportado con ERIC es de 0.9821 (Nath et al., 2010).

En general, los valores del índice de discriminación de los distintos estudios, incluido el presente trabajo se encuentran por encima de 0.900. Es importante remarcar la observación de que en la mayoría de los estudios dicho poder de discriminación es independiente del serotipo analizado, el número de aislados tipificados, la muestra de procedencia, el periodo de muestreo considerado. Esto muestra la utilidad de los elementos repetitivos, particularmente el marcador ERIC, para

diferenciar genéticamente entre aislados de *S. enterica* de un mismo serotipo, tanto en estudios epidemiológicos de brotes como en análisis de inocuidad alimentaria.

Los resultados del presente trabajo no mostraron correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las cepas estudiadas, ni cuando se consideran los 102 aislados en conjunto, ni cuando se analizan de manera independiente las cepas de los tres serotipo mayoritarios. Los resultados de la prueba de Mantel junto con los patrones de agrupamiento de los dendogramas generados sugieren que varios de los genotipos de los serotipos mayoritarios de *S. enterica* encontrados en los alimentos tienen una gran capacidad de dispersión por el estado de Michoacán.

A la fecha, prácticamente no existen estudios de correlación entre distancia genética y distancia geográfica entre aislados de ningún serotipo de *Salmonella enterica*. La mayoría de los estudios de transmisión de *S. enterica* han sido realizados en ambientes de producción de aves (Kim et al., 2007), cerdos (Dorr et al., 2009) o ganado lechero (Langvad et al., 2006), los cuales no involucran grandes distancias geográficas. En uno de estos estudios se analizan granjas en un área de 15 km (Langvad et al., 2006) y se encuentra que un alto porcentaje de estas, entre las cuales no ha habido intercambio de animales, comparten un genotipo del serotipo Typhimurium, por lo que se sugiere que la transmisión puede deberse a personas, maquinaria u otro factor físico. El personal que trabaja en empresas relacionadas con producción de alimentos ha sido relacionado con la dispersión a pequeña escala de *S. enterica* (Todd et al., 2009), por lo que la movilidad de personas en una escala geográfica más amplia puede ser un factor de diseminación de dicho patógeno, lo que puede explicar parcialmente la dispersión de ciertos genotipos en Michoacán.

Se ha documentado que *Salmonella enterica* es capaz de sobrevivir por largos periodos en el ambiente de suelo y agua fuera de sus hospederos (Winfield y Groisman, 2003). Adicionalmente, debido a que diversos serotipos de *S. enterica* no parecen mostrar especificidad por algún hospedero y al hecho de que diversos animales pueden ser acarreadores asintomáticos, se ha sugerido un ciclo de infección- excreción-infección a nuevo hospedero, que permite la transmisión de *S. enterica* (Winfield y Groisman, 2003). Tanto la capacidad de sobrevivencia de *S. enterica* afuera del tracto digestivo de los animales y el hombre, como la posibilidad de colonizar el tracto digestivo de distintos tipos de animales silvestres, pueden ser factores que contribuyan a la dispersión de este patógeno a grandes distancias geográficas. En particular, se ha reportado que diversas especies de aves silvestres pueden ser portadoras de *S. enterica* (Tsiodras et al., 2008).

Otros factores de dispersión de *S. enterica* como el viento y las lluvias no deben ser descartados, sin embargo, a la fecha estas variables no han sido exploradas en distancias geográficas amplias, como las abarcadas en el presente trabajo.

IX. CONCLUSIONES

- a) De los tres marcadores, el ensayo ERIC mostró tener un mayor poder de discriminación entre las cepas de estudio.
- b) La combinación de los tres marcadores (ERIC, REP, BOX) mostró mayor poder de discriminación que el análisis por separado de cada marcador.
- c) Existe una gran diversidad genética significativa entre las cepas analizadas, evidenciada por el número de genotipos encontrados y por el valor de D calculado, tanto cuando se consideran todos los aislados como cuando se analizan los serotipos mayoritarios.
- d) Los patrones de agrupamiento por genotipos no muestran relación con los serotipos analizados.
- e) Existe una distribución geográfica diferencial entre los genotipos de los serotipos mayoritarios, ya que mientras algunos de estos se distribuyen ampliamente en Michoacán, otros muestran mayor restricción geográfica.
- f) No se observó correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de los aislados analizados.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bachellier S, Perrin D, Hofnung M, and Gilson E. 1993. Bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs) are presents in the genome of Klebsiella. *Molecular Microbiology*. 7:537-544.
- Belkum AV, Sluter M, Groot R, Verbrugh H and Hermans PW. 1996. Novel BOX Repeat PCR Assay for High-Resolution Typing of *Streptococcus pneumoniae* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:1176-1179.
- Beltran P, Musser J.M, Helmuth R, Farmer J.J, Frerichs W.M, Cravioto A, Selander, R.K. 1988. Toward a population genetic analysis of Salmonella: genetic diversity and relationships among strains of serotypes S. cholerasuis, S. derby, S. dublin, S. enteritidis, S. heidelberg, S. infantis, S. newport, and S. typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85, 7753–7757.
- Benenson AS and Chin J. 1995. Control of communicable diseases manual. American Public Health Association . Washington D.C
- Bennasar A, Luna G, Cabrer B, Lalucat J. 2000. Rapid identification of Salmonella typhimurium, S. enteritidis and S. virchow isolates by Polymerase Chain Reaction based fingerprinting methods. *International Microbiology*. 3:31–38.
- Bhowmick PP, Srikumar S, Devegowda D, Shekar S, Ruwandepika HAD, Karunasagar I. 2012. Serotyping and molecular characterization for study genetic diversity among seafood associated nontyphoidal Salmonella serovars. *Indian Journal of Medical Research*. 135: 371-381.
- Bruijn FJ, Lupski JR, and Weinstock GM. 1999. Bacterial Genomes Physical Structure and Analysis. 2a. ed. Kluwer Academic Publisher. United States of America. 793pp.
- Burr MD, Josephson KL, and Pepper IL. 1998. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating Salmonella serotypes. *Letters in Applied Microbiology*. 27: 24-30.
- Caffer MI, y Terragno R. 2001. Subsecretaría de Investigación y Tecnología ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología Servicio Enterobacterias Buenos Aires, Argentina.
- Cimons M. 2000. Rapid food-borne pathogen ID system is making a difference. *American Society for Microbiology News*. 66:617-618.
- Cohen JI, Barlett JA, and Corey GR.1987. Extraintestinal manifestations of *Salmonella* infections. *Medicine(Baltimore)*. 66(5):349-388.
- Dimri GP, Rudd KE, Morgan MK, Bayat.H and Ames GF. 1992..Phisical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences en *Escherichia coli* and phylogenetic distribution among *Escherichia coli* strains and other enteric bacteria. *Journal of Bacteriology*. 174: 4583-4593.

- Dorr PM, Tadesse DA, Zewde BM, Fry P, Thakur S, and Gebreyes WA. 2009. Longitudinal Study of *Salmonella* Dispersion and the Role of Environmental Contamination in Commercial Swine Production Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (6):1478–1486.
- Elloulu BD, Elizabeth D.P, Threlfall E.J, Bolton F.J, Upton M, Fox A.J. 2010. Comparison of a semi-automated rep-PCR system and multilocus sequence typing for differentiation of *Salmonella enterica* isolates. *Journal of Microbiological Methods*. 81: 11–16.
- Ewen CD, Todd, Judy D. Greigh, Charles A. Bartleson, and Barry S. Michaels. 2009. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of Foodborne Disease. Part 6. Transmission and Survival of Pathogens in the Food Processing and Preparation Environment. *Journal of Food Protection*. 1: 202–219.
- Forsyth MH, and Geary F. 1996. The repetitive element Rep MP 1 of *Mycoplasma pneumonia* exist as a core element within a larger, variable repetitive mosaic. *Journal of Bacteriology*. 178:917-921.
- Gilson E, Perrin D, Clement D, Brutlag and Hofnung M. 1984. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E.coli*. *European Molecular Biology Organization Journal*. 3:1417-1421.
- Gilson E, Perrin D, and Hofnung M. 1990. DNA polymerase I and a protein complex bind specifically to *E. coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. *Nucleic Acids Research* 18:3941-3952.
- Gilson E, Saurin W, Perrin D, Bachellier S, and Hofnung M. 1991 a. The BIME family of bacterial highly repetitive sequences. *Research Microbiology*. 142 (2-3):217-222.
- Gilson E, Saurin W, Perrin D, Bachellier S, and M. Hofnung M. 1991 b. Palindromic units are part of a new bacterial interspersed mosaic element (BIME). *Nucleic Acids Research*. 19:1375-1383.
- Grimont, P.A.D., Weill, F.-X. (2007) *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*, (ninth ed.) Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur. Disponible en: http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_En.pdf.
- Gutierrez-Gogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera Pérez P, Gonzalez-Andrade MC. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los Servicios de Salud en México. *Salud Pública México*. 42: 490-495.
- Hieth KL, Seal BS, 2009. Use of element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. *Methods in Molecular Biology*. 551: 49-58.
- Higgins CF, Ames WM, Barnes JM, Clement and M. Hofnung. 1982. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* 298:760-762.

- Higgins CF, Mc Laren RS and Newbury SF. 1988. Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression evolution by gene conversion? A review. *Gene* 72:3-14.
- Hulton CS, Higgins CF, and Sharp PM. 1991. ERIC sequences a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5: 825-834.
- Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical Index of Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 26: 2465-2466.
- Huerta CR, 2003. Patrón de resistencia a diferentes antimicrobianos de cepas de *Salmonella sp.* Aisladas de materia fecal de pacientes con diarrea y niños sanos. Tesis de Licenciatura Fac. de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán, México. 78pp.
- Josefsen MH, Hansen F, and Hoofar J. 2007. Optimization of 12- hour TaqMan PCR based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat. *Applied and Environmental Microbiology.* 73: 3040-3048
- Karms JS, Van Kessel JS, McCluskey BJ, and Perdue ML. 2005. Prevalence of *Salmonella enterica* in bulk tank milk from US dairies as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science.* 88: 3475-3479.
- Kim A, Lee JY, Kang MS, Kwag SI, Cho JK. 2007. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *Journal of Veterinary Science.* 8(2): 155–161.
- Koueth T, Versalovic J, and Lupski JR. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research* 5:408-418.
- Kumar R, Surendran PK, Thampuran N. 2008. Molecular fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Derby isolated from tropical seafood in South India. *Molecular Biotechnology.* 40:95–100.
- Kumar R, Surendran PK and Thampuran N. 2009. Distribution and genotypic characterization of *Salmonella* serovars isolated from tropical seafood of Cochin, India. *Journal of Applied Microbiology* 106: 515–524.
- Langvad B, Skov MN, Rattenborg E, Olsen JE and Baggesen DL 2006. Transmission routes of *Salmonella* Typhimurium DT 104 between 14 cattle and pig herds in Denmark demonstrated by molecular fingerprinting. *Journal of Applied Microbiology* 101: 883–890.
- Learn-Han L, Yoke-Kqueen C, Salleh NA, Sukardi S, Jiun-Horng S, Chai-Hoon K, Radu S. 2008. Analysis of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Weltevreden in Malaysia by PCR fingerprinting and antibiotic resistance profiling. *Antonie van Leeuwenhoek.* 94:377–387.

- Li Y and Musthafa A. 2002. Evaluation of template preparation methods for polymerase chain reaction –based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. Letters in Applied Microbiology. 35: 508-512.
- Liebana E, Guns D, García-Migura L, Woodward MJ, Clifton- Hadley, and Davies RH. 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. Journal of Clinical Microbiology. 39: 3609-3616.
- Lim H, Lee KH, Hong CH, Bahk GJ, and Choi WS. 2005. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella spp.* International Journal of Food Microbiology. 105: 411-418.
- Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, *et al.*, 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic. Acids Research. 20:3479-3483.
- Malorny B. Paccasoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, and Helmuth R. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. Applied and Environmental Microbiology. 70: 7046-7052.
- Millemann Y, Lesage-Descauses MC, Lafont JP, and Chaslus-Dancla E. 1996. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiologic studies of *Salmonella*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 14: 129-134.
- Mollie D. Winfield and Eduardo A. Groisman. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology. 73: 687–3694
- Murakami K, Horikawa K, and Otuzuki K, 1999, Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* from human outbreaks by pulse field gel electrophoresis. Journal Veterinary Medicine Science. 61: 439-442.
- Nath G, Maurya P, Gulati AK. 2010. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella Typhi* strains isolated over a period of two decades. Infection, Genetics and Evolution 10: 530–536.
- Newbury SF, Smith NH, Robinson ID Hiles and Higgins CF. 1987. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. Cell 48: 297-310
- Oliveira SD Bessa MC, Santos LR, Cardoso MR, Brandelli A, Canal CW. 2007. Phenotypic and Genotypic characterization of *Salmonella Enteritidis* isolates. Brazilian Journal of Microbiology. 38:720-728.
- Patrick M. 2009 FoodNet News. An introduction to FoodNet Sites. 2: 1.
- Peakall, R. and Smouse, PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, 288-295.

- Perron GG, Quessy S, Letellier A, and Bell G. 2007. Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic *Salmonella enterica* serotype Typhimurim DT104. *Infection, Genetics and Evolution*. 7: 223-228.
- Popoff MY, Bockemuhl J, Brener FW, and Gheesling LL. 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffman-White scheme. *Research in Microbiology*. 152:907-909.
- Rasschaert G, Houf K, Imberechts H, Grijspeerdt K, De Zutter L, and Heyndrickx. 2005. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 3615-3623.
- Regalado I. 2010. Aislamiento y caracterización Bioquímica y Genética de *Salmonella enterica subsp. enterica* de productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán México. Tesis de Maestría. Fac., de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México. 68 pp.
- Sambrook J, Rusell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3 ed. Vol.II, Chap. 8, protocol 1.
- Sharples and Robert G.Lloyd 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 22: 6503-6508
- Stern MJ, Ames NH, Smith EC, Robinson and Higgins CF. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a Major component of the bacterial genome. *Cell* 37: 1015-1026.
- Solghan SM, Zansky SM, Dumas NB, Roof TP, Quinlan TM, Amstrong LR, and Spina NL. 2009 Multi-drug Resistant Non – Thyphoidal *Salmonella* in New York State Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) counties. *FoodNet* 2:issue 4 summer.
- Torpdahl M and P Ahrens. 2004. Population structure of *Salmonella* investigated by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology*. 97:566–573.
- Tikoo A, Tripathi AK, Verma SC, Agrawal N y Nath G. 2001 *Current Science*. 8:1049-1052.
- Tobes R, Pareja E. 2006. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion sequence elements. *BioMed Central Genomics* 7:62.
- Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Matthew E. Falagas ME. 2008. Human infections associated with wild birds. *Journal of Infection*. 56: 83-98.
- Van Lith LA, and Aarts JM. 1994. Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Letters in Applied Microbiology*. 19: 273-276
- Versalovic J, Koueth T, and Lupski JR. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831

- Verslovic . J, and Lupski JR. 1995. DNA fingerprinting of Neisseria strains by rep-PCR. Meth. Mol. Cell Biol. 5:96-104.
- WHO. 2002. Foodborne diseases, emerging. Geneva, World Health Organization. Fact Sheet No. 124.
- WHO. 2008. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and Yeh KS, Ch TH, Liao CW, Chang CS, and Lo HC, 2002. PCR amplification of the *Salmonella typhimurium* fimY gen sequence to detect the *Salmonella* species. International Journal of Food Microbiology, 78: 227-234.
- Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, Suh DK, Barber DA, Isaacson RE, and White BA. 2004. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. Veterinary Microbiology. 100: 205-217.
- Wise MG, Siragusa GR, Plumblee J, Healy M, Cray PJ, Seal BS, 2009. Predicting *Salmonella enterica* serotypes by repetitive sequence-based PCR. Journal of Microbiological Methods. 76: 18–24.
- Woo YK, and Lee SH. 2006. Genetic diversity of multi-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from animals and humans. The Journal of Microbiology. 1:106-112.
- Yang Y, and Ames GF 1990. The family of repetitive extragenic palindromic sequences: Interaction with DNA gyrase and histonelike protein HU. In the bacterial chromosome. KDrlica. Ed. Pp. 211-225. American Society of Microbiology. Washington D.C.
- Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-García MT, León V, Vázquez G, Figueroa G et al. Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* in México. Emerging Infection Diseases 2008;14:429-435.
- Ziemer CJ and Steadham SR. 2003. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. Letters in Applied Microbiology. 37:463-469.

XI.2 MATRIZ BINARIA DEL ENSAYO REP

PB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	34	35	36	38	39	40	42	45	46	47	48	49	50	52									
18600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
9600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
8300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7378	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4528	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4417	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4300	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3600	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3300	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2970	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2670	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2553	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2470	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2300	0	0	0	0	0</																																																

