



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**TESIS:**

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE  
*Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN  
MICHOACÁN

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACOBIOLOGA

P R E S E N T A:

ESTELA LOPEZ CRUZ

**DIRECTOR DE TESIS:**

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

Morelia, Michoacán, septiembre, 2018

**“Una persona que nunca ha cometido un error nunca  
intenta nada nuevo”**

**-Albert Einstein-**

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por haberme dado la oportunidad de llegar hasta donde estoy, por guiarme y ser mi fortaleza en todo momento, por día a día darme un motivo para seguir adelante, por poner en mi camino personas buenas y malas porque gracias a ellos aprendí que lo mejor de la vida comienza cuando aprendes las lecciones de la vida. A mis padres Francisco y Guadalupe quienes siempre me apoyaron en todo momento, por creer en mí, incluso cuando ni yo misma lo hacía, para seguir mi sueño. Gracias a su esfuerzo, dedicación y amor que se refleja en este trabajo y en mi vida porque gracias a ustedes soy lo que soy. Es un gran orgullo ser su hija, son lo mejor de toda mi vida, los amo, gracias por enseñarme que nunca hay que voltear hacia atrás ni para agarrar vuelo.*

*A mis abuelos sobre todo a quien fuera como mi madre Domitila, gracias por enseñarme de valores y que la vida hay que aprovecharla, por cuidarme cada día de mi vida, por creer en que cumpliría mi meta hasta en tus últimos momentos de vida, por sonreír todos los días cuando estaba triste, para que sonriera contigo, porque cumplí su sueño y el mío y ahora sí soy muy feliz.*

*A mis hermanos Francisco y Julio gracias por el apoyo que me brindaron, por soportar mi mal genio, por ayudarme cuando más los necesitaba, sin ustedes mi vida no tendría sentido son lo más importante de mi corazón, son el motor de mi vida, quienes me hacen reír y llorar pero sobre todo aprender ya que me han enseñado a madurar y a crecer como persona a pesar de sus cortas edades.*

*A mis tías Rosa y Hortensia porque siempre que las necesito han estado ahí apoyándome desvelándose conmigo, por escucharme cuando las necesito muchas gracias*

*A mi novio Juan por siempre estar ahí cuando estoy triste, por cuidarme cuando el estrés me está matando y darme consejos porque sé que siempre contaré contigo, porque contigo aprendí que el amor a la familia y al trabajo comienza por el amor hacia uno mismo.*

*A mi asesora, la Dra. Sol por darme la oportunidad de comenzar este proyecto, por compartir sus conocimientos conmigo, por su paciencia y dedicación pero sobre todo por*

*el excelente ser humano que es, porque el éxito de su trabajo es realizarlo con cariño, dedicación y esfuerzo, gracias por la confianza y por enseñarme a tomar decisiones por mí misma y permitirme formar parte de la historia de su equipo de trabajo.*

*A mis primos Juan, Carmen, Paola por estar conmigo en el peor momento de mi vida porque con ustedes viví toda una vida y siempre estuvimos para apoyarnos.*

*A mis compañeros y amigos Francisco, Mar, Andrea, Edgardo, Eva, Rubén y Adrián quienes siempre me apoyaron cuando tenía dudas, por compartir sus conocimientos conmigo por las risas compartidas y los consejos que me brindaron.*

*A mi queridas amigas Elia y Azucena quienes siempre estuvieron apoyándome con sus consejos por hablarme siempre con sinceridad por ser la mejores amigas y hermanas del corazón.*

*A mis amigos de la licenciatura Marina, Lucero, Cecilia, Jaime, con quienes viví buenos y malos momentos gracias por compartir sus conocimientos, por soportarme cuando estaba enojada por los consejos y el apoyo por compartir seis años de sus vidas conmigo porque son los hermanos del alma que elegí.*

*A mis profesores que durante toda la carrera hicieron de mi formación orientada al conocimiento y respeto con mis semejantes, sobre todo al profesor Ignacio Ramírez Anaya quien me convenció de estudiar esta carrera la cual se convirtió en mi vida, por sus palabras que siempre llevo en mi mente “Para llegar a ser lo que quieres hay caminos más largos solo no olvides la meta”.*

*Gracias a todos, sin ustedes mi vida el día de hoy no sería la misma, he soñado en grande por su apoyo la mejor recompensa de mi vida fue conocerlos, gracias, porque, me he caído y tocado el fondo, pero una vez que lo tocas no queda más que subir y ustedes han estado ahí siempre.*

*“La ciencia comienza por sueños pequeños, errores muy grandes, que conducen hacia la verdad produciendo una gran realidad”*

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
ÍNDICE GENERAL.....	<b>I</b>
ÍNDICE DE TABLAS.....	<b>III</b>
ÍNDICE DE FIGURAS .....	<b>IV</b>
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	<b>VI</b>
RESUMEN .....	<b>VIII</b>
ABSTRACT.....	<b>IX</b>

## INDICE GENERAL

<b>INDICE GENERAL</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 El género <i>Salmonella</i></b> .....	1
1.1.1 Clasificación taxonómica .....	1
1.1.2 Características Morfológicas.....	2
1.1.3 Características bioquímicas .....	3
1.1.4 Hábitat.....	3
<b>1.2 Patología</b> .....	4
1.2.1 Salmonelosis con síndrome tifoídico .....	4
1.2.2 Salmonelosis no tifoideas.....	5
<b>1.3 Epidemiología</b> .....	6
<b>1.4 Tratamiento</b> .....	8
<b>1.5 Patogenia</b> .....	8
1.5.1 Factores de Virulencia.....	9
<b>1.6 Plásmidos de virulencia</b> .....	16
<b>1.7 Gen <i>spvC</i></b> .....	18
<b>1.8 Métodos de tipificación de <i>Salmonella</i></b> .....	18
1.8.1 Serotipificación .....	18
1.8.2 Perfil plasmídico .....	20
<b>1.9 Estudios genético moleculares de <i>Salmonella</i> realizados en Michoacán</b> .....	20
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>3. HIPOTESIS</b> .....	23
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>4.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	23
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
<b>5. ESTRATEGIA</b> .....	24
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
<b>6.1 Material biológico</b> .....	25
<b>6.2 Extracción de ADN plasmídico</b> .....	34
<b>6.3 Amplificación del gen de virulencia <i>spvC</i></b> .....	34
<b>6.4 Construcción de los perfiles plasmídicos y dendrogramas de similitud</b> .....	35

6.5 Asociación entre el perfil plasmídico, Serotipo, lugar de procedencia alimento y sensibilidad a antibióticos.....	35
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Distribución geográfica de las cepas de acuerdo a su serotipo.....	36
7.2 Plásmidos presentes en las cepas de estudio .....	37
7.3 Distribución geográfica de serotipos que presentaron plásmidos.....	41
7.4 Perfiles plasmídicos de las cepas de estudio.....	42
7.5 Relación genética entre las cepas con base en el perfil de plásmidos. ....	52
7.6 Comparación con la susceptibilidad antimicrobiana.....	64
7.7 Amplificación por PCR del gen <i>spvC</i> asociado a virulencia.....	64
7.8 Asociación del perfil plasmídico con diferentes variables. ....	65
8. DISCUSIÓN.....	66
9. RESUMEN DE RESULTADOS .....	72
10. CONCLUSIÓN.....	73
11. BIBLIOGRAFÍA.....	74
ANEXOS.....	80

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Especies, Subespecies, Serotipos y hábitats usuales del género <i>Salmonella</i> según el esquema Kauffman White.	1
2	Mecanismos del proceso infeccioso.	10
3	Cepas estudiadas.	25
4	Cepas de <i>S. enterica</i> que presentaron un plásmido.	42
5	Cepas de <i>S. enterica</i> que presentaron dos plásmidos.	44
6	Cepas de <i>S. enterica</i> que presentaron tres plásmidos.	46
7	Cepas de <i>S. enterica</i> que presentaron cuatro plásmidos.	48
8	Cepas de <i>S. enterica</i> que presentaron cinco plásmidos.	51
9	Cepas de <i>S. enterica</i> que presentaron seis plásmidos.	51
10	Cepas analizadas que presentaron perfil plasmídico idéntico.	63



## INDICE DE FIGURAS

<b>Num.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pag.</b>
1	Pared Celular de una bacteria Gram negativa.	2
2	Factores y genes de virulencia de <i>Salmonella enterica</i> .	12
3	Procesos implicados en la patogénesis de <i>Salmonella</i> .	13
4	Representación esquemática de los mapas genéticos de 4 plásmidos V de <i>Salmonella</i> .	17
5	Serotipos de las cepas utilizadas en este estudio.	33
6	Lugar de procedencia de las cepas de <i>S.enterica</i> analizadas en este estudio.	36
7	Ejemplos de plásmidos encontrados en las cepas de <i>Salmonella enterica</i> analizadas en este estudio.	37
8	Plásmidos de entre 12 pb-42,248pb en las cepas analizadas	38
9	Frecuencia de serotipos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán utilizados en este estudio que presentaron plásmidos entre 576pb-54,180pb.	39
10	Frecuencia de serotipos de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán que presentaron plásmidos entre 680pb-11,363pb.	39
11	Frecuencia de serotipos de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán utilizados en este estudio que presentaron plásmidos entre 12,000pb-42,248pb.	40
12	Frecuencia de serotipos de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán utilizados en este estudio sin plásmido.	40
13	Distribución de plasmidos encontrados en el estudio y agrupados por serotipo en el Estado de Michoacán.	41
14	Numero de bandas obtenidas del perfil plasmídico de <i>Salmonella enterica</i> analizadas en este estudio.	52
15	Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de aislados sin serotipificar de heces humanas y de alimentos de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán.	53
16	Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos del serotipo Anatum aislados de diferentes alimentos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán.	56
17	Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos del serotipo Typhimurium aislados de diferentes alimentos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán.	57
18	Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Give, Derby y Senftenberg aislados de diferentes alimentos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán.	58
19	Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Panama y Agona aislados de diferentes alimentos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán.	59
20	Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Vejle, Enteritidis, Newport, Havana, Saintpaul aislados de diferentes alimentos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán.	60
21	Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Adelaide, Javiana, Bredency, Montevideo, London, Sinstorf, Muenchen,	61

	Oranienburg aislados de diferentes alimentos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán	
22	Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Bovismorbificans, Reading, Poona, Infantis, Lockleaze, Muenster, Sandiego, Kentucky, Braenderup, Azteca, Herdelberg, Albany aislados de diferentes alimentos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> del Estado de Michoacán.	62
23	Gen de virulencia <i>spvC</i> en plásmidos de cepas <i>S. enterica</i> analizadas en este estudio	64

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>CCC</b>	Covalently Closed Circular
<b>Datp</b>	Deoxinucleosido Trifosfato de Adenina
<b>dCTP</b>	Deoxinucleosido Trifosfato de Citocina
<b>dGTP</b>	Deoxinucleosido Trifosfato de Guanina
<b>dTTP</b>	Deoxinucleosido Trifosfato de Timina
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiamino Tetracético
<b>h</b>	Horas
<b>hrf</b>	High frequency of recombination
<b>IG's</b>	Islas genómicas
<b>IPs</b>	Islas de patogenicidad
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>LBA</b>	Agar Luria Bertani
<b>LESP</b>	Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>M</b>	Molar
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>mM</b>	Milimolar
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información para Biotecnología
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PP</b>	perfil plasmídico
<b>PV</b>	Perfil de virulencia

<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RTX</b>	Toxina formadora de poro
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>SSTIII</b>	Sistema de secreción tipo III
<b>sp.</b>	Especie
<b>SPI</b>	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>
<b>spv</b>	<i>Salmonella</i> plasmid virulence
<b>Tris-HCl</b>	Tris-Ácido Clorhídrico
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>V</b>	Virulencia
<b>VP</b>	Voges-Proskauer
<b>WHO</b>	World Health Organization

## RESUMEN

Las enfermedades gastrointestinales son la principal causa de discapacidad, morbilidad y mortalidad transmitida por alimentos, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, siendo *Salmonella enterica* uno de los principales agentes etiológicos. El control de este patógeno requiere de marcadores genético moleculares que ayuden a optimizar la vigilancia epidemiológica, establecer estrategias de prevención, mejorar la inocuidad y el control de las enfermedades. Un ejemplo de estos marcadores son los perfiles plasmídicos. Los plásmidos pueden contener genes relacionados con virulencia como el plásmido *spvC* asociado con la supervivencia de la bacteria dentro del hospedero. En este trabajo se estudiaron los perfiles plasmídicos de 297 cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos y heces humanas colectadas durante el periodo 2008-2015. La mayoría de las cepas corresponden a los serotipos Anatum y Typhimurium que junto con las cepas aisladas de humanos, presentaron un alto número de plásmidos. El amplicón del gen *spvC* únicamente se encontró en el serotipo Enteritidis. Utilizando la prueba Chi-cuadrada de Pearson, se encontró una relación entre el serotipo y el perfil plasmídico sin embargo, no se encontró relación entre el perfil plasmídico y el alimento de origen. Los resultados sugieren que el perfil plasmídico continúa siendo un buen método de genotipificación que se relaciona con la virulencia.

**Palabras clave:** *Salmonella*, virulencia, genotipificación

## ABSTRACT

Gastrointestinal diseases are the main cause of food-borne disability, morbidity and mortality, both in developed and developing countries, being *Salmonella enterica* one of the main etiological agents. The control of this pathogen requires molecular genetic markers that help optimize epidemiological surveillance to establish prevention strategies, improve the safety and control of diseases. An example of these markers is the plasmid profile. The plasmids can contain genes related to virulence such as the *spvC* plasmid associated with the survival of the bacteria within the host. In this work, the plasmid profiles were studied of 297 strains of *S. enterica* isolated from food and human feces collected during the period 2008-2015. Most of the strains correspond to the Anatum, Typhimurium serotypes and strains isolated from humans being the ones with the highest number of plasmids. The amplicon of the *spvC* gene was only found in the Enteritidis serotype. Using the Chi-square test of Pearson, was found a relationship between the serotype and the plasmid profile, however, no relationship was found between the plasmid profile and the origin food. The results suggest that the plasmid profile continues to be a good genotyping method that is related to virulence.

**Key words:** Salmonella, plasmids, virulence.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El género *Salmonella*

### 1.1.1 Clasificación taxonómica

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y actualmente se clasifica en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Tabla 1) (Durango, et al., 2004). Las cuales se dividen en más de 2500 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos (O) y flagelares (H) (Fig.1). *S. enterica* se divide en 6 subespecies de las cuales la mayoría de las serovariedades que constituyen más del 99.5% de los aislamientos del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* (I) y llevan un nombre por lo general, relacionado con el lugar geográfico donde se aisló por primera vez (Lopardo, 2016). Dentro de la subespecie *enterica* encontramos la sub-división en *Salmonella* Tifoidea (responsable de causar fiebre tifoidea) y *Salmonella* no tifoidea.

**Tabla 1. Especies, Subespecies, Serotipos y hábitats usuales del género *Salmonella* según el esquema Kauffman White.**

	SUBESPECIE	NUMERO DE SEROTIPOS DENTRO DE LA SUBESPECIE	HÁBITATS
<b>I</b>	<i>S. enterica</i> subespecie <i>enterica</i>	1,454	Animales de sangre Caliente
<b>II</b>	<i>S. enterica</i> subespecie <i>salamae</i>	489	Animales de sangre fría y el ambiente
<b>IIIa</b>	<i>S. enterica</i> subespecie <i>arizonae</i>	94	Animales de sangre fría y el ambiente
<b>IIIb</b>	<i>S. enterica</i> subespecie <i>diarizonae</i>	324	Animales de sangre fría y el ambiente
<b>IV</b>	<i>S. enterica</i> subespecie <i>houtanae</i>	70	Animales de sangre fría y el ambiente
<b>VI</b>	<i>S. enterica</i> subespecie <i>indica</i>	12	Animales de sangre fría y el ambiente
<b>V</b>	<i>S. bongori</i>	20	Animales de sangre fría y el ambiente
	Total	2,263	

(Brenner, et al., 2000).



### 1.1.2 Características Morfológicas.

Las cepas de *Salmonella* son bacilos Gram-Negativos, los cuales miden de 0,7-1,5 x 2,0 - 5µm, no esporulados, flagelados (excepto *S. Gallinarum*), facultativamente anaeróbicos, contienen una envoltura celular compleja de lipopolisacárido (LPS) (Fig.1), (Domínguez, *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2006).

Las cepas de *Salmonella* crecen bien en medios ordinarios con incubación de 18-24h a 37° C formando colonias de 2-3mm de diámetro, a excepción de algunos serotipos que producen colonias pequeñas, algunas excepciones no presentan cápsula además de que necesitan un pH óptimo de 6.6 y 8.2 , resisten temperaturas de 5.3 a 6.2°C, algunas bacterias son capaces de tolerar elevadas concentraciones de sal (Parra *et al.*, 2002).

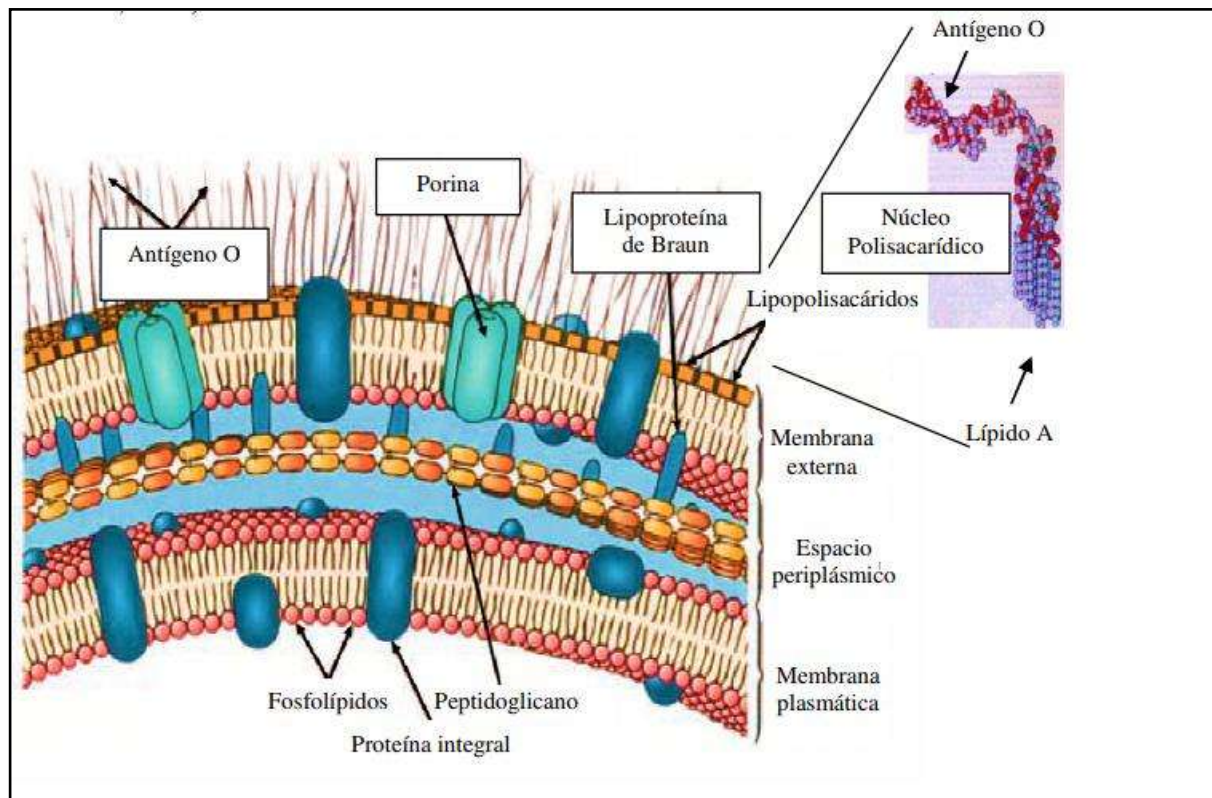


Figura.1 Pared celular de una bacteria Gram negativa (Prescott *et al.*, 2004).



### 1.1.3 Características bioquímicas

*Salmonella* se caracteriza por poseer un metabolismo fermentativo-oxidativo, no fermenta lactosa pero fermenta glucosa con producción de ácido y gas (excepto *S. Typhi*), además de fermentar L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa, y D-dulcitol, son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo y citrato de Simmons positivo, produce H<sub>2</sub>S. Las cepas de *Salmonella* son urea negativa, lisina, ornitina y descarboxilasa positivas. Además son capaces de reducir nitratos a nitritos, no desaminan la fenilalanina y son tetracionato reductasa positiva (Parra *et al.*, 2002).

### 1.1.4 Hábitat

*Salmonella* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose como comensales y patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y animales (Lopardo, 2016). Se encuentra además en heces, orina de humanos y alimentos contaminados (OMS, 2016). En el Estado de Michoacán los principales reservorios son huevos, carne, aves de corral, hortalizas y leche (comunicación personal LESP, 2017).

Epidemiológicamente se clasifica en 3 grupos:

- a) Las que no tienen preferencia por un huésped en especial por lo que infectan tanto al hombre como a los animales encontrándose en este grupo la mayoría de las serovariedades responsables de la salmonelosis.
- b) Los que infectan solo al hombre: *S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Paratyphi A y *S. enterica* serovar Paratyphi C.
- c) Los que están adaptados a un huésped animal: *S. enterica* serovar Abortusovis a los ovinos, *S. enterica* serovar Abortusequi a los equinos, *S. enterica* serovar Gallinarum a las aves. Algunos serovares tales como Dublin, Typhimurium, y Choleraesuis causan enfermedades tanto en animales como en humanos (Coburn *et al.*, 2006).



## 1.2 Patología

Para que *S. enterica* pueda causar daño en el hospedero, es necesaria la ingestión de 5,0000 bacterias. Los síntomas ocurren entre 6 y 72 h después del consumo, presentándose cuatro de los síndromes principales: Fiebre enterica (fiebre tifoidea), enterocolitis/diarreas, bacteremia, y transporte crónico asintomático (Zaidi *et al.*, 2006).

*Salmonella* sp, puede causar desde una infección gastrointestinal media a severa que podría llegar incluso a una infección sistémica comprometiendo a la vida del paciente, dependiendo de su especie, el tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados en la cepa, hospedero involucrado, estado inmunológico e intervención médica (Figuroa *et al.*, 2005). En personas que tienen un sistema inmune debilitado, las infecciones por este patógeno pueden causar septicemia (Informed Health, 2016).

La salmonelosis es una enfermedad aguda cuyos síntomas se caracterizan por un inicio agudo, calambres, dolor abdominal y diarrea con o sin sangre, náuseas y vómito (Coburn *et al.*, 2006). Esta enfermedad se subdivide en dos cuadros clínicos las que producen síndromes tifoídicos y las las salmonelosis no tifoideas (Parra *et al.*, 2002)

### 1.2.1 Salmonelosis con síndrome Tifoídico

Produce por lo general una infección sistémica invasiva conocida como fiebre tifoidea o fiebre entérica (Raffatelu *et al.*, 2007). Causada principalmente por *S. Typhi* y *S. Paratyphi* tipos A, B, C, con presencia de bacterias en la sangre (Parra *et al.*, 2002). La vía de transmisión es fecal-oral, a través de aguas contaminadas no higienizadas, alimentos manipulados por portadores, ingestión de crustáceos contaminado. Se caracteriza por la aparición de escalofríos, fiebre progresiva asociada a estreñimiento o diarrea profusa de carácter inflamatorio se ha asociado a esta enfermedad la braquicardia relativa, pero en realidad es un dato con baja especificidad y sensibilidad, las complicaciones más graves son hemorragias digestivas, hepatoesplenomegalia, perforación intestinal y los aneurismas micóticos (Puerta & Mateos, 2010). El periodo de incubación es de 1 a 10 días, la duración de la enfermedad es variable dependiendo del estado del huésped, pudiendo ocasionar enfermedades generalizadas (Martínez, 2007). En ausencia de complicaciones la



enfermedad se resuelve después de varios periodos de infección, aunque algunas veces el transporte de la bacteria puede continuar durante meses o años en pacientes post-sintomáticos y la recaída ocurre en una minoría de pacientes (Zaidi *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Salmonelosis no tifoideas

Son conocidas también como salmonelosis gastroentéricas y producidas por serotipos de *Salmonella* distintos a *S. Typhi*, siendo también responsables de bacteremias y de infecciones focales extradigestivas en algunas ocasiones, presentándose los diferentes serotipos implicados en la patología humana según su área geográfica siendo las más frecuentes *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Virchow* (Jurado *et al.*, 2010). Los síntomas comienzan con cefalea, náuseas, vómito, dolor abdominal, escalofríos mialgias y diarreas que van desde deposiciones blandas hasta diarreas con aparición de sangre, también ocurre inflamación en el intestino grueso produciéndose infecciones en el yeyuno, duodeno y el estómago (Coburn *et al.*, 2006). Es poco habitual la bacteremia siendo más frecuente en pacientes inmunodeprimidos y son los responsables de focos infecciosos metastásicos (artritis séptica, endarteritis, meningitis, colesistitis, absceso hepático y esplénico). Se presenta un cuadro autolimitado por lo cual no es necesario el uso de antibióticos, únicamente medidas de sostén como la reposición de electrolitos y la rehidratación (Jurado *et al.*, 2010). La terapia antimicrobiana sistemática no está recomendada para casos leves o moderados en personas sanas debido a que no podrían eliminar completamente a la bacteria y seleccionar cepa resistentes volviendo al fármaco ineficaz (OMS, 2016). En pacientes más vulnerables podrían utilizarse quinolonas, cotrimoxazol o amoxicilina. En infecciones vasculares se recomienda un tratamiento con betalactámicos (ampicilina o ceftriaxona), por vía intravenosa durante seis semanas (Jurado *et al.*, 2010).

La infección enterocolítica en niños está marcada por el aumento de la gravedad inflamatoria, la diarrea sanguinolenta y aumento de la duración de la enfermedad (Zaidi *et al.*, 2006). Estudios realizados con animales tras la colonización del intestino por virulencia de *S. enterica* la enterocolitis es más grave en íleon caudal, el ciego y el colon proximal (Figueroa *et al.*, 2005).



En general las personas que son infectadas por la bacteria siguen siendo contagiosas hasta después de un mes que los síntomas hayan desaparecido, ya que la bacteria puede estar presente en las heces u orina durante varias semanas o meses sobre todo en niños y personas adultas (Informed Health, 2016; Parra *et al.*, 2002 ).

### 1.3 Epidemiología

La salmonelosis es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas, se estima que anualmente afecta a decenas de millones de personas y provoca más de cien mil defunciones en todo el mundo (Turki, *et al.*, 2014). Aproximadamente una de cada 10 personas contrae la enfermedad principalmente por el consumo de alimentos insalubres (OMS, 2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos son una de las causas más importantes de discapacidad, morbilidad y mortalidad, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. Se estima que 1.8 millones de niños mueren anualmente a causa de enfermedades diarreicas y una gran proporción de estos se puede atribuir a la contaminación de alimentos con *Salmonella enterica* (Newell *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 2007).

En países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia que permiten conocer la morbilidad y mortalidad a causa de *Salmonella enterica* y otros agentes causales de diarrea para la población (Zaidi *et al.*, 2006).

Algunas enfermedades causadas por *Salmonella* no tifoidea son un problema de salud pública en todas las regiones del mundo afectando a países de ingreso económico alto y bajo por igual (OMS., 2018).

En el Reino Unido ocurren al año 73,193 mientras en los Estados Unidos de América suceden 1, 412,298 infecciones causadas por *Salmonella Typhi*, responsable de aproximadamente el 30% de las muertes relacionadas a infecciones transmitidas por alimentos (Zaidi *et al.*, 2006).

En los Estados Unidos las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) resultan en 76 millones de enfermedades, 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes cada año (Stein *et al.*, 2007). En Europa causaron aproximadamente 152,000 casos confirmados en 2007,



siendo los serotipos más frecuentes encontrados en humanos, Enteritidis (64,5%), Typhimurium (16,5%), Infantis (1,0%), Virchow (0,8%) y Newport (0,6), sin embargo la distribución es variable entre los miembros de la Unión Europea y a través del tiempo (Huehn *et al.*, 2010).

Zaidi y Colaboradores (2003 y 2005) recolectaron en México, muestras fecales de pacientes con diarrea, muestras de carne de pollo, puerco y res y además muestras de intestinos de pollo, cerdo y bovino en rastros, de las cuales aislaron *Salmonella* no-Typhi en 12,8% de los pacientes con diarrea siendo las dos serovariedades más frecuentes Typhimurium (22,22%) y Enteritidis (14.5%). *S. Typhimurium* se encontró en los tres tipos de animales y sus carnes crudas siendo el principal reservorio con un 10,2% la carne de cerdo, seguido de bovino (6,8%) y pollo (4,6%) mientras el serotipo Enteritidis se aisló en un porcentaje mayor en pollo (11,9%) y (0.1%) en carne de bovino y de cerdo.

Datos reportados por la OMS en 2018 muestran que en África que el 70% de las enfermedades de transmisión alimentaria que puede ser transmitida por huevos y carne de aves contaminados, causando 32,000 muertes al año (OMS., 2018).

En el Estado de Michoacán en 2013, la prevalencia de contaminación por *S. enterica* en carne de res fue del 16%, encontrándose un 5.8% de prevalencia de la bacteria en casos de niños con episodios de diarrea y de aproximadamente 2% en muestras de niños asintomáticos. Los serotipos más frecuentemente aislados de carne de res en el Estado de Michoacán son Typhimurium (34.1%) y Derby (24.4%), seguidos de Anatum (9.8%), más otros 11 serotipos en menor proporción. En total, se han detectado 24 serotipos distintos contaminando carne de cerdo, res y pollo en el Estado de Michoacán (LESP comunicación personal, 2013)

En el Estado de Michoacán se reportaron en el 2017 3,498 nuevos casos de Salmonelosis no tifoidea (SINAVE, 2017).



## 1.4 Tratamiento

La mayoría de las personas se recuperan de una salmonelosis de forma espontánea en 2 a 7 días, por lo cual no se requiere tratamiento con antibiótico, solo tratamiento sintomático (The center for food Security & Public Health, 2013), como la reposición de electrolitos (iones sodio, potasio y cloruro) perdidos a raíz de los vómitos y diarrea (OMS, 2015).

Los antibióticos se usan principalmente para septicemia, fiebre intestinal o infecciones focales extraintestinales, muchas cepas clínicas son resistentes a uno o más antibióticos y la elección de medicamentos se debe basar en las pruebas de sensibilidad (The center for food Security & Public Health, 2013).

La salmonelosis suele tratarse con antibióticos como Ampicilina, Amoxicilina, Gentamicina, Trimetoprim-sulfametoxazol, Cefalosporina de tercera generación, Cloranfenicol y Fluoroquinolonas (The center for food Security & Public Health, 2013), sobre todo en grupos de riesgo como lactantes, ancianos e inmunodeprimidos (OMS, 2015). Existen ciertas desventajas con el uso de antibióticos como lo son la prolongación del periodo de excreción bacteriana y el aumento de cepas resistentes a éstos (The center for food Security & Public Health, 2013). Además de no ser recomendados para casos leves o moderados debido a que podrían no eliminar completamente a la bacteria (OMS, 2015).

## 1.5 Patogenia

*Salmonella* es transmitida preferentemente a través de alimentos crudos siendo las fuentes más comunes de la infección de huevos, alimentos a base de huevo como la mayonesa, la carne cruda y los productos cárnicos poco cocinados, también puede llegar a los alimentos por el uso de tablas de cortar contaminadas (Informed Health, 2016). La patogenicidad dependerá de una localización adecuada, tamaño del inóculo, virulencia del microorganismo, acidez gástrica, peristaltismo, flora saprofita intestinal y situación inmunológica del paciente para su adecuada replicación y expresión de sus factores de virulencia (Jurado *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2005).

Cuando *Salmonella* es ingerida en alimentos sobrevive al paso a través de la barrera del ácido gástrico invadiendo la mucosa del intestino delgado y grueso produciendo toxinas, la



invasión de células epiteliales estimula la liberación de citocinas proinflamatorias que inducen una reacción inflamatoria, si la respuesta es aguda causa diarrea y puede conducir a ulceración y destrucción de la mucosa (Figuroa *et al.*, 2005; Giannella, 1996).

La expresión de sus genes está modulada por cambios ambientales severos cuando entra al hospedero por vía oral como pH ácido, aumento de la temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad (Figuroa *et al.*, 2005).

El proceso infeccioso de la bacteria comprende los siguientes pasos: adhesión, invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa y daño al hospedero (Tabla 2).

### **1.5.1 Factores de Virulencia**

Se conocen varios factores de virulencia en *Salmonella*, uno de ellos es la producción de al menos tres toxinas: las enterotoxinas que son sustancias liberadas al intestino y que ocasionan síntomas gastrointestinales como cólicos y diarrea, las endotoxinas que hacen parte de la membrana externa de la bacteria y cuya actividad biológica está asociada con los LPS y por último las citotoxinas que están asociadas con la superficie celular, que inhiben la síntesis proteica en la célula hospedadora y pueden estar implicadas en la adherencia a las células epiteliales constituyendo esta última un segundo factor de virulencia propio del género (Pachón, 2009).



**Tabla 2. Mecanismos del proceso infeccioso**

MECANISMO	CARACTERÍSTICAS
<b>Adherencia</b>	<p>Las adhesinas de las bacterias tienen receptores para reconocer moléculas presentes en la célula del hospedero con estereoquímica específica, que determinará los hospederos y el organotropismo de las bacterias, siendo éstas las que activan a los linfocitos B y neutrófilos dando una variedad en proliferación celular y secreción de citosinas (Figuroa <i>et al.</i>, 2005; Parra <i>et al.</i>, 2002; Patiño, <i>et al.</i>, 2011)</p> <p>Luego de la entrada al hospedero, un patógeno bacteriano puede adherirse directamente a la superficie de la célula hospedera o a la matriz extracelular cuando el tejido de la matriz extracelular subyacente es expuesta, SEF17 media la adherencia a una gran variedad de matrices extracelulares y proteínas séricas incluyendo fibronectina, laminina y plasminogeno (Coburn <i>et al.</i>, 2006; Patiño <i>et al.</i>, 2011).</p> <p>La internalización de <i>Salmonella</i> es rápida en células fagocíticas y no fagocíticas (SVC) que vuelven a la normalidad según el efecto SptP (Figuroa <i>et al.</i>, 2005).</p>
<b>Invasión</b>	<p>La endocitosis es facilitada por la secreción tipo III de SSTIII encargada de modificar la célula huésped a través de la translocación de células huésped a través de proteínas de virulencia desde el citoplasma hasta la célula huésped (Patiño <i>et al.</i>, 2011; Parra <i>et al.</i>, 2002).</p> <p>SipA es una proteína de unión a actina que inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina promoviendo el movimiento ondulatorio difuso de la membrana desorganizándola.</p> <p><i>Salmonella</i> mediante la proteína efectora SipB (<i>Salmonella</i> invasion protein) inducida en macrófagos no activados, produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de células M y la invasión de enterocitos adyacentes tanto por la cara apical como la basolateral, induce la apoptosis de macrófagos activados que serán transportados al hígado y al bazo (Guiney &amp; Fierer, 2011). SipC forma parte de un complejo proteico el cual regula la polimerización y unión de la actina en el sitio de fijación (Figuroa <i>et al.</i>, 2005). SipD, regula el sistema de secreción tipo III SSTIII (Figuroa <i>et al.</i>, 2005). Tanto SipB, SipC y SipD son translocasas pertenecientes a la familia RTX (Toxina formadora de poro), responsables de formar poros en la membrana de células eucarióticas (Figuroa <i>et al.</i>, 2005).</p> <p><i>Salmonella</i> serovar Typhimurium puede llegar al hígado y al bazo por una ruta alterna que no requiere colonización intestinal o invasión de células epiteliales intestinales, en donde la bacteria es directamente llevada al lumen intestinal a circulación, bazo e hígado por fagocitos que expresan CD18 (Figuroa <i>et al.</i>, 2005). La supervivencia bacteriana dentro de los fagocitos es esencial para la virulencia (Zaidi <i>et al.</i>, 2006).</p>
<b>Patogenicidad</b>	<p>Es un fenómeno complejo que involucra diversos factores de virulencia (Parra <i>et al.</i>, 2002). <i>Salmonella</i> induce la migración de neutrófilos y macrófagos (PMN) así como la liberación de citosinas proinflamatorias (IL8, GM-CSF, IFN<math>\gamma</math>, TNF<math>\alpha</math>, GCP-2, GRO-<math>\alpha</math>, GRO-<math>\beta</math> y GRO-<math>\gamma</math>) que reclutan células fagocíticas y están involucradas en el proceso diarreico (Figuroa <i>et al.</i>, 2005).</p>
<b>Daño al hospedero</b>	<p>El incremento de la permeabilidad vascular generada durante la inflamación, va en combinación con la pérdida de la integridad epitelial de la mucosa intestinal provocando diarrea por la salida de líquidos y electrolitos al lumen intestinal (Figuroa <i>et al.</i>, 2005).</p>





### **a) Fimbrias**

Algunos mecanismos involucran varios tipos de fibras o pilis, que ayudan a la bacteria a conseguir contacto cerrado con las células hospederas y permiten la interacción de factores que estimulan la migración transepitelial de neutrófilos, de los cuales están descritos genéticamente una fimbria tipo uno (*fim*), fimbria codificada por plásmidos (*pef*), fimbria polar larga (*lpf*) y fimbria agregativa delgada (*agf*), la presencia de estos 4 sugiere que la adhesión a superficies celulares y no celulares sugieren que es un punto fundamental en la supervivencia de *Salmonella* en el medio ambiente (Sánchez *et al.*, 2003).

### **b) Islas de patogenicidad**

El ADN adquirido que contiene genes relacionados funcionalmente, se denomina Isla Genómica (IG). Las IG's que codifica para genes de virulencia, se denominan Islas de Patogenicidad (IPs) y su presencia en el genoma de las bacterias patógenas las distingue de las cepas no patógenas (Gal-Mor y Finlay, 2006). El conocimiento de la secuencia completa del genoma de *Salmonella enterica* ha permitido la identificación y caracterización de muchos genes implicados en la patogénesis adquiridos a través de transferencia horizontal de genes, por lo cual ha adquirido (IPs) que ayudan a la bacteria a invadir, replicarse y espaciarse dentro del ambiente restringido del hospedero. Existen muchos genes de virulencia con un papel importante en la patogénesis. La invasión como la supervivencia intracelular están mediadas por al menos 60 genes cromosómicos de virulencia, codificados en varias islas de patogenicidad (Lahiri *et al.*, 2010).

Hasta la fecha se han descrito en *Salmonella* 5 islas de patogenicidad, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5, debido a una regulación coordinada y precisa de los genes presentes en ellas, logra adaptarse a cambios ambientales que se le presentan durante el proceso infeccioso (Fig. 2).



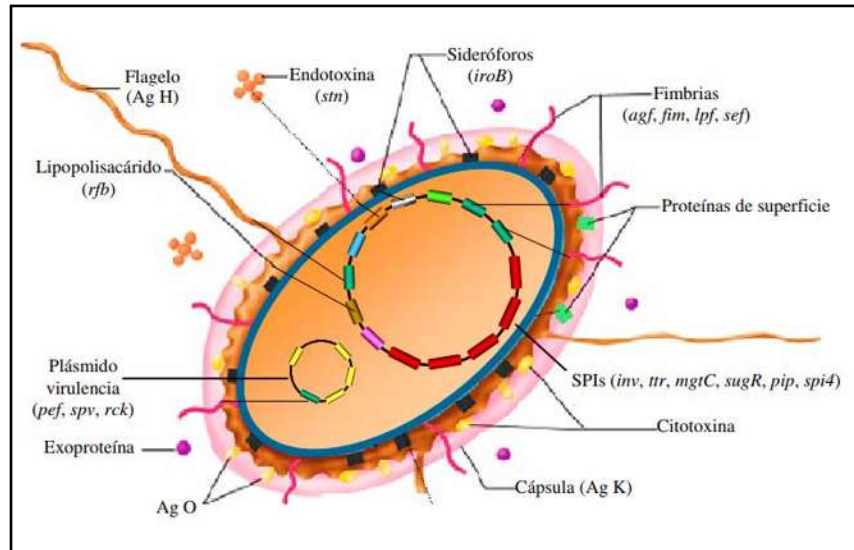
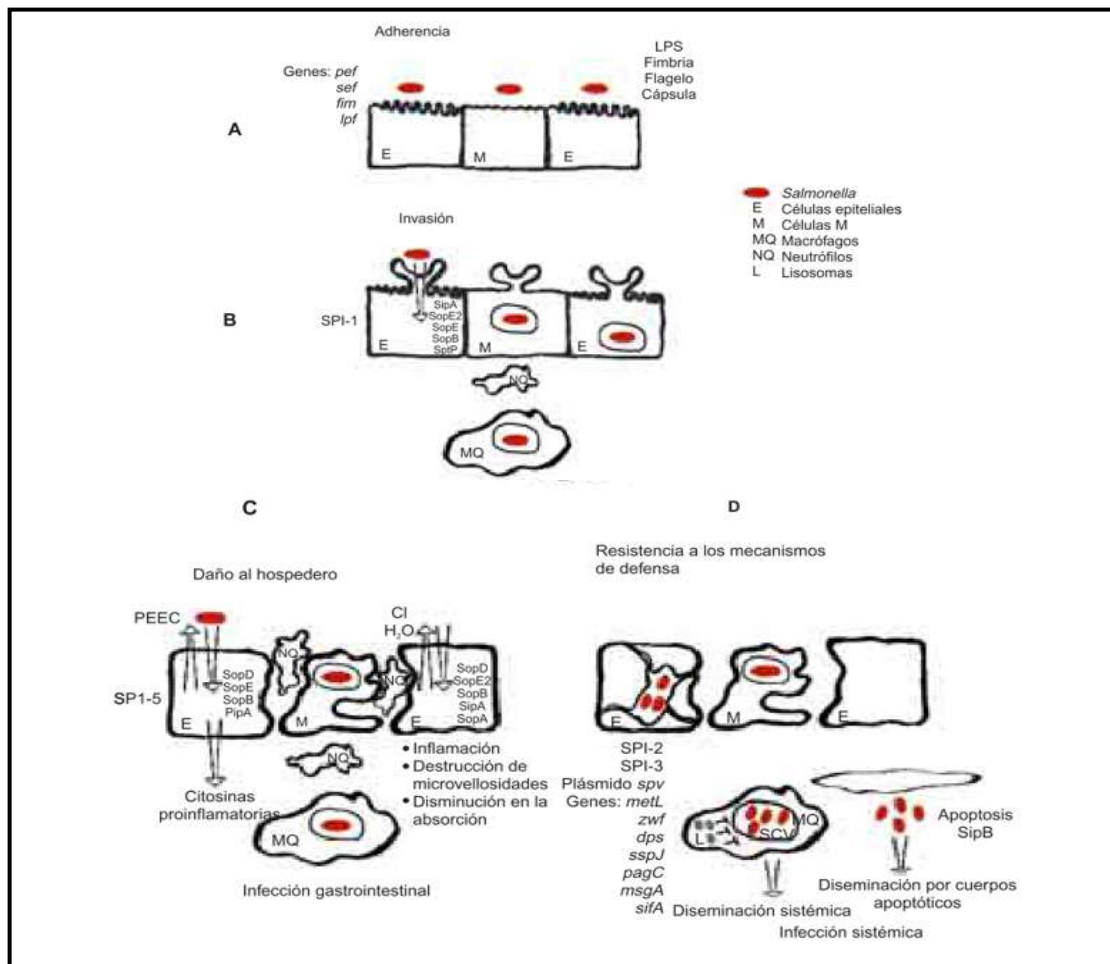


Figura 2. Factores y genes de Virulencia de *Salmonella enterica* (Madigan *et al.*, 1998b, modificado).

La isla SPI-1 contiene diferentes genes involucrados en la invasión, apoptosis de macrófagos y activación de cascadas de fosforilación dependientes de MAP cinasas. Contiene genes *inv-spa* responsables de la internalización de las células que junto con otros genes de la misma isla codifican el T3SS, además contiene varias proteínas efectoras las cuales se involucran en los rearrreglos del citoesqueleto e inducen la captación bacteriana mediante la activación de cascadas de señalización intracelular y maquinaria esquelética: *SipA*, *SopE*, *SopE2*, *SopB*. Posee además genes involucrados en la regulación de genes de virulencia (*hila*, *invF*, *Sira*, y *phoPQ*) algunos de ellos controlan la expresión de los genes localizados en otra parte del cromosoma de la bacteria. Dichos genes parecen ser importantes únicamente en los primeros estadios de la infección en donde las bacterias invaden las células de la mucosa (Figuroa Ochoa & Verdugo Rodríguez, 2005; Pachón, 2009).





**Figura 3. Procesos implicados en la patogénesis de *Salmonella* (Figuroa Ochoa & Verdugo Rodríguez, 2005).**

La SPI-2 codifica también para un T3SS que se activa cuando la bacteria se encuentra intracelularmente dentro de una vacuola pareciendo no intervenir significativamente en la infección sistémica, únicamente se ha detectado en serovar Typhimurium (Bugarel *et al.*, 2011).

La SPI-3 es requerida para la supervivencia intracelular en macrófagos, provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg<sup>2+</sup> Typhimurium (Bugarel *et al.*, 2011).

La SPI-4 codifica para un supuesto sistema de secreción tipo I (SSTI) que media la secreción de toxinas y se cree que participa en la adaptación de *Salmonella* al ambiente intracelular en los macrófagos (Bugarel *et al.*, 2011).



La SPI-5 codifica para proteínas efectoras involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal como *SopB* la cual estimula la secreción de cloro y se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos (Bugarel *et al.*, 2011).

La patogénesis de *S. Typhimurium* depende de un gran número de proteínas de virulencia. Algunas de éstas son llamadas efectores, los cuales se introducen en la célula huésped por dos máquinas de translocación de proteínas especializadas, el sistema de secreción tipo 3 (T3SS). El T3SS codificado dentro de la isla de patogenicidad I de *Salmonella* (SPI-1) es producido por las bacterias extracelulares y entrega efectores a través de la membrana plasmática de la célula huésped; estos son necesarios para la internalización bacteriana y las primeras etapas de formación de vacuolas que contienen *Salmonella* (SCV) (Mazurkiewicz *et al.*, 2008).

### c) Plásmidos

Son elementos de ADN extracromosómico que constituyen entre el 1% > 10% del genoma de muchas especies bacterianas. Se replican de manera autónoma y, aunque en la mayoría de las ocasiones no son esenciales para la viabilidad de la célula, contienen genes que confieren distintas propiedades como la resistencia a antibióticos, virulencia o actividades metabólicas (Domínguez *et al.*, 2005). Dependiendo de su tamaño pueden contener genes que codifican desde unas proteínas hasta cientos de ellas, raramente codifican productos esenciales para el crecimiento celular tales como ARN polimerasa o enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, sin embargo la expresión de sus genes dan ventajas selectivas como la resistencia a antibióticos o la producción de bacteriocina (activa contra otras especies bacterianas) todo bajo ciertas condiciones (Loeza *et al.*, 2004).

Los plásmidos se encuentran presentes en las bacterias con más de una copia, independientes del cromosoma. Contienen genes que confieren diversas propiedades genotípicas y son útiles para la adaptación al crecimiento en determinados ambientes, se han asociado con el potencial patógeno debido a que la expresión de algunos de sus genes permiten la adhesión a los tejidos de huésped o expresión de toxinas (Betancor *et al.*, 2005).



Los plásmidos se clasifican según sus características, algunas de ellas con importancia epidemiológica: tamaño, presencia en una o diferentes especies y géneros, número de copias por célula, capacidad de transferirse por conjugación.

Tradicionalmente el número de plásmidos por célula se ha utilizado como marcador fenotípico aunque hoy en día tienen escasa utilidad, se han usado para conocer la transmisibilidad de los genes que albergan, por ello su valor epidemiológico (Domínguez *et al.*, 2005). Además se han utilizado como herramientas biotecnológica debido a que se han modificado para funcionar como vectores de clonación y vectores de expresión (Loeza *et al.*, 2004).

Existen plásmidos con diferentes funciones tales como: los plásmidos conjugativos, plásmidos multifuncionales que tienen característica de transposón, función de conjugación y de identificación de promotores, también existen plásmidos de estabilidad que contienen elementos del cromosoma, algunos plásmidos pueden tener más de una función (Loeza *et al.*, 2004).

Los plásmidos están constituidos por una región constante la cual incluye determinantes genéticos para sus funciones esenciales (replicación, mantenimiento y transferencia) y una región variable de ADN heterólogo es útil para determinar la ecología y la epidemiología en respuesta a distintas presiones selectivas. (Domínguez *et al.*, 2005).

Los plásmidos también se clasifican de acuerdo a su función:

- ✚ Plásmidos de Fertilidad F-plásmidos: Estos contienen genes *tra* y son capaces de conjugarse y dan como resultado la expresión de pili sexual.
- ✚ Plásmidos de resistencia (R): Estos contienen genes que proporcionan resistencia contra antibióticos o venenos, conocidos como factores R, antes de que se entendiera la naturaleza de los plásmidos.
- ✚ Plásmidos Col: Estos contienen genes que codifican para bacteriocinas, proteínas que pueden matar a otras bacterias.
- ✚ Plásmidos degradativos: Son los que permiten la digestión de sustancias inusuales, por ejemplo, tolueno y ácido salicílico.



✚ Plásmidos de virulencia: Son los que convierten a la bacteria en un patógeno. (Smith & Sockett, 1999).

### 1.6 Plásmidos de virulencia

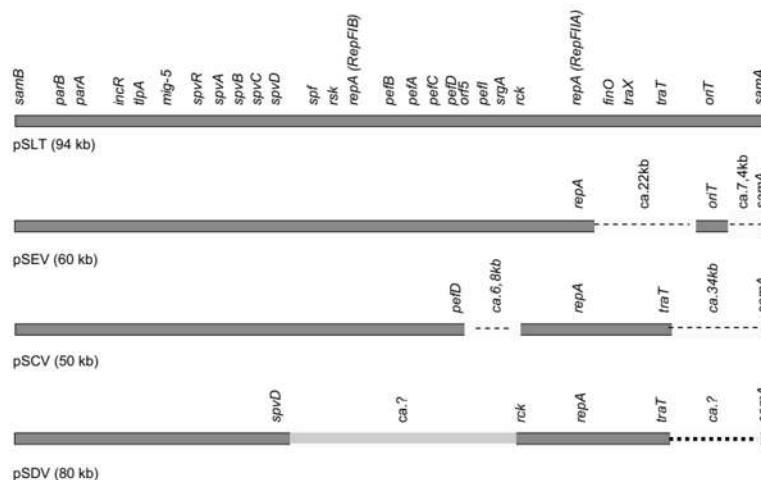
Los plásmidos de virulencia en *S. enterica* (pS-V) se encontraron por primera vez en el serotipo Typhimurium en el año de 1982, después se encontraron en un número limitado de otros serotipos pertenecientes a la misma subespecie y se ha indicado que en la mayoría de los casos la adquisición de material genético debido a estos elementos móviles existe mayor resistencia a antimicrobianos, siendo los transposones y los casetes génicos localizados en integrones los que intervienen en la formación y evolución de los plásmidos (Patiño *et al.*, 2011).

La diversidad genética de *S. enterica* también está relacionada con la adquisición de plásmidos que le confieren una ventaja selectiva, vía resistencia antimicrobiana y/o expresión de virulencia (Bugarel, *et al.*, 2011). Están asociados además a la supervivencia y multiplicación de *Salmonella* en el sistema retículo endotelial (Patiño *et al.*, 2011).

Algunos serotipos presentan plásmidos de virulencia que son importantes para la producción de infección sistémica, debido a su capacidad autotransferible o movilizable, actualmente se conocen 8 serotipos que presentan el plásmido de virulencia de *Salmonella* (SPV): *S. Paratyphi C*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Abortusovis* (Courvalin, 2009; Patiño *et al.*, 2011).

El pS-V tiene una región altamente conservada de 7.8 kb, la cual es un operón compuesto por cinco genes denominado región *spvRABCD*, algunos de estos plásmidos son frecuentes en infecciones humanas tales como: pSENV en Enteritidis con un tamaño de 60kb, pSCV con un tamaño de 50kb para Choleraesuis, pSDV para Dublin con un tamaño de 80kb y por último los plásmidos pSLT y pSTV del serotipo Typhimurium con un tamaño de 90kb (Fig.4) (Patiño *et al.*, 2011).





**Figura 4. Representación esquemática de los mapas genéticos de 4 plásmidos V de *Salmonella*.** Los plásmidos pSLT/pSTV, pSEV, pSCV y pSDV (específicos de serotipos Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis y Dublin, respectivamente) se presentan alineados respecto a pSLT. Delección determinada: —; delección no determinada: ---; región heteróloga (Patiño *et.al.* 2011).

En relación al origen evolutivo de los plásmidos, se piensa que tuvo lugar la integración del factor de transferencia F el cual se escindiría del cromosoma arrastrando al locus *spv* generando los ancestros de plásmidos de virulencia V, presentes en *Salmonella* para los plásmidos pSTV, pSEV y pSCV o la presencia de un plásmido relacionado en el caso de pSDV (el cual pertenece a un linaje diferente), en el cromosoma de *Salmonella* próximo al operón *spv* (Patiño *et al.*, 2011).

Los plásmidos pSLT son característicos del Serotipo Typhimurium, se encuentran en todas las cepas patógenas de *Salmonella* debido a que están relacionados con la adherencia, pues ciertas proteínas que se encuentran en las fimbrias están codificadas por el gen *pef* encontradas en el plásmido (Parra *et al.*, 2002). Bajo condiciones determinadas el plásmido pSLT es autotransferible debido a que posee el origen de transferencia del factor F (*oriT*) y una región *tra* compleja, sin embargo se ha observado que los plásmidos pSEV, pSDV, pSCV perdieron esta capacidad por las supresiones que presentaron en la región *tra* (Patiño *et al.*, 2011).



Los plásmidos de virulencia pueden contener otros genes asociados a virulencia dependiendo del serotipo tales como el operón *pefBACDI*, que en ratones se le ha implicado en la síntesis de un tipo de fimbrias que intervienen en la adherencia de la bacteria a las células epiteliales del intestino delgado, o bien genes de resistencia a la acción bacteriolítica del suero tales como *rsk* y *rck*. También se ha observado que está presente el locus *spf* implicado en la supresión de la activación de la respuesta inmune del hospedador en tres plásmidos V (pSTV, pSEV, pSCV), específicamente en el caso de pSTV se ha asociado a la producción de IL-12p40 por macrófagos en ratones (Fig. 4) (Patiño *et al.*, 2011).

### **1.7 Gen *spvC***

El gen *spvC* se encuentra en el plásmido PSLT asociado a virulencia, dicha región es promotora del crecimiento de la bacteria y está asociada a la supervivencia de la bacteria dentro del hospedero (Huehn *et al.*, 2010). Este gen es un efector del T3SS (Mazurkiewicz *et al.*, 2008).

Los *loci* localizados en plásmidos de virulencia de este patógeno juegan un papel importante tanto en resistencia antimicrobiana, como en la expresión del fenotipo de virulencia. Se ha reportado la presencia de dicho plásmido en cepas del serotipo Typhimurium y se ha asociado con la supervivencia intracelular de *S. enterica* y con la infección sistémica (Bugarel *et al.*, 2011) Tiene una actividad de fosfotreonina linasa y se ha demostrado que inhibe la señalización de MAP quinasa (Guiney & Fierer, 2011). Este gen actúa en conjunto con *spvB* para aumentar la virulencia, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual actúan (Guiney & Fierer, 2011).

## **1.8 Métodos de tipificación de *Salmonella*.**

### **1.8.1 Serotipificación**

La serotipificación se utiliza como marcador epidemiológico de elección para la tipificación de cepas del género *Salmonella* (*S. enterica* y *S. bongori*). El conocimiento de los serotipos circulantes en un país permite saber cuáles son los reservorios o alimentos que





sirven de vehículo en las toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella*, la implicación de cada serotipo en la gravedad de la infección, la distribución de las resistencias, la evolución de cada uno de ellos, la detección de brotes y la cuantificación de infecciones esporádicas (Echeita *et al.*, 2005).

Actualmente se utiliza como método de serotipificación el esquema de Kaufmann-White, publicado por el “Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de Paris, que consiste en la caracterización generalmente por aglutinación con antisueros específicos en portaobjetos de los antígenos O somático el cual es un carbohidrato y componentes más externos del lipopolisacárido de los cuales se reconocen 46 y de los 119 antígenos flagelares H que son proteicos y rara vez del antígeno capsular Vi, los cuales han permitido la caracterización de 2.541 serovares. La variación del antígeno O de *Salmonella* spp. es consecuencia de la diversidad genética dentro del grupo de genes *rbf*, los cuales codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis y ensamblaje de este antígeno el cual contiene como característica principal la proteína flipasa utilizada para la translocación de la unidad O fuera de la membrana WZX, que es codificada por el gen *wzx* (Echeita *et al.*, 2005; Lavalett *et al.*, 2009).

*Salmonella* es la única de las bacterias entéricas, que puede expresar dos antígenos diferentes de flagelina, muchos serotipos expresan estos dos tipos de antígenos flagelares denominados tradicionalmente antígenos de fase 1 y de fase 2 esas cepas son llamadas difásicas por ejemplo los serovares Typhimurium y Newport mientras unos pocos serotipos poseen un solo antígeno flagelar esas cepas son llamadas monofásicas tal es el caso del serotipo Enteritidis o el serotipo Typhi, cada cepa de *Salmonella* expresa alternativamente estos dos tipos de antígenos mediante un mecanismo denominado “Cambio de fase”(Echeita *et al.*, 2005; Lopardo, 2016).

Aunque la serotipificación de Kaufmann-White tiene un buen poder discriminatorio presenta algunas limitaciones como la necesidad de más de 250 tipos de antisueros que son costosos, con disponibilidad limitada y calidad variable para los antígenos menos comunes. Por otra parte la generación de resultados toma de 3 a 5 días y aproximadamente del 5% al 8% de los aislamientos son parcialmente tipificados debido a que existen cepas rugosas que



no expresan antígenos en la superficie, encapsuladas y otras que no expresan los antígenos flagelares de la fase 1 y 2 además se presentan también dificultad en la interpretación de resultados (Lavalett *et al.*, 2009).

### **1.8.2 Perfil plasmídico**

Se define como perfil plasmídico al contenido total de plásmidos presentes en un microorganismo representado por un patrón de bandas en el cual cada band representa un plásmido el cual varía dependiendo de la cantidad y el tamaño de los plásmidos presentes en el microorganismo en cuestión (Suárez, 2015).

El perfil plasmídico es el primer marcador genotípico de tipificación para un brote epidémico por la mediana complejidad y una misma metodología puede ser aplicada a distintos géneros y especies bacterianas, posee un alto poder de discriminación al combinarse con otros métodos de tipificación y una misma metodología, se utilizan algunas veces enzimas de restricción cuando alguna cepas presentan un único plásmido o cuando existan perfiles plasmídicos similares (Merino *et al.*, n.d.).

### **1.9 Estudios genético moleculares de *Salmonella* realizados en Michoacán**

En Michoacán son escasos los estudios genético moleculares de *S. enterica* entre ellos está el trabajo realizado por Inocencio-Velázquez (2013) con cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos provenientes de Michoacán, quien encontró que los serotipos Typhimurium, Agona, y Anatum eran los más frecuentes con 23 Secuencias tipo diferentes. No se observó algún patrón de distribución con base en los serotipos más frecuentes, a los cuales se les ha detectado mayor adquisición de genes asociados a virulencia en otras partes del mundo. Estudios de virulotipificación realizados por Maldonado-Ruiz (2015) permitieron establecer un esquema para la asignación de perfiles de virulencia (PV) con base a la detección de 6 genes de virulencia localizados en 5 islas de patogenicidad. Dichos perfiles permitieron hacer predicciones del potencial patogénico de las cepas sugiriendo que el PV1 (con mayor número de genes de virulencia) se presentó en 87.77% de las cepas. También se encontró que no había correlación entre la ST y el PV de las cepas de estudio,



pero sí entre el serotipo y el PV. Adicionalmente Hernández-Villaseñor (2015), realiza estudios con la misma colección de cepas y reporta que existe una gran variación de combinaciones de genes de resistencia a antibióticos (*sul*, *tet* e integrones de clase 2) y que existía relación entre la presencia de genes de resistencia y el fenotipo de resistencia/sensibilidad encontrando ciertas excepciones en los genes *sul* y su fenotipo STX sensible.

Los estudios realizados con cepas de *Salmonella enterica* en el estado de Michoacán, muestran que la mayoría de las cepas corresponden a los serotipos Typhimurium, Anatum y Agona. También muestra la posible relación con la resistencia, sensibilidad y multirresistencia de antimicrobianos con ciertos genes encontrados en la bacteria que también son responsables de virulencia.



## 2. JUSTIFICACIÓN

En México las enfermedades gastrointestinales infecciosas representan uno de los riesgos sanitarios más frecuentes en la población, siendo la segunda causa de morbilidad a nivel nacional. En los seres humanos, la salmonelosis es la principal enfermedad infecciosa transmitida por alimentos (ETA). Aunque los casos de salmonelosis son leves, algunas veces la enfermedad puede ser mortal en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos. Los estudios realizados por la Red Nacional de Laboratorios en México, la Secretaría de Salud, Cofepris, SENASICA y SAGARPA, realizan la identificación así como la incidencia de este patógeno (Cofepris, 2012).

En el Estado de Michoacán el principal método de tipificación de *Salmonella* es la serotipificación de Kauffmann-White, acompañada del conocimiento del reservorio. Aunque este método tiene un buen poder discriminatorio, tiene ciertas limitaciones como lo son el uso de gran cantidad de antisueros muy costosos de disponibilidad limitada y calidad variable, además de que muchas especies no pueden ser tipificadas por este método debido a que no expresan antígenos en la superficie. El laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la UMSNH, cuenta una colección de cepas de *S. enterica* que han sido tipificadas mediante serotipificación, amplificación de elementos repetitivos, Multilocus sequence typing y Virulotipificación (Regalado-Pineda, 2011; Vázquez-Nárvaez, 2012; Inocencio-Velázquez, 2013; Maldonado-Ruíz, 2015). La determinación del perfil plasmídico planteado en el presente estudio, es un método que permitirá ampliar la información genética entre las cepas de diferentes serotipos y su relación con la distribución geográfica y el alimento de origen. Por otro lado la detección del gen *spvC* permitirá inferir la virulencia de las cepas analizadas (García *et al.*, 2014; Wiesner *et al.*, 2009). La información obtenida podría ayudar a optimizar la vigilancia epidemiológica en el estado y establecer estrategias de prevención, mejorar la inocuidad alimentaria y el control de las enfermedades causadas al ingerir alimentos contaminados por *S. enterica* en el Estado de Michoacán.



### 3. HIPOTESIS

La presencia de plásmidos se relaciona con la multirresistencia, y el perfil plasmídico de cepas *Salmonella enterica* aisladas de alimentos del estado de Michoacán, se relaciona de manera positiva con la presencia gen de virulencia *spvC*, el alimento de origen y el serotipo.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

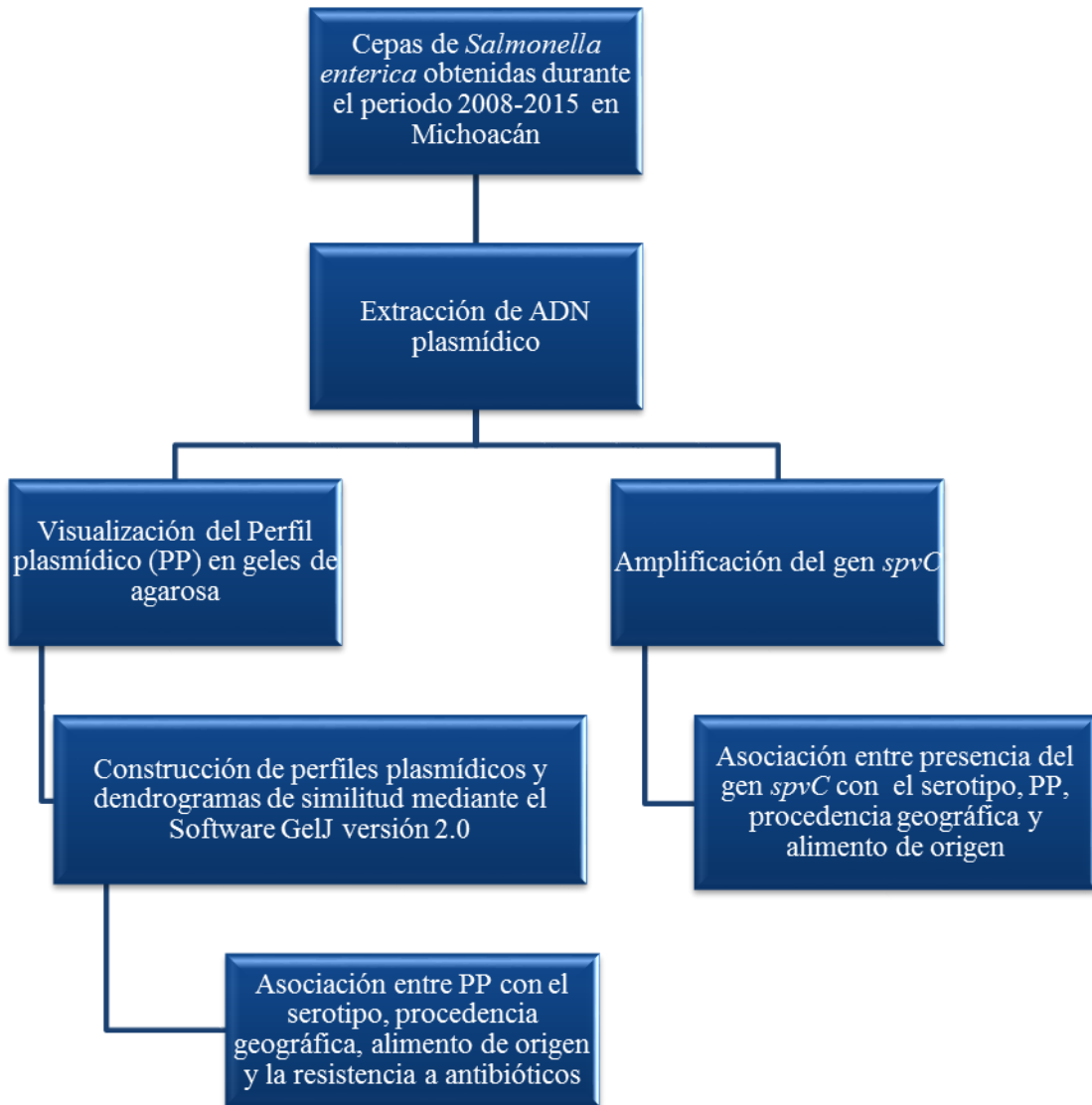
Realizar un análisis epidemiológico molecular de cepas *Salmonella enterica* de diferentes serotipos aisladas en el Estado de Michoacán.

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar genóticamente con el perfil plasmídico, cepas de *Salmonella enterica* de diferentes serotipos del Estado de Michoacán.
- Determinar la relación entre el perfil plasmídico obtenido con el serotipo y el área geográfica de procedencia de las cepas de estudio y la resistencia a antibióticos
- Detectar la presencia del gen *spvC* en las cepas de estudio.
- Establecer la relación entre la presencia del gen *spvC* con el perfil plasmídico, el serotipo y el área geográfica de procedencia de las cepas de estudio.



## 5. ESTRATEGIA



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

Se utilizaron 264 cepas de *Salmonella enterica* proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán. Del total de cepas, 231 fueron aisladas durante el periodo 2008-2014, de productos cárnicos, derivados lácteos y productos marinos. Las 33 cepas restantes fueron aisladas de heces humanas en el 2015 (Tabla 3).

**Tabla 3. Cepas estudiadas.**

AISLADO	SEROTIPO	MUESTRA	MUNICIPIO	AÑO
001	Derby	Carne de res	Tlazazalca	2009
002	Anatum	Chorizo	Morelia	2009
003	Give	Carne de res molida	Lázaro Cárdenas	2009
004	Typhimurium	Queso fresco	Ciudad Hidalgo	2009
005	Anatum	Queso fresco	La Piedad	2009
006	Give	Queso fresco	La Piedad	2009
007	Senftenberg	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2009
008	Panama	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009
009	Derby	Chorizo	Uruapan	2009
011	Montevideo	Queso cotija	Morelia	2009
012	Agona	Chorizo	Los Reyes	2009
014	Mbandaka	Queso ranchero	Morelia	2009
015	Anatum	Carne de bovino	Hidalgo	2009
016	Typhimurium	Carne de cerdo	Morelia	2009
017	Anatum	Carne de res	Morelia	2009
018	Anatum	Queso fresco	Hidalgo	2009
019	London	Carne de res	Pátzcuaro	2009
020	London	Chorizo	Pátzcuaro	2009
021	Typhimurium	Chorizo crudo	Lázaro Cárdenas	2009
022	Anatum	Chorizo crudo	Apatzingán	2009
023	Bovismorbificans	Queso panela	Morelia	2009
024	Typhimurium	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009
025	Anatum	Chorizo crudo	Uruapan	2008
026	Agona	Chorizo	Apatzingán	2009
027	Reading	Queso tipo americano	Zamora	2009
028	Typhimurium	Chorizo	Uruapan	2009



029	Anatum	Carne de puerco	Morelia	2009
031	Anatum	Chorizo crudo	Zitácuaro	2009
033	Vejle	Carne magra cerdo	Zamora	2009
034	Enteritidis	Guisado de pollo	Zamora	2009
035	Poona	Queso fresco	Zitácuaro	2009
037	Newport	Carne de res cruda	Morelia	2008
039	Typhimurium	Carne de res cruda	Apatzingán	2008
040	Agona	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2008
042	Meleagridis	Carne de res cruda	Apatzingán	2008
043	Anatum	Chorizo de cerdo crudo	Lázaro Cárdenas	2008
044	Anatum	Carne de res cruda	Uruapan	2008
045	Anatum	Carne de res cruda	Huetamo	2008
050	Senftenberg	Carne de res cruda	Huetamo	2008
051	Infantis	Chorizo crudo	Morelia	2008
052	Derby	Carne de res cruda	Zamora	2008
053	Anatum	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2008
054	Typhimurium	Carne de bovino	Tacámbaro	2009
055	Sinstorf	Carne de res	Morelia	2009
056	Anatum	Carne de res	Morelia	2009
057	Lockleaze	Chorizo	Morelia	2009
058	Mbandaka	Cóctel de ostión	Morelia	2009
059	Havana	Gancho	Uruapan	2009
060	Typhimurium	Carne de res cruda	Zamora	2008
061	Havana	Gancho	Uruapan	2009
062	Agona	Chorizo	Yurecuaro	2009
063	Newport	Carne de res	Yurecuaro	2009
064	Senftenberg	Carne de res cruda	Huetamo	2008
065	Agona	Carne de bisteck cruda	Múgica	2008
069	Typhimurium	Carne de res molida	Lázaro Cárdenas	2009
071	Havana	Carne de res cruda	Morelia	2009
073	Muenster	Longaniza	Morelia	2009
074	Derby	Carne de res cruda	Uruapan	2008
076	Sinstorf	Chorizo	Churumuco	2009
077	Saintpaul	Cabeza de res	Morelia	2009
078	Give	Carne de res	Morelia	2009
079	Sandiego	Longaniza	Jacona	2009
080	Panama	Carne de res molida	Lázaro Cárdenas	2009
081	Agona	Bisteck de res cruda	Lázaro Cárdenas	2008
082	Muenchen	Bisteck de res cruda	Lázaro Cárdenas	2008
084	Anatum	Chorizo	Uruapan	2008
085	Muenster	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2008
086	Agona	Chorizo crudo	Apatzingán	2008
087	Adelaide	Chorizo crudo	Uruapan	2008

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN





088	Muenchen	Carne molida cruda	Yurecuaro	2008
089	Typhimurium	Chorizo guisado	Yurécuaro	2008
090	Agona	Chorizo crudo	Apatzingán	2008
091	Agona	Carne de res cruda	Apatzingán	2008
092	Panama	Chorizo crudo	Lázaro Cárdenas	2008
093	Derby	Carne de res cruda	Nuevo Parangaricutiro	2008
095	Muenster	Carne de res molida	Lázaro Cárdenas	2008
096	Typhimurium	Carne de res cruda	Zamora	2008
101	Give	Queso ranchero	Morelia	2009
102	Oranienburg	Longaniza	Zamora	2009
104	Agona	Chorizo	Múgica	2009
106	Montevideo	Carne de res	Morelia	2009
108	Panama	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009
109	Typhimurium	Carne de res	Zamora	2009
110	Give	Queso	Morelia	2008
111	Vejle	Maciza de cerdo	Morelia	2009
112	Agona	Carne molida de res	Lázaro Cárdenas	2009
114	Newport	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009
115	Typhimurium	Queso asadero	Tanhuato	2009
116	Typhimurium	Queso panela	Tanhuato	2009
117	Weltevreden	Chorizo	Apatzingán	2009
118	Vejle	coctel de ostión	Morelia	2009
119	Vejle	Queso	Morelia	2009
120	Typhimurium	Chorizo	Sin dato	2009
121	Vejle	Longaniza cruda	Zamora	2009
122	Reading	Queso tipo oaxaca	Morelia	2009
123	Derby	Tacos de jamón	Morelia	2009
124	Adelaide	Carne de res cruda	Uruapan	2009
126	Adelaide	Carne de bovino	Morelia	2008
127	Typhimurium	Carne de res cruda	La piedad	2008
128	Give	Chorizo	Morelia	2009
129	Vejle	Chuleta de cerdo	Morelia	2009
130	Give	Longaniza	Huetamo	2008
131	Typhimurium	Chorizo crudo	Uruapan	2005
132	Agona	Chorizo de puerco	Morelia	2010
133	Anatum	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2010
134	Muenster	Queso adobera	Uruapan	2010
135	Muenster	Carne para deshebrar	Morelia	2010
136	Enteritidis	Carne de res	Apatzingán	2010
137	Albany	Carne de cerdo	Lázaro Cárdenas	2010
138	Muenchen	Queso fresco	Tuzantla	2010
139	Anatum	Queso fresco	Tuxpan	2010

PERFIL PLASMÁTICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



140	Havana	Longaniza	Morelia	2010
142	Bareilly	Agua	Lázaro Cárdenas	2010
143	Bareilly	Agua	Lázaro Cárdenas	2010
144	Typhimurium	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2010
145	Havana	Chorizo	Morelia	2010
146	Agona	Chorizo	Apatzingán	2010
147	Panama	Carne de res	Morelia	2010
148	Derby	Chorizo	Huetamo	2010
149	Agona	Carne de res	Huetamo	2010
150	Derby	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2010
151	Anatum	Pollo cocido	Lázaro Cárdenas	2010
152	Derby	Carne de res	José Sixto Verduzco	2010
154	Albany	Bistec de res	Lázaro Cárdenas	2010
155	Anatum	Carne de res	Zamora	2010
156	Agona	Carne de res	Angamacutiro	2010
158	Anatum	Carne de res	Uruapan	2010
159	Rissen	Chorizo	Uruapan	2010
161	Agona	Longaniza	Zamora	2010
162	Derby	Chorizo	José Sixto Verduzco	2010
163	Morganii	Chorizo	Morelia	2010
164	Infantis	Carne de res	Morelia	2010
165	Newport	Queso fresco	Apatzingán	2010
166	Derby	Chorizo	Apatzingán	2010
168	Poona	Queso fresco	Huetamo	2010
171	Derby	Chorizo	Uruapan	2010
172	Sinstorf	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2010
173	Derby	Chorizo	Uruapan	2010
174	Bovismorbificans	Carne de cerdo	Morelia	2010
175	Muenchen	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2010
177	Anatum	Carne de res	Morelia	2010
179	Adelaide	Tejido muscular	Morelia	2010
182	Worthington	Chorizo	Uruapan	2010
184	Derby	Carne de res	Uruapan	2011
185	Agona	Pollo crudo	Paracuaro	2011
186	Poona	Queso fresco	Paracuaro	2011
187	Give	Queso panela s/m	Zamora	2011
188	Anatum	Queso cotija s/m	Lázaro Cárdenas	2011
189	Enteritidis	Filete relleno de verdura	Lázaro Cárdenas	2011
190	No hay dato	Queso rallado cotija	Morelia	2011
192	Agona	Chorizo	Múgica	2011
194	Infantis	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2011

PERFIL PLASMÁTICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



195	Sinstorf	Pollo crudo	Anganguero	2011
196	Typhimurium	Chorizo	Pátzcuaro	2011
197	Panama	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2011
198	Panama	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2011
199	Panama	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2011
203	Anatum	Carne de res cruda	Morelia	2011
204	Braenderup	Queso fresco	Morelia	2011
205	Montevideo	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2011
206	Montevideo	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2011
207	Senftenberg	Queso cotija s/m	Lázaro Cárdenas	2011
208	Anatum	Carne de res cruda	Morelia	2011
209	Albany	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2011
210	Senftenberg	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2011
211	Sinstorf	Carne molida cruda	Lázaro Cárdenas	2011
212	Give	Carne molida cruda	Lázaro Cárdenas	2011
215	Sinstorf	Carne de res cruda	Ocampo	2011
216	No hay dato	Chorizo	Paracho	2011
217	Panama	Longaniza	Angamacutiro	2011
218	No hay dato	Ceviche	Churumuco	2011
219	Panama	Queso panela s/m	Zamora	2011
220	Panama	Jamón de pavo	Zamora	2011
221	Montevideo	Musculo de bovino	Gabriel Zamora	2011
222	Montevideo	Carne de res cruda	José Sixto Verduzco	2011
225	Bovismorbificans	Queso añejo	Morelia	2011
226	Azteca	Carne de res cruda	Pátzcuaro	2011
229	Anatum	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2011
230	No hay dato	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2011
231	Agona	Carne molida cruda	Lázaro Cárdenas	2011
232	Sinstorf	Espaldilla de cerdo	Morelia	2011
234	Anatum	Carne de res cruda	Morelia	2011
235	Oranienburg	Carne de res cruda	Lázaro Cárdenas	2011
237	Panama	Carne de res cruda	Churintzio	2011
241	Agona	Chorizo	Apatzingán	2013
242	Meleagridis	Chorizo	Zitácuaro	2013
244	Antígeno flagelar rugasi	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2013
245	Anatum	Chorizo	Uruapan	2013
246	Anatum	Carne de res	Uruapan	2013
247	Sinstorf	Chorizo	Apatzingán	2013
248	Javiana	Carne de res	Morelia	2013
249	Urbana	Queso fresco	Morelia	2013
250	Typhimurium	Carne de res	Apatzingán	2013

PERFIL PLASMÁTICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



251	London	Carne de res	Apatzingán	2013
253	Poona	Ostión en su concha	Lázaro Cárdenas	2013
254	Anatum	Carne de bovino	Morelia	2013
255	Anatum	Carne de res	Zitácuaro	2013
256	Oranienburg	Pescado de bagre	Morelia	2013
257	Weltevreden	Carne de res	Gabriel Zamora	2013
259	Give	Chorizo	Pátzcuaro	2013
260	Agona	Pollo	Uruapan	2013
261	Senftenberg	Pollo	Uruapan	2013
262	Muenchen	Carne de res	Uruapan	2013
263	Anatum	Carne de res	Uruapan	2013
265	Anatum	Chorizo	Uruapan	2013
266	Enteritidis	Pollo	Lázaro Cárdenas	2013
267	Kentucky	Pollo	Morelia	2013
268	Anatum	Longaniza	Morelia	2013
269	Give	Carne de res	Morelia	2013
270	Give	Carne de res	Morelia	2013
271	Typhimurium	Carne de res	Zamora	2013
273	Give	Carne de res	La piedad	2013
274	Montevideo	Queso fresco	La piedad	2013
275	London	Carne de res	Zitácuaro	2013
277	Senftenberg	Pollo	Apatzingán	2013
278	Saintpaul	Pollo	Apatzingán	2013
279	Bovismorbificans	Carne de res	Churumuco	2013
280	Montevideo	Chorizo	Churumuco	2013
281	Enteritidis	Pollo crudo	Cd. Hidalgo	2013
282	Typhimurium	Pollo crudo	Cd. Hidalgo	2013
284	Enteritidis	Pollo crudo	Morelia	2013
285	Saintpaul	Pollo crudo	Apatzingán	2013
286	Anatum	Pollo crudo	Morelia	2013
287	Enteritidis	Chorizo de pollo	Morelia	2013
288	Enteritidis	Carne de pollo	Pátzcuaro	2013
289	Typhimurium	Chocolate artesanal	Pátzcuaro	2013
291	Montevideo	Pollo crudo	Uruapan	2013
292	Montevideo	Pollo crudo	Uruapan	2013
293	Braenderup	Pescado Tilapia	Lázaro Cárdenas	2013
294	Albany	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
295	Albany	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
296	Oranienburg	Carne de bovino	Lázaro Cárdenas	2013
297	Agona	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
298	Typhimurium	Chorizo	Pátzcuaro	2013
299	Newport	Chorizo	Morelia	2013
300	Typhimurium	Carne de res	Jacona	2013

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



301	Typhimurium	Carne de res	Jacona	2013
302	Typhimurium	Carne de res	Jacona	2013
303	Typhimurium	Carne de bovino	Cd. Hidalgo	2013
304	Panama	Carne de bovino	Pátzcuaro	2013
305	Lockleaze	Carne de bovino	Morelia	2013
306	Adelaide	Chorizo	Uruapan	2013
307	Bredency	Pollo crudo	Zamora	2013
308	Bredency	Pollo crudo	Zamora	2013
309	Bredency	Pollo crudo	Zamora	2013
310	Derby	Carne de res	Zamora	2013
311	Newport	Cuatete crudo	Lázaro Cárdenas	2013
312	Albany	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
313	Albany	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
314	Albany	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
315	Saintpaul	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
316	Senftenberg	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
317	Albany	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
318	Oranienburg	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2013
319	Montevideo	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2013
320	Enteritidis	Chocolate de metate	Morelia	2013
321	Panama	Almeja	Morelia	2013
322	Javiana	Camarón chico c/cabeza	Morelia	2013
323	Herdelberg	Ala de pollo crudo	Morelia	2013
324	Panama	Pollo crudo	Apatzingán	2013
325	Kentucky	Pollo crudo	Zamora	2013
326	Muenchen	Costilla de cerdo crudo	Morelia	2013
329	Enteritidis	Pollo crudo	La piedad	2013
330	Herdelberg	Pollo crudo	La piedad	2013
331	Javiana	Carne molida	Lázaro Cárdenas	2013
332	No hay dato	Carne de bovino	Morelia	2013
333	No hay dato	Pollo crudo	Zitácuaro	2013
334	No hay dato	Carne de bovino	Zitácuaro	2013
336	Kiambu	Pollo crudo	Zacapu	2013
337	Infantis	Carne de bovino	Zacapu	2013
338	Senftenberg	Pollo crudo	Lázaro Cárdenas	2013
339	Anatum	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2013
340	Newport	Carne de res	Lázaro Cárdenas	2013
341	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
342	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
343	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
344	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
345	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
346	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015

PERFIL PLASMÁTICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



347	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
348	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
349	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
350	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
351	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
352	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
353	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
354	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
355	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
356	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
357	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
358	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
359	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
360	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
361	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
362	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
363	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
364	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
365	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
366	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
367	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
368	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
369	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
370	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
371	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
372	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015
373	No hay dato	Heces humanas	No hay dato	2015

El serotipo más utilizado en este estudio es del que no se encuentran datos con un 12.5% seguido por el serotipo Anatum con un 11.4% y Typhimurium con un 9.4% existen un amplia variedad de serotipos que fueron utilizados en un porcentaje de 0.3% (Fig.5).



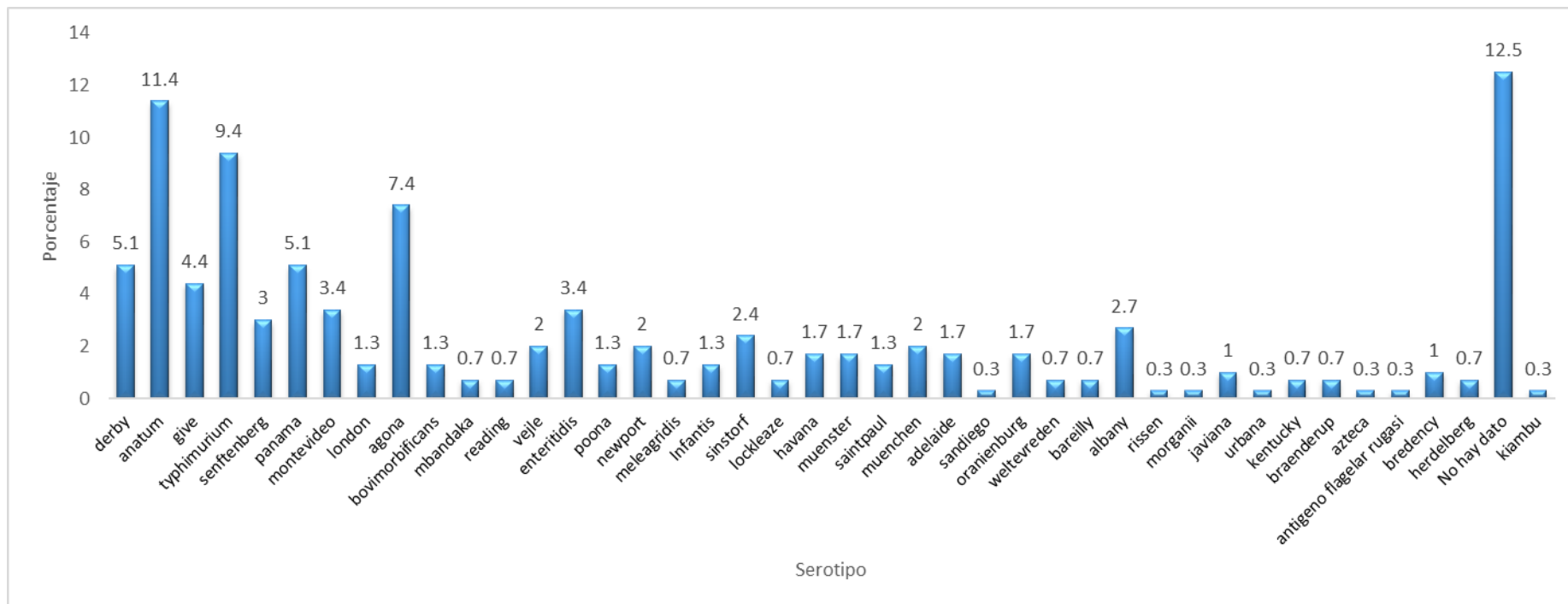


Figura 5. Serotipos de las cepas utilizadas en este estudio.





## 6.2 Extracción de ADN plasmídico.

La extracción de ADN extracromosómico se realizó mediante Lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979; Birnboim, 1983), como se describe a continuación. Las bacterias cultivadas el 3mL de medio LB, se recuperan mediante centrifugación a 12,000 rpm, fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de una solución de GTE (Glucosa 50mM, Tris 25mM, EDTA 10mM) para posteriormente ser lisadas con 300  $\mu$ L de una solución que contiene SDS 1% y NaOH 200mM, esta mezcla es neutralizada con 300  $\mu$ L de acetato de sodio removido con 300  $\mu$ L de solución de fenol-cloroformo (1:1) por centrifugación para posteriormente precipitar el ADN con 1 volumen de isopropanol frío, incubando 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  y centrifugando durante 15 min a 1200 x g. El sobrenadante se desecha y la pastilla se lava 2 veces con 250  $\mu$ L de etanol 70% dejándose secar a temperatura ambiente para finalmente ser resuspendida en 20  $\mu$ L de agua. Las muestras se trataron con 5 $\mu$ L RNAsa (Bio-Rad, USA) incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h (Frederick, 2003). La integridad del ADN y los patrones de bandeo se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Rusell, 2001), dicha prueba se realizó por un periodo de corrimiento de 2.3h para visualizar los plásmidos menores de 12,000 pb y de 6 h para plásmidos arriba de 12,000pb. El ADN aislado se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Las imágenes de los geles se obtuvieron empleando un fotodocumentador CHEMI-DOC Molecular viewer (Bio-Rad, USA).

## 6.3 Amplificación del gen de virulencia *spvC*

Para optimizar las condiciones de amplificación del gen *spvC*, se utilizó como referencia el ADN de las cepas de estudio 136, 189, y 266 pertenecientes al serotipo Enteritidis y la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Las reacciones de PCR contenían 1  $\mu$ M de cada uno de los iniciadores, SV7-F: ACT CCT TGC ACA ACC AAA TGC GGA y SV-R: TGT CTT CTG CAT TTC GCC ACC (Huehn *et al.*, 2009), 0.2mM de la mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, y dTTP (Invitrogen, USA), Tris-HCl 10 mM (pH 8.2), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.04 U/ de Taq polimerasa (Invitrogen, USA) y 50 ng de ADN en un volumen final de 15  $\mu$ L.





La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler utilizando el siguiente programa de amplificación. Una desnaturalización inicial de 95°C por 5 min seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 seg, 45°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, seguidos de una extensión final a 72°C por 4 min. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001) y las imágenes de los geles fueron capturadas con el sistema ChemiDOC (BioRad, USA).

#### **6.4 Construcción de los perfiles plasmídicos y dendrogramas de similitud**

Las imágenes de los geles con los plásmidos fueron analizadas con el Software GelJ versión 2.0 para detectar el peso de las bandas y construir con estos datos perfiles plasmídicos y dendrogramas mediante el algoritmo UPGMA. Se incluyeron en el mismo genotipo a las cepas con una similitud de al menos 60%. Se utilizaron los datos de los dendrogramas para determinar los perfiles plasmídicos.

#### **6.5 Asociación entre el perfil plasmídico, Serotipo, lugar de procedencia alimento y sensibilidad a antibióticos.**

Para la asociación entre el Perfil plasmídico y la presencia del gen de virulencia con el Serotipo, lugar de procedencia, alimento de origen y sensibilidad a antibióticos (Anexo I), se utilizó la prueba estadística de Chi-cuadrada de Pearson considerando como asociación positiva cuando el valor de  $p$  es igual o menor a 0.05 utilizando el programa estadístico SPSS versión 23.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Distribución geográfica de las cepas de acuerdo a su serotipo.

Se ubicaron las cepas analizadas por serotipo en el mapa de Michoacán (Fig. 6).

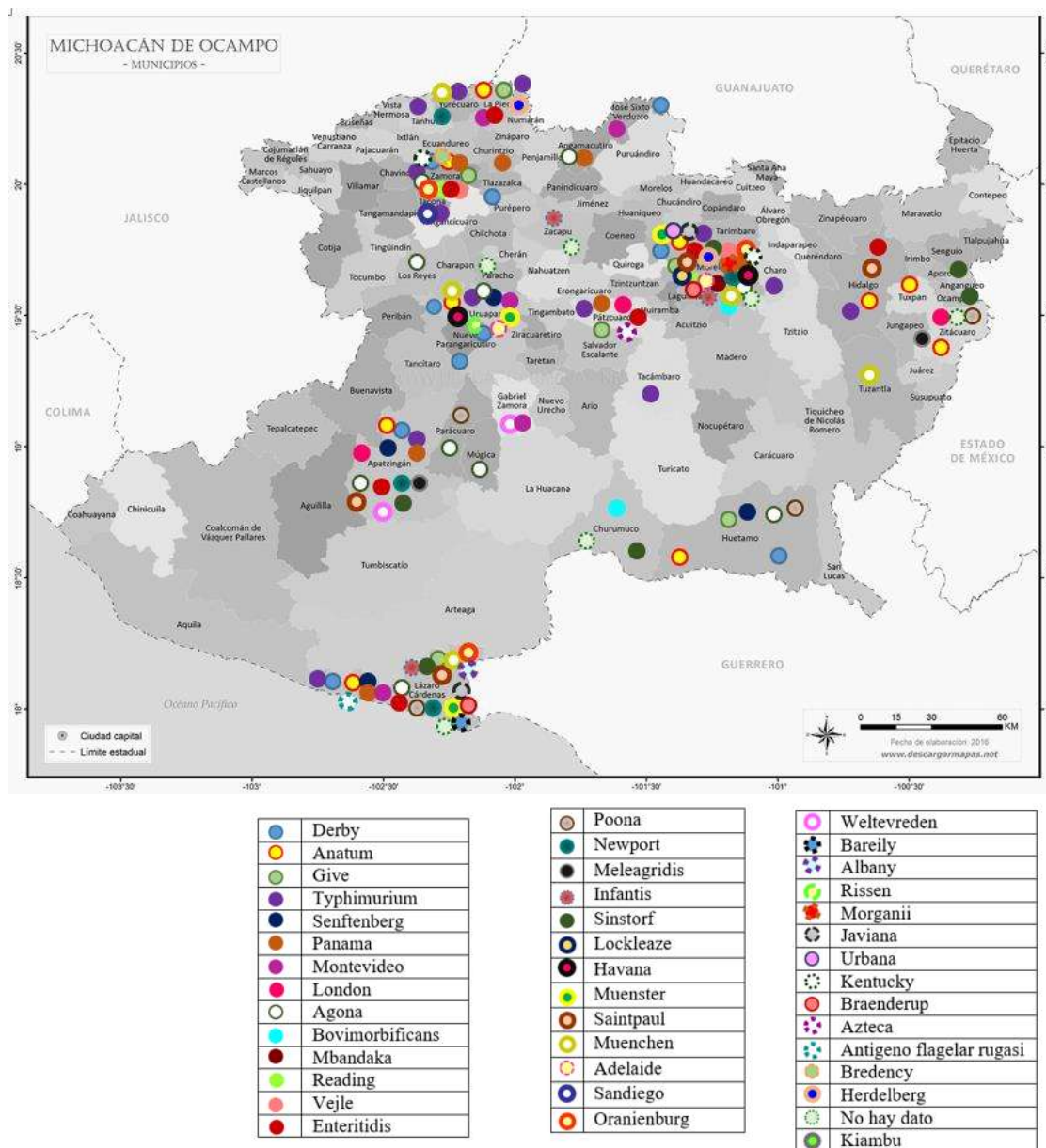
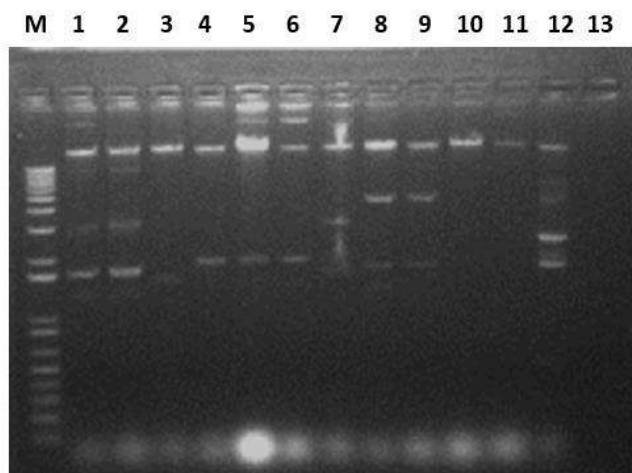


Figura 6. Lugar de procedencia de las cepas de *S. enterica* analizadas en este estudio.

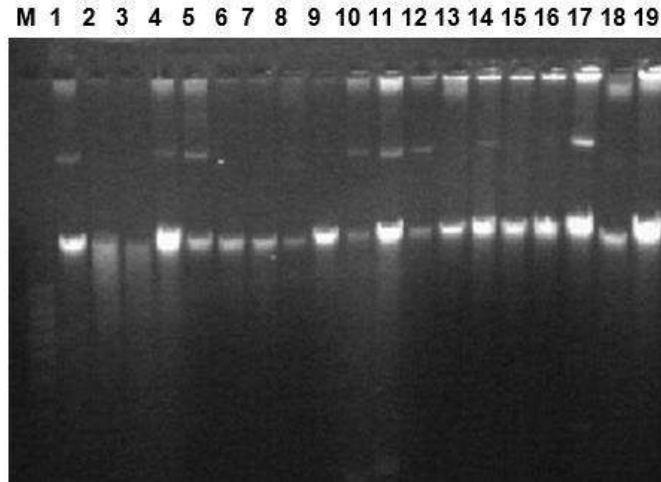
Las cepas analizadas provienen de 32 municipios, siendo Morelia el municipio que posee la mayor diversidad de serotipos, seguido por Lázaro Cárdenas, Apatzingán, Uruapan, Zamora y Huetamo respectivamente. Algunos de los municipios presentan dos serotipos (Gabriel Zamora y Zacapu) mientras que Tacámbaro, Tuzantla, Mujica, Tacámbaro, Tlazazalca entre otros, presentan únicamente 1 serotipo (Fig. 6). Además, los serotipos Anatum, Typhimurium y las cepas clínicas fueron los más frecuentes (Fig. 5). Mientras los serotipos Anatum y Typhimurium se presentaron en un mayor número de municipios (Fig. 6).

## 7.2 Plásmidos presentes en las cepas de estudio

Se extrajo el ADN extracromosomal de las cepas de estudio y se observaron plásmidos menores a 12,000pb (Fig. 7) y plásmidos mayores a 12,000pb llegando hasta 42,248pb (Fig. 8). Además se encontraron algunas cepas que presentaban plásmidos en ambos rangos de tamaño (Fig. 7).



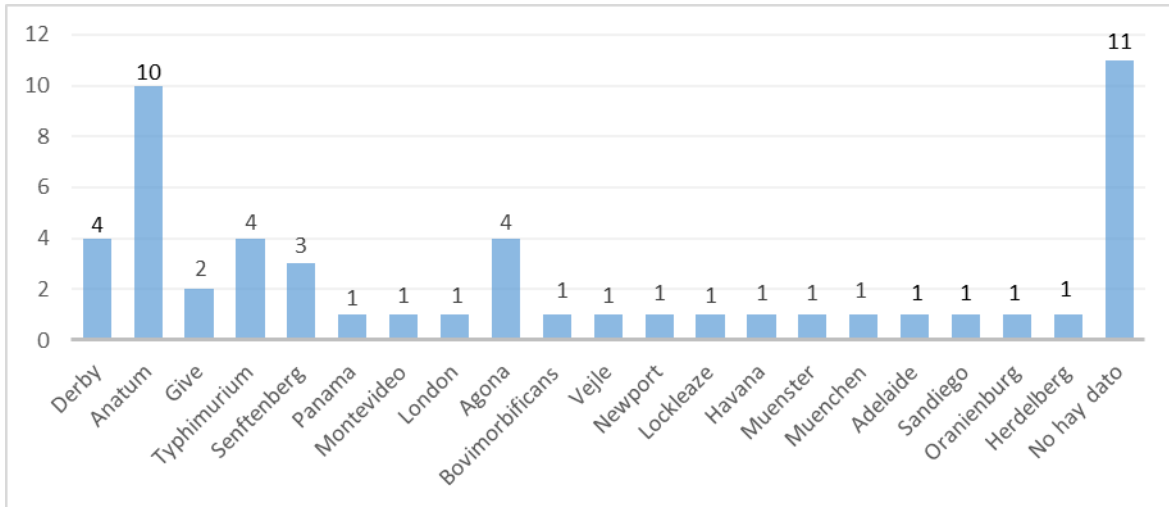
**Figura 7. Ejemplos de plásmidos encontrados en las cepas de *Salmonella enterica* analizadas en este estudio.** Gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA); 1-11, ADN extracromosómico obtenido de las cepas 44,52,53,55,56,57,60,63,64,65 y 69 respectivamente); 12 control positivo plasmidos de *E.coli*; 13 Control negativo.



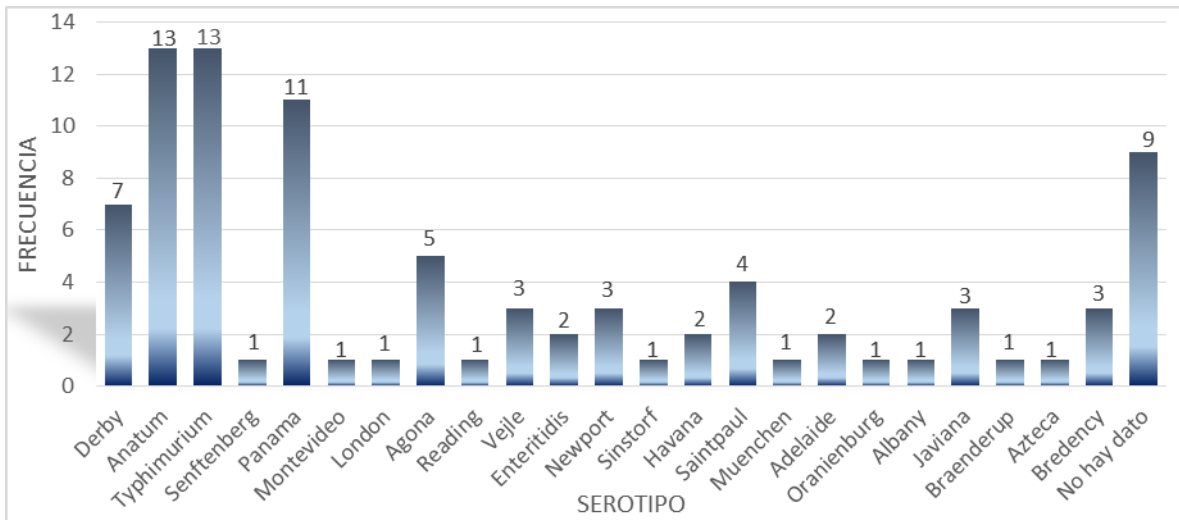
**Figura 8. Plásmidosde entre 12 pb-42,248pb en las cepas analizadas.** Gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA); 1-19 ADN extracromosómico obtenido de las cepas 039, 044, 045, 049, 050 , 051, 052 ,053 ,054 ,055 ,056 ,057 ,058 ,059 ,060 ,061 ,062 ,063 ,064 respectivamente.

De los 297 cepas analizadas 18% presentaron la mayor cantidad plásmidos se encuentra entre 576pb-54,180pb, mientras un 8% presentaron plásmidos entre 12,000pb-42,248pb y el 30% presentron plasmido entre 680pb-11,363pb, sin embargo un 44% de las cepas no presentaron plásmidos obteniéndose los siguientes porcentajes.

La mayoría de las cepas que presentaron plásmidos entre 576pb-54,180pb y plasmidos de 12,000pb-42,248pb corresponden a cepas no serotificables aisladas de heces humanas (Fig. 9 y Fig. 11). La mayor parte de plasmidos de 680pb-11,363pb corresponden a los serotipos Anatum y Typhimurium (Fig. 10).

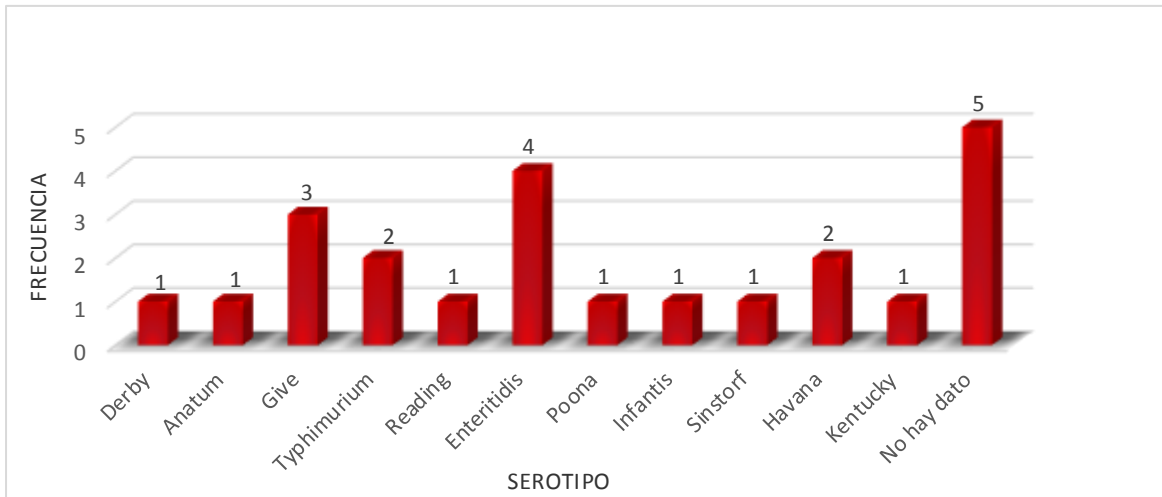


**Fig 9. Frecuencia de serotipos de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán utilizados en este estudio que presentaron plásmidos entre 576pb-54,180pb.**



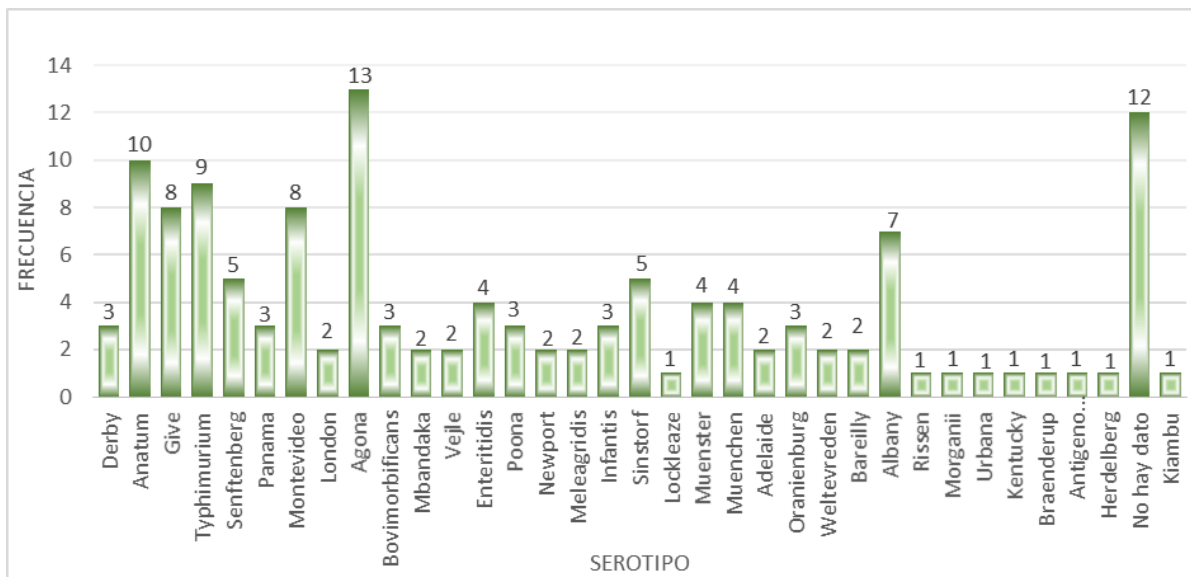
**Fig 10. Frecuencia de serotipos de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán que presentaron plásmidos entre 680pb-11,363pb.**





**Fig 11. Frecuencia de serotipos de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán utilizados en este estudio que presentaron plásmidos entre 12,000pb-42,248pb.**

La mayoría de las cepas que no presentaron plásmidos fueron del serotipo Agona (Fig. 12).



**Fig. 12 Frecuencia de serotipos de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán utilizados en este estudio sin plásmido.**



### 7.3 Distribución geográfica de serotipos que presentaron plásmidos.

Los municipios de Morelia, Lázaro Cárdenas y Zamora presentaron mayor cantidad de plásmidos, siendo la mayoría de los serotipos Anatum, Typhimurium y aislados de humanos. mientras que las cepas con menor cantidad de plásmidos provenían de los municipios de José Sixto de Verduzco, Tanhuato y Paracho. El serotipo Typhimurium se encuentra presente en una gran cantidad de municipios que presentan plásmidos (Fig.13).

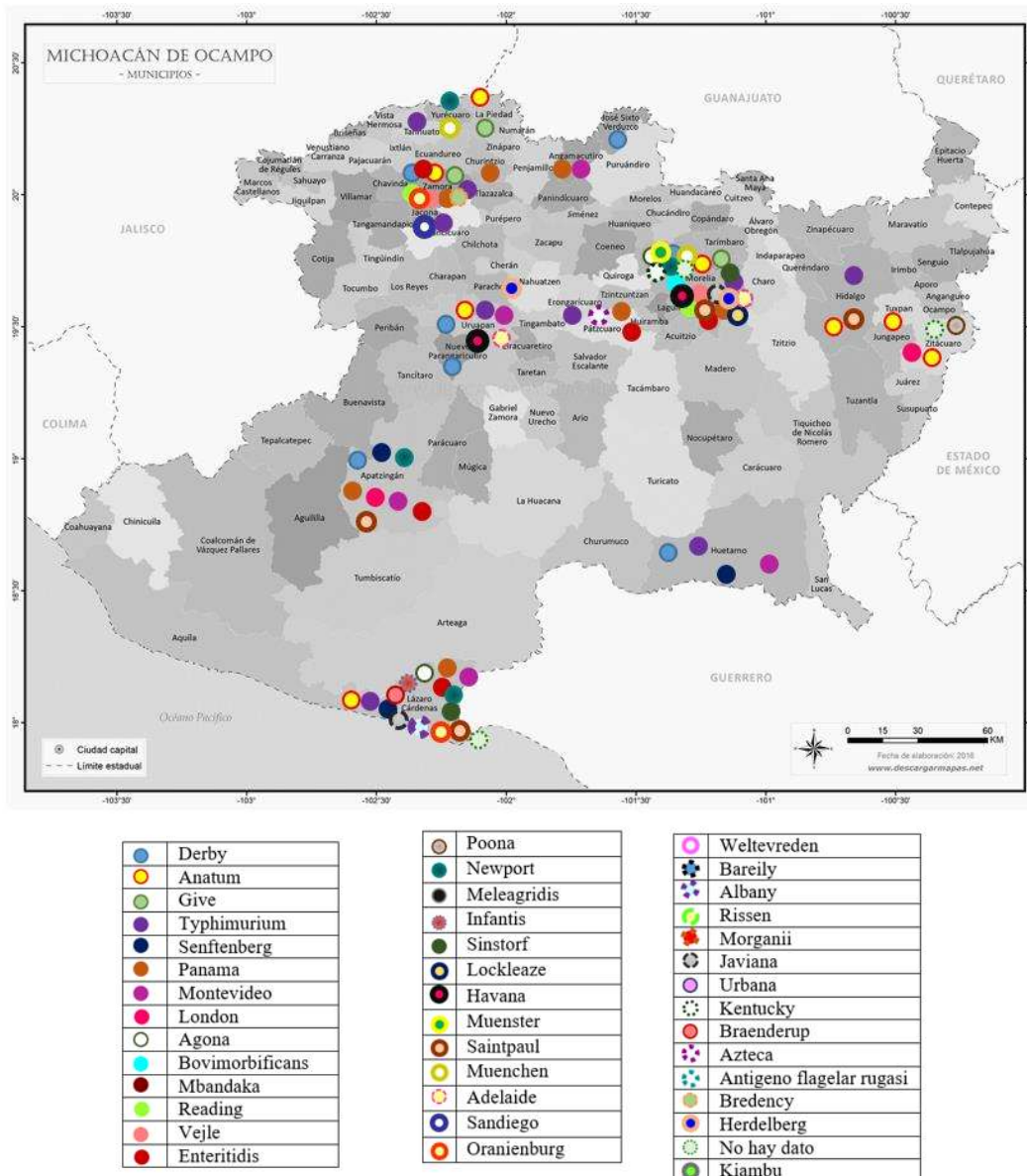


Fig 13. Distribución de plasmidos encontrados en el estudio y agrupados por serotipo en el Estado de Michoacán.





#### 7.4 Perfiles plasmídicos de las cepas de estudio.

Se encontraron 146 perfiles plasmídicos (PP) diferentes entre las 165 cepas de *Salmonella enterica* que presentaron plámidos.

**Tabla 4. Cepas de *S. enterica* que presentaron un solo plásmido**

PERFIL PLASMÍDICO (N° Cepa)	TAMAÑO DEL PLÁSMIDO (pb)	No. DE CEPAS	SEROTIPO	LUGAR DE ORIGEN	ALIMENTO / MUESTRA DE ORIGEN
PP1 (189)	44034.85	1	Enteritidis	Lázaro Cárdenas	Filete relleno de verdura
PP2 (078)	42247.86	1	Give	Morelia	Carne de res
PP3 (039, 061)	40533.94	2	Typhimurium Havana	Apatzingán Uruapan	Carne de res cruda Gancho
PP4 (035, 187)	38890.12	2	Poona Give	Zitácuaro Zamora	Queso fresco Queso panela s/m
PP5 (005, 034, 136, 266, 267)	35801.42	5	Anatum Enteritidis Enteritidis Enteritidis Kentucky	La Piedad Zamora Apatzingán Lázaro Cárdenas Morelia	Queso fresco Guisado de pollo Carne de res Pollo Pollo
PP6 (004)	34351.17	1	Typhimurium	Ciudad Hidalgo	Queso fresco
PP7 (027)	32960.24	1	Reading	Zamora	Queso tipo americano
PP8 (312)	31626.21	1	Albany	Lázaro Cárdenas	Pollo crudo
PP9 (140)	30346.75	1	Havana	Morelia	Longaniza
PP10 (009)	27942.75	1	Derby	Uruapan	Chorizo
PP11 (194)	26814	1	Infantis	Lázaro Cárdenas	Carne de res cruda
PP12 (360)	24693.21	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
PP13 (130, 367)	23697.45	2	Give No hay dato	Huetamo No hay dato	Longaniza Heces humanas
PP14 (371)	22742.45	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
PP15	17779.60	1	No hay dato	No hay	Heces humanas

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN





(353)				dato	
PP16 (260)	7312.89	1	Agona	Uruapan	Pollo
PP17 (284)	6756.68	1	Enteritidis	Morelia	Pollo crudo
PP18 (234)	6245.15	1	Anatum	Morelia	Carne de res cruda
PP19 (162)	5342.07	1	Derby	José Sixto Verduzco	Chorizo
PP20 (116)	4757.41	1	Typhimurium	Tanhuato	Queso panela
PP21 (293)	4083.84	1	Braenderup	Lázaro Cárdenas	Pescado Tilapia
PP22 (139)	3787.09	1	Anatum	Tuxpan	Queso fresco
PP23 (077)	3145.45	1	Saintpaul	Morelia	Cabeza de res
PP24 (350, 351)	2720.67	2	No hay dato No hay dato	No hay dato No hay dato No hay dato	Heces humanas Heces humanas
PP25 (165)	2445.70	1	Newport	Apatzingán	Queso fresco
PP26 (308, 309)	2128.97	2	Bredency Bredency	Zamora Zamora	Pollo crudo Pollo crudo
PP27 (111)	1488.18	1	Vejle	Morelia	Maciza de cerdo
PP28 (015, 055)	1443.29	2	Anatum Sinstorf	Ciudad Hidalgo Morelia	Carne de bovino Carne de res
PP29 (086)	1281.44	1	Agona	Apatzingán	Chorizo crudo
PP30 (052, 310, 148)	1176.70	3	Derby Derby Derby	Zamora Zamora Huetamo	Carne de res cruda Carne de res Chorizo
PP31 (333)	1113.85	1	No hay dato	Zitácuaro	Pollo crudo
PP32 (317)	931.17	1	Albany	Lázaro Cárdenas	Pollo crudo
PP33 (369)	909.19	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas



**Tabla 5. Cepas de *S. enterica* que presentaron dos plásmidos.**

PERFIL PLASMÍDICO	TAMAÑO DEL PLÁSMIDO (pb)	No. DE CEPAS	SEROTIPO	LUGAR DE ORIGEN	ALIMENTO / MUESTRA DE ORIGEN
PP34 (091)	47840.65 7917.68	1	Agona	Apatzingán	Carne de res cruda
PP35 (112)	47840.65 4944.19	1	Agona	Lázaro Cárdenas	Carne molida de res
PP36 (155)	47840.65 719.62	1	Anatum	Zamora	Carne de res
PP37 (361)	44034.86 24693.21	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
PP38 (050)	42247.86 7312.89	1	Senftenberg	Huetamo	Carne de res cruda
PP39 (323)	35801.42 931.17	1	Herdelberg	Morelia	Ala de pollo crudo
PP40 (017)	34351.17 1488.18	1	Anatum	Morelia	Carne de res
PP41 (028)	32960.24 3514.20	1	Typhimurium	Uruapan	Chorizo
PP42 (297)	31626.21 1002.94	1	Agona	Lázaro Cárdenas	Pollo crudo
PP43 (210)	31626.21 2445.70	1	Senftenberg	Lázaro Cárdenas	Chorizo
PP44 (056, 057)	29119.65 1444	2	Anatum Lockleaze	Morelia Morelia	Carne de res Chorizo
PP45 (334, 354)	24693.21 11362.92	2	No hay dato No hay dato	Zitácuaro No hay dato	Carne de bovino Heces humanas
PP46 (349)	19297.67 2820.28	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
PP47 (345)	19297.67 1245.05	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
PP48 (352)	17779.60 10481.52	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
PP49 (115)	15099.02 4578.29	1	Typhimurium	Tanhuato	Queso asadero
PP50 (122)	11362.92 8925.30	1	Reading	Morelia	Queso tipo oaxaca
PP51 (008)	11362.92 2203.24	1	Panama	Lázaro Cárdenas	Chorizo
PP52 (144)	9290.28 3145.45	1	Typhimurium	Lázaro Cárdenas	Chorizo

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



<b>PP53 (121)</b>	8925.30 3145.45	1	Vejle	Zamora	Longaniza cruda
<b>PP54 (059)</b>	8575.27 6495.56	1	Havana	Uruapan	Gancho
<b>PP55 (120)</b>	7917.68 2720.67	1	Typhimurium	No hay dato	Chorizo
<b>PP56 (230)</b>	7312.89 2128.97	1	No hay dato	Lázaro Cárdenas	Chorizo
<b>PP57 (331)</b>	6495.56 2625.14	1	Javiana	Lázaro Cárdenas	Carne molida
<b>PP58 (037)</b>	6005.00 795.04	1	Newport	Morelia	Carne de res cruda
<b>PP59 (064)</b>	5342.07 1443.29	1	Senftenberg	Huetamo	Carne de res cruda
<b>PP60 (063)</b>	5138.97 1400.25	1	Newport	Yurecuaro	Carne de res
<b>PP61 (129)</b>	4578.29 1358.97	1	Vejle	Morelia	Chuleta de cerdo
<b>PP62 (347)</b>	4578.29 733.46	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
<b>PP63 (166)</b>	4083.84 1535	1	Derby	Apatzingán	Chorizo
<b>PP64 (250)</b>	3514.20 1488.18	1	Typhimurium	Apatzingán	Carne de res
<b>PP65 (254)</b>	3263.26 1538.82	1	Anatum	Morelia	Carne de bovino
<b>PP66 (060)</b>	3263.26 1358.97	1	Typhimurium	Zamora	Carne de res cruda
<b>PP67 (265)</b>	3263.26 1319.39	1	Anatum	Uruapan	Chorizo
<b>PP68 (286)</b>	3263.26 1281.44	1	Anatum	Morelia	Pollo crudo
<b>PP69 (255)</b>	3145.45 1535	1	Anatum	Zitácuaro	Carne de res
<b>PP70 (246, 268)</b>	3032.49 1400	2	Anatum Anatum	Uruapan Morelia	Carne de res Longaniza
<b>PP71 (217)</b>	3032.49 1245.05	1	Panama	Angamacutiro	Longaniza
<b>PP72 (018, 245)</b>	2924.16 1443.29	2	Anatum Anatum	Ciudad Hidalgo Uruapan	Queso fresco Chorizo
<b>PP73 (216)</b>	2924.16 1245	1	No hay dato	Paracho	Chorizo
<b>PP74</b>	2924.16	1	Agona	Morelia	Chorizo de

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



(132)	1084.35				puerco
PP75 (071)	2820.28 1281.44	1	Havana	Morelia	Carne de res cruda
PP76 (126)	2720.67 1084.35	1	Adelaide	Morelia	Carne de bovino
PP77 (237)	2625.14 1281.44	1	Panama	Churintzio	Carne de res cruda
PP78 (031)	2625.14 1176.70	1	Anatum	Zitácuaro	Chorizo crudo
PP79 (368)	2280.70 1176.70	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
PP80 (278, 285)	1861.16 1026	2	Saintpaul Saintpaul	Apatzingán Apatzingán	Pollo Pollo
PP81 (315)	1535 909.19	1	Saintpaul	Lázaro Cárdenas	Pollo crudo
PP82 (226)	1488.18 1144.62	1	Azteca	Pátzcuaro	Carne de res cruda
PP83 (319)	1144.62 1084.35	1	Montevideo	Lázaro Cárdenas	Carne de res
PP84 (156)	888.11 681.41	1	Agona	Angamacutiro	Carne de res

**Tabla 6. Cepas de *S. enterica* que presentaron tres plásmidos.**

PERFIL PLASMÍDICO	TAMAÑO DEL PLÁSMIDO (pb)	No. DE CEPAS	SEROTIPO	LUGAR DE ORIGEN	ALIMENTO / MUESTRA DE ORIGEN
PP85 (101)	47840.65 5774.71 4578.29	1	Give	Morelia	Queso ranchero
PP86 (096)	45898.04 25731.46 7312.89	1	Typhimurium	Zamora	Carne de res cruda
PP87 (174)	44034.86 19297.67 706.34	1	Bovismorbificans	Morelia	Carne de cerdo
PP88 (149)	42247.86 1358.97 1176.70	1	Agona	Huetamo	Carne de res
PP89 (088)	40533.95 10913.00 3263.25	1	Muenchen	Yurecuaro	Carne molida cruda

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



<b>PP90 (291)</b>	37313.53 4083.84 576.19	1	Montevideo	Uruapan	Pollo crudo
<b>PP91 (029)</b>	34351.17 1443.29 778.66	1	Anatum	Morelia	Carne de puerco
<b>PP92 (275)</b>	32960.24 3032.49 1743.20	1	London	Zitácuaro	Carne de res
<b>PP93 (033)</b>	32960.24 2820.28 1319.39	1	Vejele	Zamora	Carne magra cerdo
<b>PP94 (025)</b>	29119.65 4757.41 1583.82	1	Anatum	Uruapan	Chorizo crudo
<b>PP95 (208)</b>	27942.75 5553.86 1687.83	1	Anatum	Morelia	Carne de res cruda
<b>PP96 (197)</b>	27942.75 4944.19 1634.73	1	Panama	Lázaro Cárdenas	Carne de res cruda
<b>PP97 (074)</b>	27942.75 3032.49 1281.44	1	Derby	Uruapan	Carne de res cruda
<b>PP98 (356)</b>	22742.44 1113.86 909.19	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
<b>PP99 (346)</b>	20105.64 16383.30 1281.44	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
<b>PP100 (184)</b>	20105.64 2445.70 1443.29	1	Derby	Uruapan	Carne de res
<b>PP101 (123)</b>	19297.67 3932.35 1245.05	1	Derby	Morelia	Tacos de jamón
<b>PP102 (124)</b>	18522.77 3787.09 1245.05	1	Adelaide	Uruapan	Carne de res cruda
<b>PP103 (340)</b>	18522.76 1488.18 1210.16	1	Newport	Lázaro Cárdenas	Carne de res
<b>PP104 (102)</b>	14496.05 8239.60 4241.80	1	Oranienburg	Zamora	Longaniza
<b>PP105 (087)</b>	9290.28 4083.84	1	Adelaide	Uruapan	Chorizo crudo

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



	3386.10				
<b>PP106 (263)</b>	7917.68 2820.28 1358.97	1	Anatum	Uruapan	Carne de res
<b>PP107 (300)</b>	7312.89 2533.54 1210.16	1	Typhimurium	Jacona	Carne de res
<b>PP108 (302)</b>	6495.56 3145.45 1443.29	1	Typhimurium	Jacona	Carne de res
<b>PP109 (318)</b>	6005.00 2361.47 1245.05	1	Oranienburg	Lázaro Cárdenas	Carne de res
<b>PP110 (301)</b>	5342.07 2720.67 1358.97	1	Typhimurium	Jacona	Carne de res
<b>PP111 (251)</b>	5138.97 1923.96 1281.44	1	London	Apatzingán	Carne de res
<b>PP112 (298)</b>	5138.96 1923.96 1176.70	1	Typhimurium	Pátzcuaro	Chorizo
<b>PP113 (304)</b>	4944.19 1800.94 1002.94	1	Panama	Pátzcuaro	Carne de bovino
<b>PP114 (326)</b>	4083.84 1800.94 1281.44	1	Muenchen	Morelia	Costilla de cerdo crudo
<b>PP115 (021)</b>	3145.45 1534.99 1084.35	1	Typhimurium	Lázaro Cárdenas	Chorizo crudo
<b>PP116 (372)</b>	2105.64 2445.70 1176.70	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas

**Tabla 7. Cepas de *S. enterica* que presentaron cuatro plásmidos.**

<b>PERFIL PLASMÍDICO</b>	<b>TAMAÑO DEL PLÁSMIDO (pb)</b>	<b>No. DE CEPAS</b>	<b>SEROTIPO</b>	<b>LUGAR DE ORIGEN</b>	<b>ALIMENTO / MUESTRA DE ORIGEN</b>
<b>PP117 (173)</b>	54179.63 9290.28 6005.00	1	Derby	Uruapan	Chorizo

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



	2820.28				
<b>PP118 (016)</b>	42247.86 31626.21 3145.45 1113.85	1	Typhimurium	Morelia	Carne de cerdo
<b>PP119 (079)</b>	38890.12 14496.05 4406.52 1535	1	Sandiego	Jacona	Longaniza
<b>PP120 (073)</b>	37313.53 3647.78 2128.97 747.90	1	Muenster	Morelia	Longaniza
<b>PP121 (043)</b>	30346.75 3145.45 1634.73 1319.39	1	Anatum	Lázaro Cárdenas	Chorizo de cerdo
<b>PPP122 (044)</b>	30346.75 2128.97 1319.39 909.19	1	Anatum	Uruapan	Carne de res cruda
<b>PP123 (355)</b>	21826.53 2361.47 1113.85 888.11	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
<b>PP124 (053)</b>	20948.11 2128.97 1358.97 931.17	1	Anatum	Lázaro Cárdenas	Carne de res cruda
<b>PP125 (348)</b>	18522.77 5774.71 1861.16 1210.16	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
<b>PP126 (277)</b>	13363.20 5342.07 4083.84 1989.45	1	Senftenberg	Apatzingán	Pollo
<b>PP127 (332)</b>	10481.52 4083.84 2445.70 1281.44	1	No hay dato	Morelia	Carne de bovino
<b>PP128 (196)</b>	7917.68 2445.70 1113.85	1	Typhimurium	Pátzcuaro	Chorizo

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



	795.04				
<b>PP129 (282)</b>	7028.97 2533.54 1319.39 1144.62	1	Typhimurium	Cd. Hidalgo	Pollo crudo
<b>PP130 (289)</b>	6756.68 4578.29 2445.70 1210.16	1	Typhimurium	Pátzcuaro	Chocolate artesanal
<b>PP131 (220)</b>	6495.56 3032.49 1923.96 1245.05	1	Panama	Zamora	Jamón de pavo
<b>PP132 (093)</b>	6245.15 3386.10 1989.45 719.61	1	Derby	Nuevo Parangaricutiro	Carne de res cruda
<b>PP133 (219, 198)</b>	6005.00 2820.28 1923.96 1245.05	2	Panama Panama	Zamora Lázaro Cárdenas	Queso panela s/m Chorizo
<b>PP134 (199)</b>	5774.71 2924.16 1989.45 1245.05	1	Panama	Lázaro Cárdenas	Carne de res cruda
<b>PP135 (248)</b>	5342.06 2625.14 1800.94 1210.16	1	Javiana	Morelia	Carne de res
<b>PP136 (373)</b>	4944.19 2361.49 1319.39 1113.85	1	No hay dato	No hay dato	Heces humanas
<b>PP137 (288)</b>	4241.80 2625.14 1687.83 1144.62	1	Enteritidis	Pátzcuaro	Carne de pollo
<b>PP138 (171)</b>	3787.09 3032.49 1989.45 1319.39	1	Derby	Uruapan	Chorizo
<b>PP139 (307)</b>	2720.67 2128.97 1176.70 848.52	1	Bredency	Zamora	Pollo crudo

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN





**Tabla 8. Cepas de *S. enterica* que presentaron cinco plásmidos.**

PERFIL PLASMÍDICO	TAMAÑO DEL PLÁSMIDO (pb)	No. DE CEPAS	SEROTIPO	LUGAR DE ORIGEN	ALIMENTO DE ORIGEN
PP140 (322, 321)	5553.86 4406.52 2057.75 1743.20 1028.95	2	Javiana Panama	Morelia Morelia	Camarón chico c/cabeza Almeja
PP141 (145)	47840.65 32960.24 2128.97 1583.82 848.52	1	Havana	Morelia	Chorizo
PP142 (273)	13363.20 5138.97 4083.84 1861.16 1583.82	1	Give	La piedad	Carne de res
PP143 (147)	10481.52 7917.68 5342.07 1800.94 1443.29	1	Panama	Morelia	Carne de res
PP144 (324)	5342.07 3932.35 2057.75 1687.83 1002.94	1	Panama	Apatzingán	Pollo crudo
PP145 (241)	4944.19 2720.67 1861.16 1281.44 1002.94	1	Agona	Apatzingán	Chorizo

**Tabla 9. Cepas de *S. enterica* que presentaron seis plásmidos.**

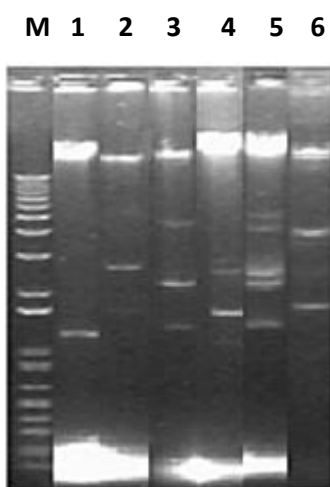
PERFIL PLASMÍDICO	TAMAÑO DEL PLÁSMIDO (pb)	No. DE CEPAS	SEROTIPO	LUGAR DE ORIGEN	ALIMENTO DE ORIGEN
PP146 (084)	35801.42 15727.74 10067.71 4757.41 2533.57 1534.99	1	Anatum	Chorizo	Uruapan

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



Las cepas analizadas presentaron de 1 a 6 plásmidos diferentes. La mayoría de las cepas presentaron un plásmido (Fig.14).

El grupo de cepas que presentaron 5 plásmidos incluye la mayor cantidad de serotipos, siendo el serotipo Enteritidis el mayoritario. Se encontró relación del PP5 con el alimento/muestra de origen pero no con el serotipo, sin embargo la mayoría de cepas del serotipo Enteritidis se agrupan en este perfil mientras los perfiles PP24, PP26, PP30, PP80 muestran relación del serotipo, lugar y alimento de origen, además los perfiles del serotipo Anatum PP70 y PP72 muestran agrupación sin tener igual localización geográfica ni alimento de origen.



**Figura 14. Numero de bandas obtenidas del perfil plasmídico de *Salmonella enterica* analizadas en este estudio.** Gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA); 1-6, ADN extracromosómico de las cepas 317, 319, 304, 307, 322, 084.

### 7.5 Relación genética entre las cepas con base en el perfil de plásmidos.

Se construyó un dendrograma por serotipo. El dendrograma de la Fig. 15, agrupó a un corte del 60% de similitud, a las 25 cepas no serotificables en 10 clústeres, P1-a P10. Se observan 4 clusters con 1 cepa, 3 clusters con 3 cepas, 2 clusters con 2 cepas y el más abundante con 8 cepas (332,346,372, 216, 333, 345, 368 y 355) de diferentes.

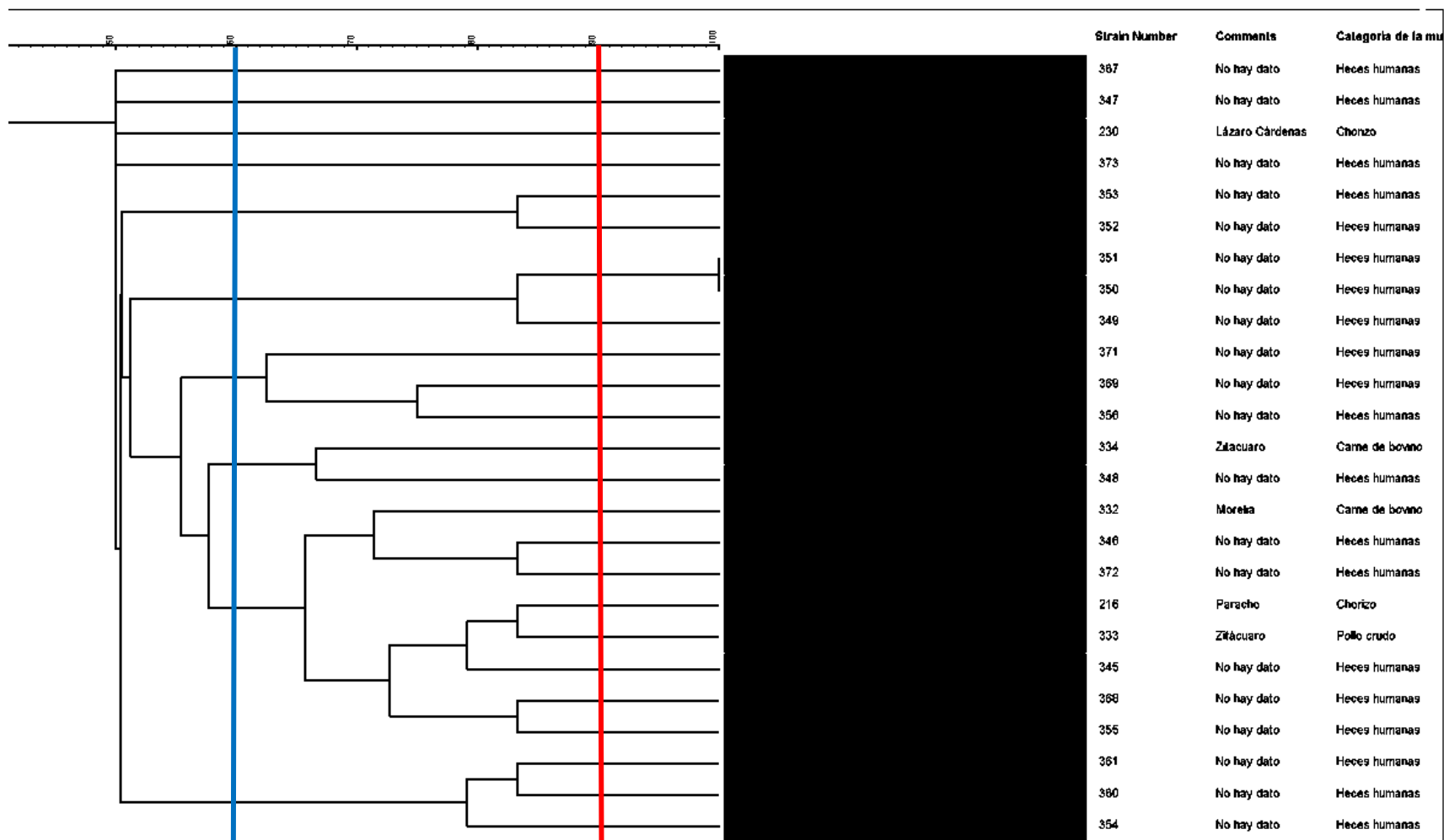


Figura 15. Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de aislados sin serotipificar de heces humanas y de alimentos de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán.



En otro dendrograma (Fig.16), se agruparon las 24 cepas del serotipo Anatum en 11 clústeres, Q1-Q11 a un corte de 60% de similitud, se formaron 5 clusters Q1, Q2, Q3, Q7, Q9 con una cepa, 3 clusters Q5, Q6, Q11 con 3 cepas, 2 clusters Q4, Q10 que contienen la mayoría de las cepas con 4 cepas cada uno y 1 cluster Q8 que contiene 2 cepas.

En el dendrograma que incluyó a las 19 cepas del serotipo Typhimurium (Fig. 17), agrupó las cepas en 11 clústeres R1-R11, separados a un coeficiente de similitud del 60%, los primeros 4 clados contienen únicamente una cepa, mientras los clados R5, R6, R9, R10 y R11 contienen dos subclústeres dos cepas cada uno, el clado R8 contiene 1 cepa, el clado R7 contiene el mayor número de cepas (21, 16, 144 y 302).

El cuarto dendrograma agrupó 21 cepas de los serotipos Give, Derby y Senftenberg (Fig. 18) en 12 clústeres S1-S12, separadas a un coeficiente de similitud del 60%, el clúster S12 presenta tres cepas mientras cuatro de los clústeres presentan dos cepas, el clúster S7 presentó mayor cantidad de cepas (52, 123, 148,310)

Otro dendrograma agrupó 21 cepas de los serotipos Panama y Agona en 19 clústeres T1-T19 (Fig.19) separados a un coeficiente de similitud del 60%, se observó que 8 de los clados son independientes, el clado T9 contiene 2 cepas, el clúster T11 contiene 5 cepas, el clado con mayor número de aislados fue T7 que contiene 6 cepas (199, 198, 86, 237, 220 y 219).

El sexto dendrograma agrupó 23 cepas de los serotipos Vejle, Enteritidis, Newport, Havana, Saintpaul en 11 clústeres (Fig. 20) U1-U11, separados a un coeficiente de similitud del 60%, se observaron 7 clados independientes, un clado con dos cepas, el clado U1 y U3 contienen tres cepas cada uno, el clado U11, el clúster que mayor número de cepas fue el clado U11 que contiene 8 cepas (145, 129, 33, 71, 111, 63, 315, 340).

El dendrograma que agrupó a los serotipos de los serotipos Adelaide, Javiana, Bredency, Montevideo, London, Sinstorf, Muenchen, Oranienburg (Fig.21) contiene 19 cepas



agrupadas en 9 clados V1-V9 , tiene un clado independiente además se aprecian 6 clados que cepas, dos clados incluyen 3 cepas además los clados V3, V9 que contienen 3 cepas cada uno.



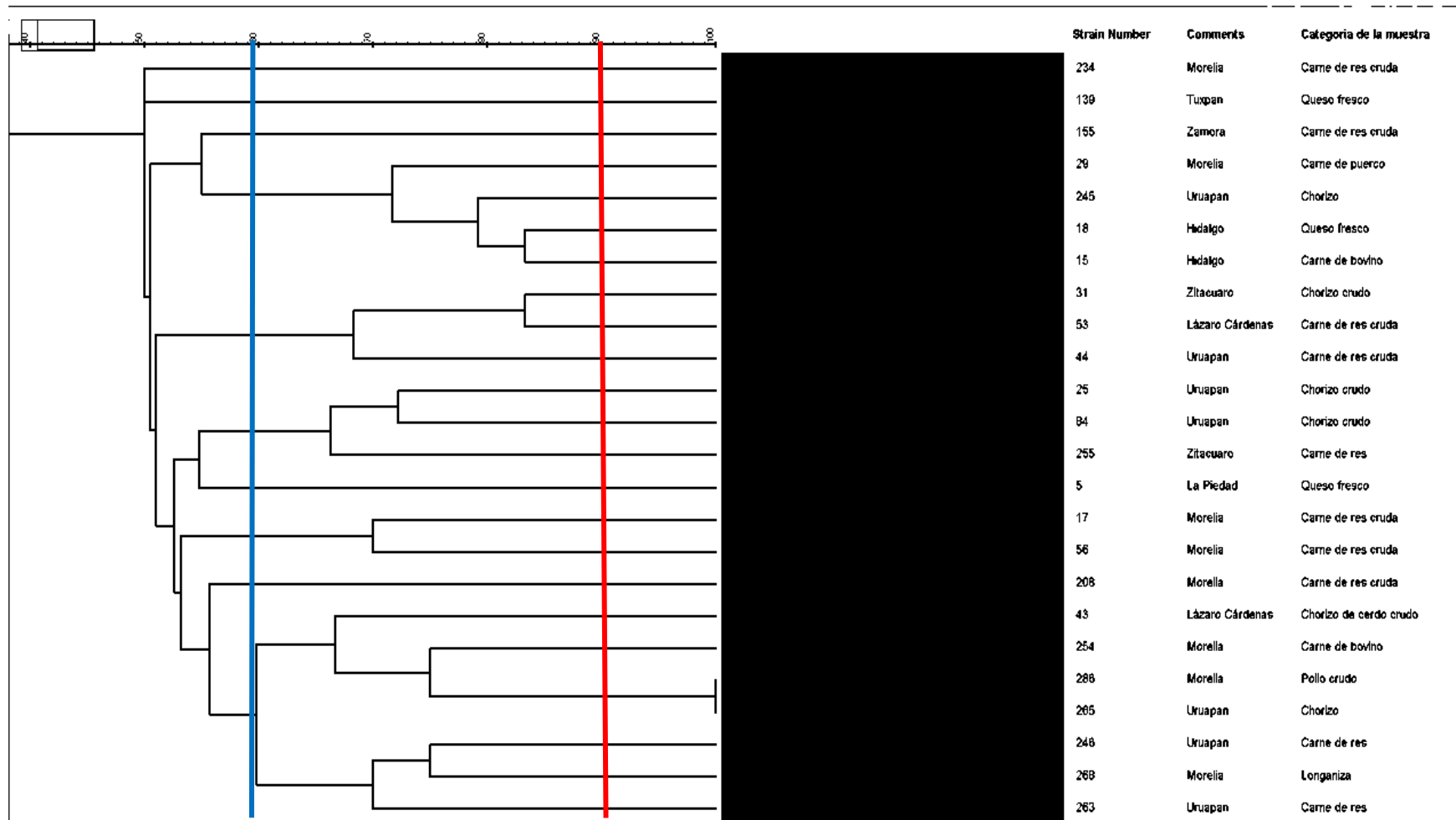


Figura 16. Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos del serotipo Anatum aislados de diferentes alimentos de cepas de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



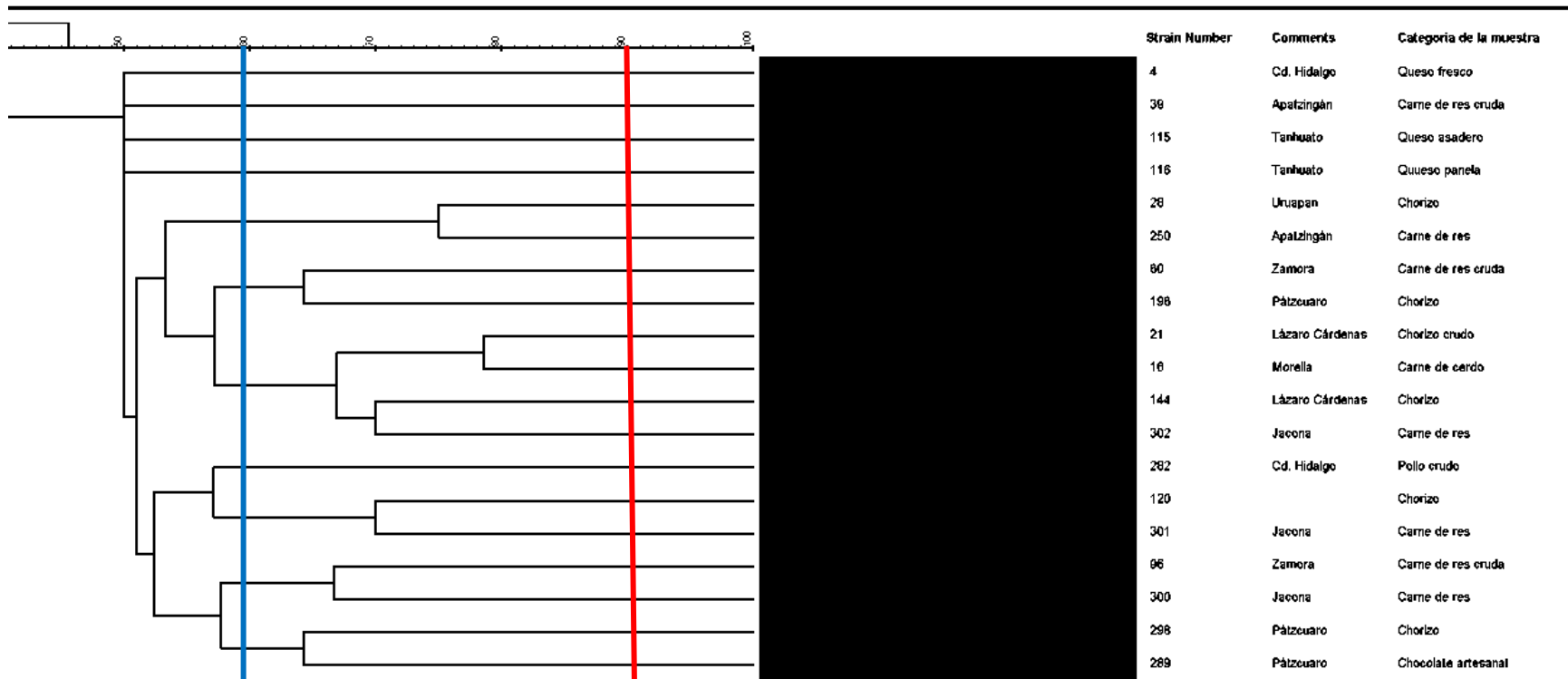


Figura 17. Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos del serotipo Typhimurium aislados de diferentes alimentos de cepas de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán.

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



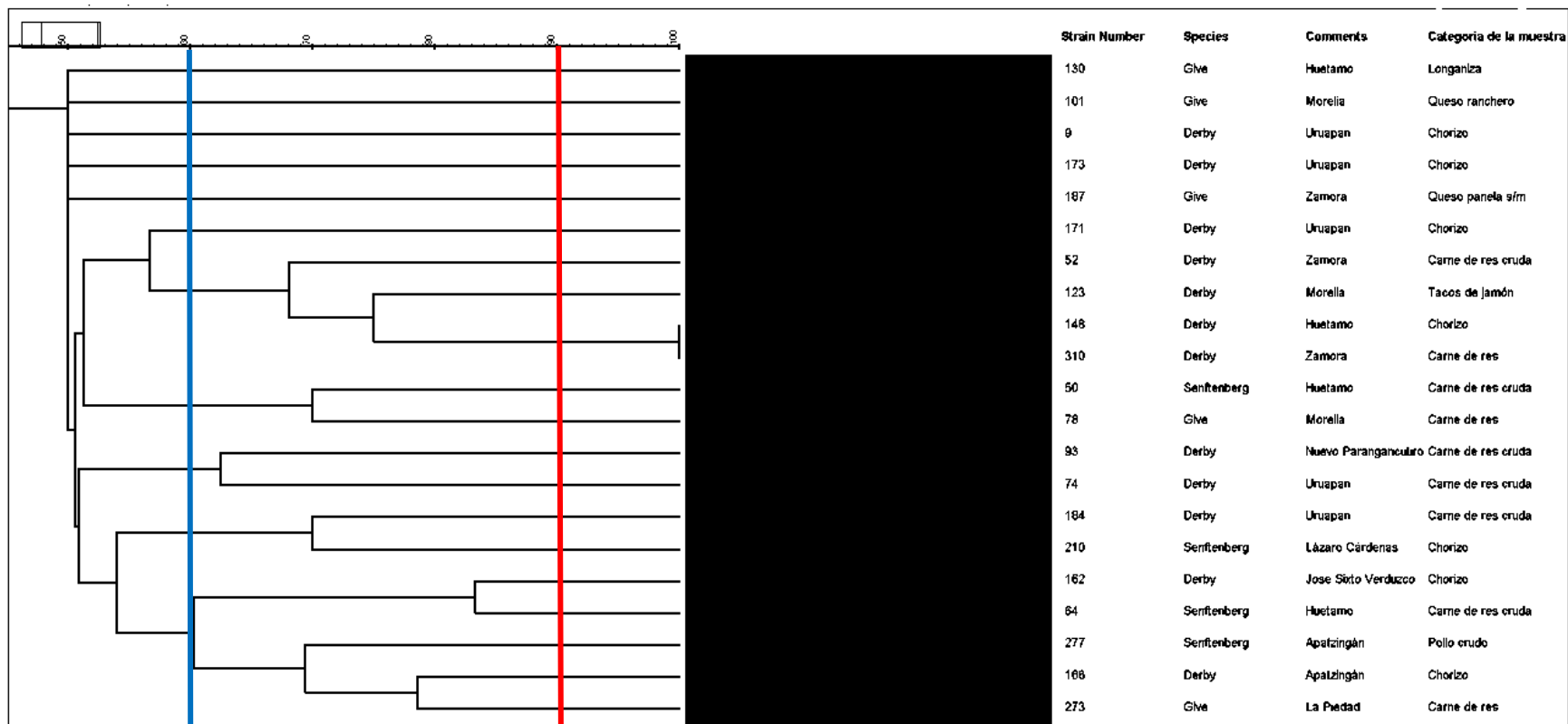


Figura 18. Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos GIVE, Derby y Senftenberg aislados de diferentes alimentos de cepas de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán.

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOCÁN





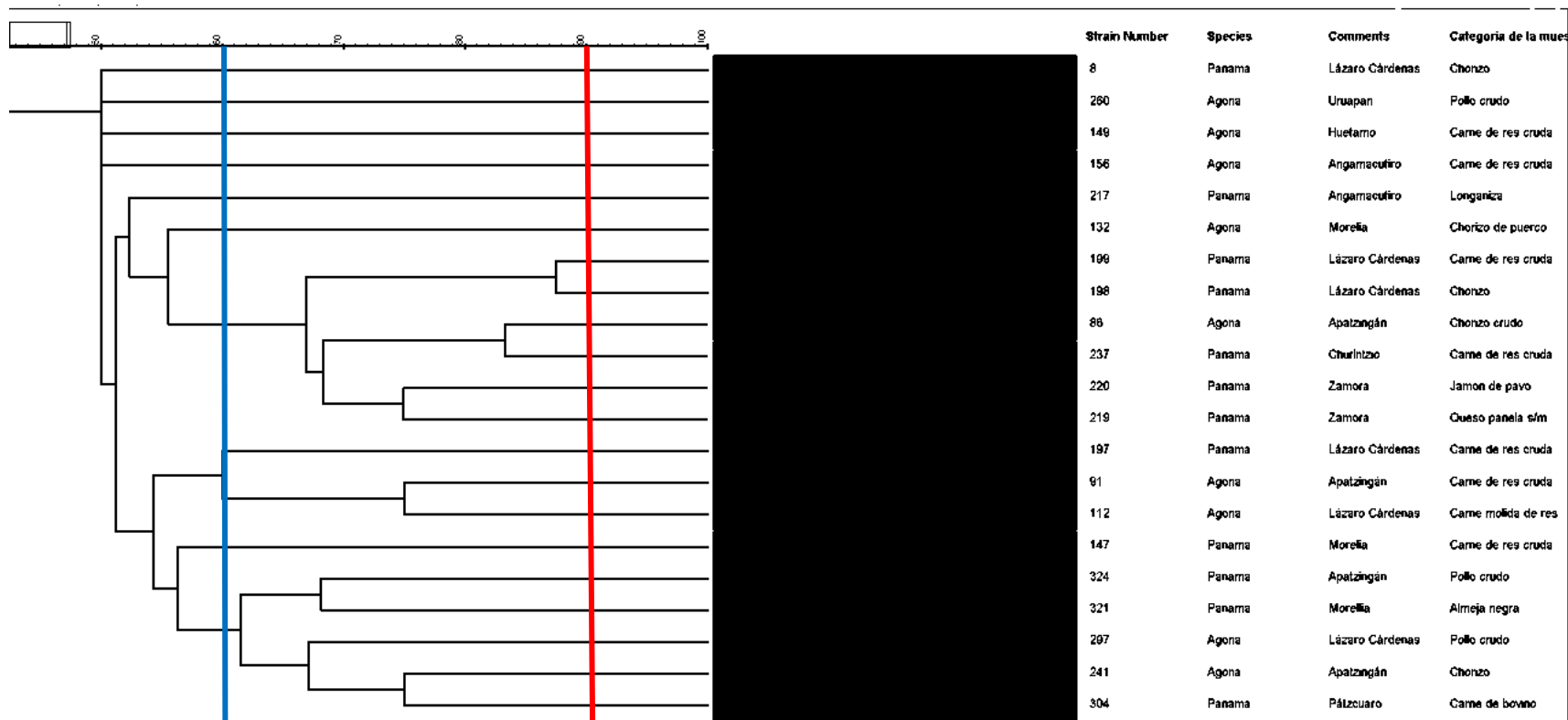


Figura 19. Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Panama y Agona aislados de diferentes alimentos de cepas de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán.



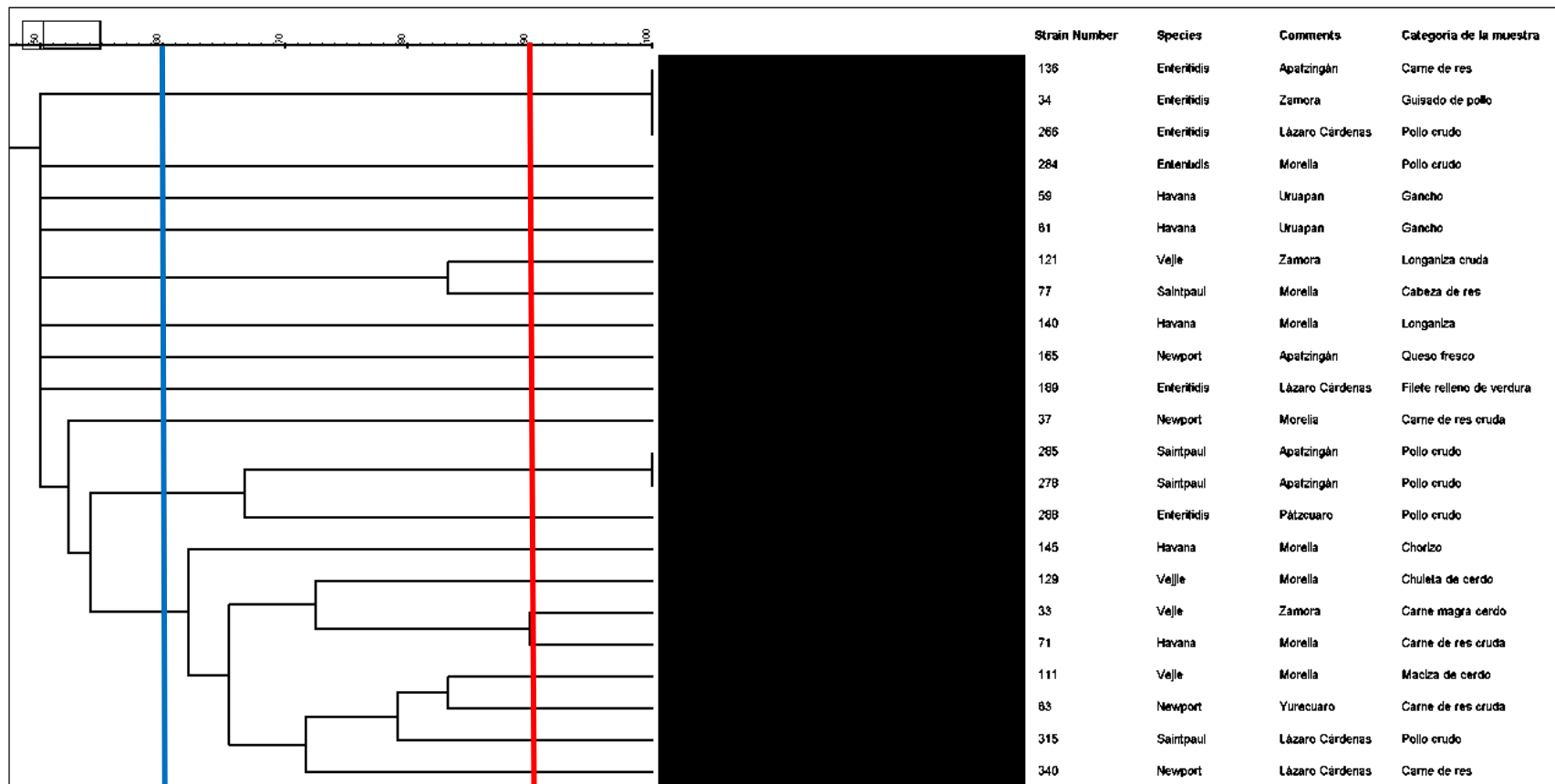


Figura 20. Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Vejle, Enteritidis, Newport, Havana, Saintpaul aislados de diferentes alimentos de cepas de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán.



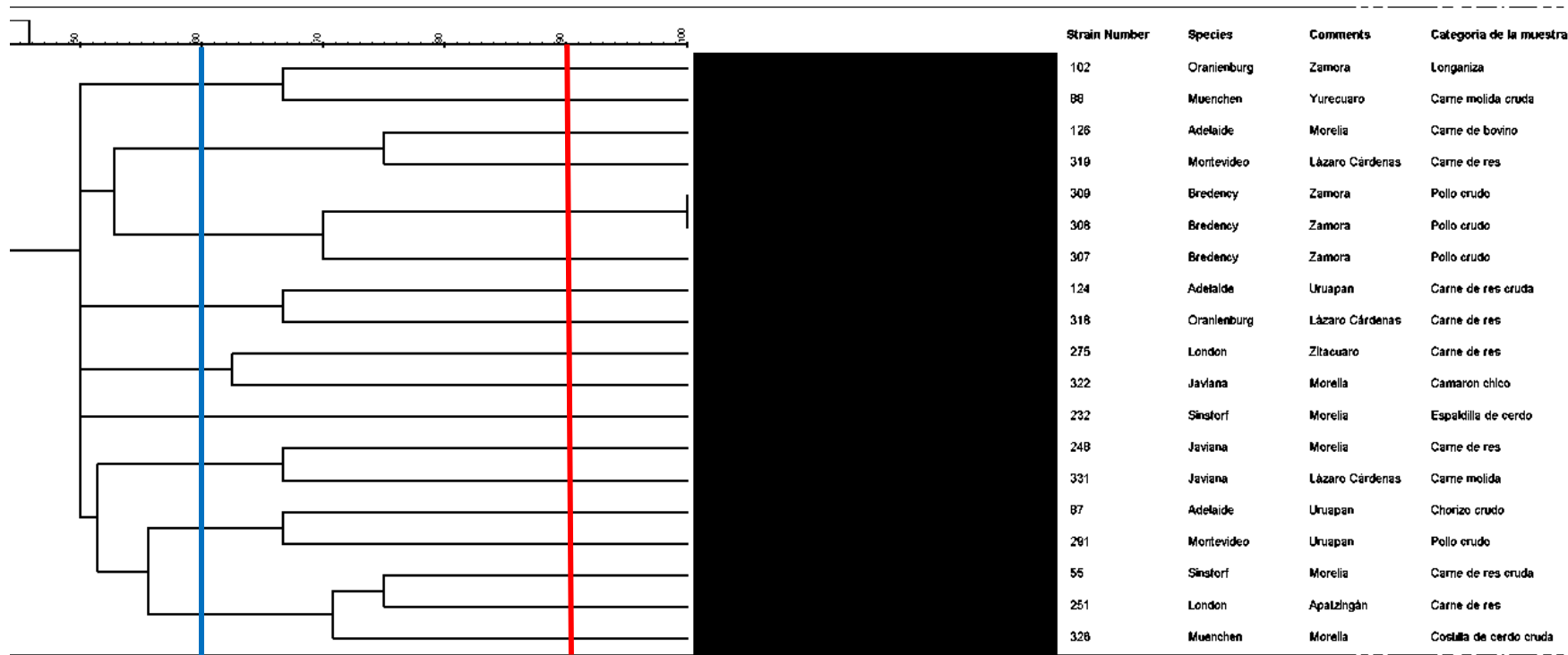


Figura 21. Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Adelaide, Javiana, Bredency, Montevideo, London, Sinstorf, Muenchen, Oranienburg aislados de diferentes alimentos de cepas de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán.

PERFIL PLASMÍDICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



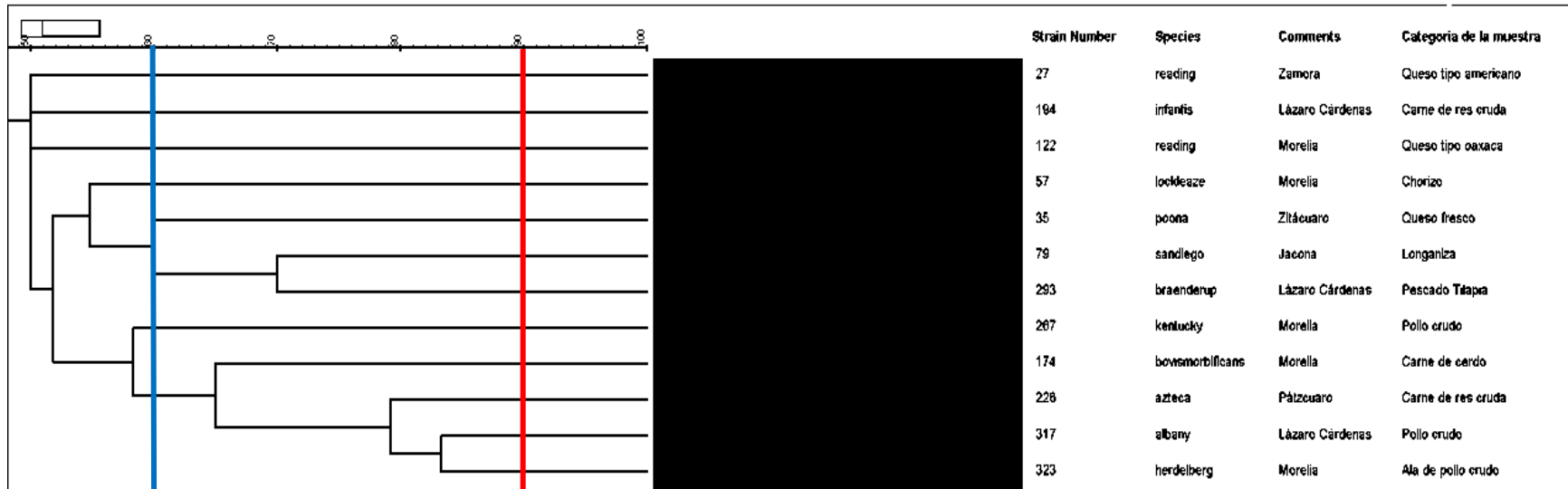


Figura 22. Dendrograma construido con los perfiles plasmídicos de los serotipos Bovismorbificans, Reading, Poona, Infantis, Lockleaze, Muenster, Sandiego, Kentucky, Braenderup, Azteca, Herdelberg, Albany aislados de diferentes alimentos de cepas de *Salmonella enterica* del Estado de Michoacán.



El último dendrograma obtenido agrupó 12 cepas de los serotipos Bovismorbificans, Reading, Poona, Infantis, Lockleaze, Muenster, Sandiego, Kentucky, Braenderup, Azteca, Herdelberg y Albany (Fig. 22) en 4 clústeres W1-W4, a un coeficiente de similitud del 60% seis de los clados contienen una cepa independiente, otro clado contiene dos, siendo el clado W8 quien contiene el mayor número de cepas (174, 226, 317, 323).

En ninguno de los ocho dendrogramas a los coeficientes de similitud del 60% y del 90% se encontró relación entre el perfil, con la procedencia geográfica ni el alimento de origen, sin embargo se encontró relación entre el serotipo y el perfil plasmídico.

A un porcentaje de similitud del 90% en los dendrogramas se encontró en el análisis 4 pares de cepas, cada par pertenece a un mismo serotipo que presentan el mismo Perfil Plasmídico, de 1 par de ellos solo se conoce el lugar de origen mientras que las cepas de los pares correspondientes a los serotipos Anatum, y Derby pertenecen a diferente lugar y alimento de origen, el par que corresponde al serotipo Bredency corresponde al mismo lugar y alimento de origen, además se encontraron 3 cepas pertenecientes al serotipo Enteritidis cada una de diferente lugar de origen y alimento de origen (Tabla 10).

**Tabla 10. Cepas analizadas que presentaron perfil plasmídico idéntico.**

No. de cepas con igual Perfil Plasmídico	Serotipo	Lugar de Origen	Alimento de Origen
350-351	No hay dato	No hay dato	*Heces humanas
286-265	Anatum	Morelia-Uruapan	Pollo crudo-Chorizo
148-310	Derby	Huetamo-Zamora	Chorizo-Carne de res
136-34-266	Enteritidis	Apatzingán-Zamora-Lázaro Cárdenas	Carne de res-Guisado de pollo-Pollo crudo
308-309	Bredency	Zamora	Pollo Crudo

\*Lugar de donde fue aislada.

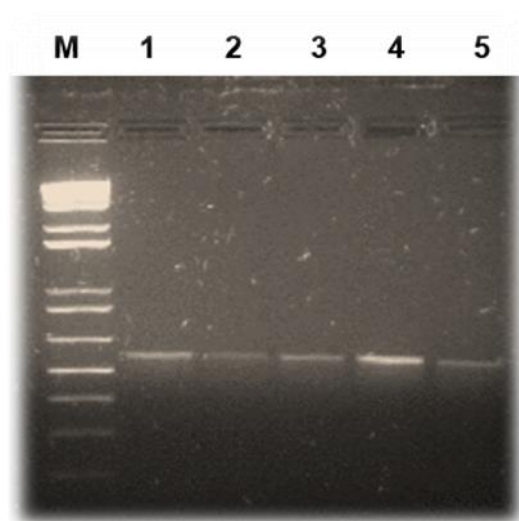


## 7.6 Comparación con la susceptibilidad antimicrobiana.

El patrón de resistencia con *Salmonella enterica* realizado por Inocencio en 2011 (Anexo1) muestran multirresistencia a antibióticos tales como: Carbencilina, Cloranfenicol, Trimetoprim Sulfametoxazol, Ampicilina, Gentamicina, Cefalotina, Cefotaxima, Amikacina, Netillmicina, Nitrofurantoina, Pefloxacina, Ceftriaxona en aquellas cepas que presentan plásmidos mientras que en las cepas que no se encuentran presentes plásmidos se observa que existe sensibilidad o resistencia a 1 solo antibiótico.

## 7.7 Amplificación por PCR del gen *spvC* asociado a virulencia.

Se amplificó el gen *spvC* con el ADN plasmídico obtenido de las cepas de estudio. Únicamente se obtuvo el amplicón con el peso molecular esperado y reportado en GenBank de 684pb en las cepas 136, 189, 266, 287, 320 (Fig. 23), de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.



**Figura 23. Gen de virulencia *spvC* en plásmidos de cepas *S. enterica* analizadas en este estudio.** Gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio que muestra, Carriles: M, marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA); Carriles 1-5 amplicones del gen *spvC* de las cepas 136,189, 266, 287, 320.

### **7.8 Asociación del perfil plasmídico con diferentes variables.**

Se encontró correlación positiva entre el perfil plasmídico y el serotipo ( $P= 0.002$ ), no se encontró relación entre el perfil plasmídico con la procedencia geográfica ( $P=0.313$ ) y el alimento de origen ( $P=0.413$ ). Se encontró además correlación positiva entre el perfil plasmídico y el gen de virulencia *spvC* ( $P= 0.001$ ), y entre el serotipo con el gen de virulencia *spvC* ( $P=0.000$ ). Sin embargo, el gen de virulencia *spvC* no tiene relación con el alimento de origen ni la procedencia geográfica ( $P=0.989$ ) y ( $P=1.00$ ) respectivamente.



## 8. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó el perfil plasmídico y la presencia del gen *spvC* en 297 cepas de *S. enterica* aisladas del Estado de Michoacán, obtenidas de alimentos cárnicos, lácteos, productos de origen marino así como de heces humanas. Los serotipos Typhimurium y Anatum fueron los más abundantes, este dato coincide con lo reportado para otras regiones de nuestro país, en donde aparte de estos dos serotipos se han encontrado en mayor cantidad los serotipos Enteritidis, Agona y Derby (Gutiérrez, 2000). Estos serotipos también se encontraron en este trabajo pero en menor cantidad y aunque el serotipo Enteritidis ha ido en aumento en los últimos años en nuestro país y en otros países como España, Estados Unidos, África y Turkia (Charles *et al.*, 2007; Van Duynhoven *et al.*, 2002), mientras en el Estado no se observa esto.

Es importante conocer que las especies de *Salmonella* no tifoideas son los principales contaminantes entre los patógenos transmitidos por alimentos (Gatto, 2006; Aktas, 2007).

Los serotipos Anatum, Typhimurium y las cepas no serotificables aisladas de humanos, son las cepas que presentan mayor cantidad de plásmidos. Se encontraron de 1 a 5 plásmidos en cada cepa, similar a lo reportado en otros estudios (Vergara *et al.*, 2002). La presencia de estos elementos tanto en el género *Salmonella* como en dichos serotipos reportados en nuestro estudio, concuerdan con lo reportado en Michoacán y Colombia (Loeza, 2004; Vergara *et al.*, 2002).

El 44% de las cepas utilizadas en este trabajo no presentaron plásmidos lo cual podría explicarse por la capacidad que tiene esta bacteria de perder dichos elementos (Figueroa Ochoa & Verdugo Rodríguez, 2005) al igual que sucede en otras bacterias entéricas tal es el caso de *Shigella* (María *et al.*, 2005).

Con los plásmidos extraídos se determinaron 146 perfiles plasmídicos que permitieron establecer la relación genética entre cepas analizadas, utilizar los plásmidos para obtener perfiles plasmídicos fue un método de genotipificación utilizado primero por su mediana





complejidad durante los años 70 y 80 fue una de las técnicas epidemiológicas moleculares más utilizadas (Lavalett *et al.*, 2009), aunque ya no es muy utilizado actualmente como marcador genotípico (Domínguez *et al.*, 2005), algunos estudios muestran que sigue siendo un marcador molecular de nivel medio tanto en *Salmonella* como en otras bacterias de diferentes géneros, pero que debe complementarse con técnicas de mayor poder discriminatorio (María *et al.*, 2005).

En este estudio el PP complementó la información que ya se tenía de las cepas analizadas, secuencia tipo (Inocencio, 2013); perfiles de virulencia (Maldonado, 2015), así como presencia de determinantes de resistencia a ciertos antibióticos (Inocencio, 2011; Hernández, 2015). Dichos perfiles además fueron útiles para determinar la relación genética entre las cepas donde se muestra gran variabilidad entre los PP a pesar de ser del mismo serotipo y localización geográfica, mediante el coeficiente Dice y el algoritmo UPGMA que asume que el reloj molecular es idéntico para todas las cepas (Domínguez *et al.*, 2005). Se determinó la relación genética entre los serotipos y el PP a un porcentaje de similitud del 60% donde se observan clados con agrupamientos pequeños de cepas mientras que al 90% se observa que cada serotipo es independiente lo que demuestra que genéticamente son diversas lo cual se puede asociar a la supervivencia de la bacteria por lo cual se sugiere otros estudios “*in vivo*” para mostrar la patogenicidad. Se observó que no existe relación entre los plásmidos que presentan con el alimento de origen ni el área geográfica, es decir, que todos los serotipos son totalmente diferentes lo cual muestra un alto poder discriminatorio tales como en estudios realizados en Colombia, (Vergara *et al.*, 2002) donde se muestra variabilidad geográfica de plásmidos en lo cual está asociado al uso antimicrobiano de cada área y factores ambientales existiendo la posibilidad de las mismas causas de variabilidad de nuestros resultados, los cuales no fueron estudiados.

Un estudio realizado en Turquía en 2010 cepas que fueron aisladas de pacientes humanos muestra la presencia de plásmidos de 1-3 diferentes en 12 perfiles plasmídicos en 42



aislados de *Salmonella enterica* de los serotipos Enteritidis, Infantis, Muenchen y Typhi siendo el serotipo Enteritidis el que se encuentra en mayor frecuencia el cual también ha sido reportado como el principal serotipo en todo el mundo el cual se visto además con mayor frecuencia en todo el mundo (www.cdc.gov/mmwr/2005), lo cual difiere de nuestros resultados debido a que en el Estado de Michoacán se encuentran en mayor cantidad los serotipos Typhimurium y Anatum además de se muestran 146 PP de 165 cepas que presentaron plásmidos, las cuales provienen de alimentos y humanos, es decir, una variabilidad genética superior y un mayor número de plásmidos presentes debido a que se observaron de 1-6 plásmidos diferentes.

Estudios en Taiwán en 2005 muestran la presencia diferentes perfiles plasmídicos que pueden agrupar a una o más cepas del serotipo Enteritidis aisladas de humanos que contienen de 1-4 plásmidos de diferente peso molecular lo cual coincide con nuestros resultados a pesar del origen de nuestras muestras ya que las de nuestro estudio provienen de alimentos adicionalmente en nuestro estudio muestran la presencia del gen *spvC* asociado a virulencia albergado en estos plásmidos de gran tamaño lo cual se confirma debido a que hubo dos perfiles mostraron plásmidos de un peso molecular bajo y estos no presentaron dicho gen.

Con base a los dendrogramas obtenidos se observaron PP iguales de algunas cepas de los mismos serotipos siendo estos Anatum, Derby, Enteritidis, Bredency y Aislados humanos, sin embargo se observó que eran de diferentes lugares y alimentos de origen (Tabla 10), por lo cual no existe relación epidemiológica ya que la obtención de patrones de bandas similares no siempre indica una relación epidemiológica entre plásmido porque aunque tengan fragmentos similares se debe considerar la capacidad de tener otros elementos de transmisión horizontal (Domínguez, 2005) lo cual coincide con nuestro estudio debido a que del serotipo Enteritidis las 3 cepas que muestran patrones idénticos de plásmido 136 y 266 presentaron el gen *spvC* relacionado a virulencia mientras la 34 no contiene dicho gen.



Para un nivel mayor de discriminación de estos plásmidos que contienen patrones iguales se sugiere la aplicación adicional de enzimas de restricción al estudio del ADN plasmídico debido a que en estos casos se utiliza para distinguir si las bandas corresponden a plásmidos iguales o no (Merino *et al.*, nd).

El análisis plasmídico ha mostrado mayor sensibilidad y especificidad que los métodos fenotípicos, permitiendo mediante la biología molecular realizar estudios epidemiológicos más precisos en las poblaciones por (serotipia resistencia) (Vergara, 2002). Pero es necesario tener datos precisos por lo cual se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de Chi-cuadrada de Pearson, arrojando que existe relación entre el PP con el serotipo con un valor de  $X_2=0.002$ , pero que no existe relación entre el PP en cuanto al área geográfica con un valor  $X_2=0.313$  además de no existir relación entre el PP con el alimento de origen con un valor de  $X_2=0.413$  lo cual confirma los resultados de los dendrogramas obtenidos mostrando la variedad genética de estos elementos móviles.

Otros trabajos realizados demuestran la gran variedad genética que existe en *Salmonella* gracias a la presencia de plásmidos con los cuales se determinan diferencias en la patogenicidad tanto como en la adhesión al hospedero (Fluit, 2005; Huehn *et al.*, 2010). Estos plásmidos pueden ser de diferentes tipos ya que existen plásmidos de virulencia los cuales son los más comunes que pueden ser de conjugación o no conjugativos (Martínez, 2013; Patiño, 2011) además existen plásmidos degradativos, plásmidos de resistencia, y plásmidos de Fertilidad (Smith & Sockett, 1999).

Los datos obtenidos sugieren que las cepas contienen plásmidos de resistencia debido a que los serotipos que presentaron estos elementos móviles muestran un patrón de multi-resistencia a ciertos antibióticos entre ellos a  $\beta$ -lactámicos lo cual concuerda con lo reportado en aislamientos hechos en África, los cuales demostraron un alto índice de multiresistencia a antibióticos de primera línea, principalmente por plásmidos conjugativos



(Mills-Robertson, 2002). Se pueden transmitir de una bacteria a otra también mediante fagos de una bacteria a otras constituyendo un “pool” compartido de material genético de escala evolutiva (Martínez, 2013).

Existen muchos estudios que reportan la presencia de genes de resistencia codificados dentro de plásmidos conjugativos, como los realizados en Estados Unidos que muestran genes de resistencia codificados en plásmidos en cepas multi-resistentes aisladas de cerdo (Gebreyes, 2002). En cuanto a humanos en Rumania se encontraron cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y Heilderberg que presentaron resistencia a cefalosporinas (Miriago, 2002).

En la actualidad la mayor utilidad que se le da a la detección de plásmidos de la misma o diferente especie bacteriana, es ayudar a la localización de otros elementos como lo son: los integrones, transposones, intrones, o genes (Lavalett *et al.*, 2009). Tal es el caso del Plásmido de virulencia de *Salmonella* que tiene una región conservada de 7.8 kb la cual es un operón compuesto por 5 genes denominado región *spv*RABCD (Patiño *et al.*, 2011).

Se ha reportado que durante la evolución de *Salmonella*, fue ganando determinantes de virulencia, entre ellos plásmidos de virulencia específicos para algunos serotipos, presentes al principio únicamente en cepas del serotipo Typhimurium en Europa denominado pSLT, cuenta con la región conservada de *spv* la cual contiene el gen *spvC*, sin embargo varios serotipos fueron adquiriéndolo por diferentes mecanismos como la transposición horizontal la cual puede promover la resistencia geográfica, es decir, que en un área determinada en donde existen distintos serotipos de *Salmonella* así como de otras bacterias de distinto género puedan adquirir por conjugación dicho plásmido de virulencia que está asociado a resistencia antimicrobiana generando problemas epidemiológicos en alguna región específica (Courvalin, 2009). No se cuenta con el patrón de resistencia de las cepas que contienen el gen *spvC* por lo cual para completar el estudio se sugiere realizar antibiogramas de las cepas de estudio.



El amplicón obtenido de 570 pb correspondiente a un fragmento del gen *spvC*, se encontró únicamente en el 16% de las cepas, todas del serotipo Enteritidis. Esto parece depender de la región geográfica de procedencia. En, África, el gen se encontró presente también en los serotipos Enteritidis, Typhimurium, Gallinarum, Anatum y Montevideo y en Europa únicamente en el serotipo Enteritidis y Typhimurium (Huehn *et al.*, 2010).

En este trabajo no se detectó el gen *spvC* en cepas del serotipo Typhimurium, sugiriendo la pérdida del plásmido de virulencia que lo contiene o bien la acción de transposición o algún integrón responsables de haber transferido el gen a otra bacteria del mismo o diferente género, ya que se ha reportado su capacidad autotransferible o movilizable además de su asociación con la producción de infección sistémica (Patiño *et al.*, 2011).

El análisis estadístico realizado buscó confirmar la asociación entre el perfil plasmídico con el serotipo, área geográfica, alimento de origen y la presencia del gen *spvC* lo que arrojó que la presencia del gen *spvC* se asocia con el serotipo y con el perfil plasmídico.



## 9. RESUMEN DE RESULTADOS

- I. En el Estado de Michoacán se encontraron en mayor cantidad los serotipos Anatum, Typhimurium y aislados de humanos en mayor cantidad
- II. La mayor cantidad de serotipos así como de casos presentados en el Estado de Michoacán de Salmonella fue en la capital del Estado Morelia y Lázaro Cárdenas.
- III. El 55.55% de las 297 cepas analizadas presento plásmidos mientras el 44.44% de las mismas no se encontraron plásmidos.
- IV. El 30% de las cepas presentaron plásmidos entre 680 y 11,363 pb, mientras el 18% de las cepas de las cepas presentaron plásmidos con un tamaño mayor a 12,000 pb, y el 18% presentaron plásmidos entre 576pb-54,180pb.
- V. El mayor número de serotipos que presentaron plásmidos fueron Anatum, Typhimurium y aislados de humanos.
- VI. Se encontraron 146 PP en 165 cepas de diferentes serotipos y lugares de procedencia.
- VII. Los dendrogramas realizados mostraron existe relación entre el perfil plasmídico y el serotipo además que no existe relación entre el perfil plasmídico y el área geográfica además no se encontró relación entre el perfil plasmídico y el alimento de origen.
- VIII. Algunas cepas de los serotipos Enteritidis, Anatum, Derby, Bredency y aislados de heces humanas presentaron el mismo plásmido, siendo del mismo serotipo pero de diferente área geográfica y alimento de procedencia.
- IX. El gen *spvC* se presentó en el 16% de las 297 cepas, todas del serotipo Enteritidis
- X. Existe relación entre el serotipo y el perfil plasmídico ( $P=0.002$ ). No se encontró relación entre el perfil plasmídico y el área geográfica, tampoco se encontró relación entre el perfil plasmídico y el alimento de origen ambos ( $P > 0.05$ ).
- XI. Existe relación entre el serotipo, el perfil plasmídico y la presencia del gen *spvC* ( $P=0.000$ ,  $P= 0.001$  respectivamente )
- XII. No se encontró relación entre la presencia del gen *spvC* con la procedencia geográfica y el alimento de origen ( $P > 0.05$ ).



## 10. CONCLUSIÓN

La presencia de plásmidos en las cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos y humanos durante el periodo 2008-2015 en el Estado de Michoacán, se relaciona con la multirresistencia y la presencia del gen *spvC*.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alonso, J.L., Usera, M., & Echeita., M.A** (1992). The occurrence of *Salmonella* serotypes in marine recreational waters of Valencia, Spain. *Microbiología* 1992; 8: 44-8.28.
2. **Apuntes de Biología y Química.** Revisado y Corregido. Mecanismo de Transducción. Obtenido de: <http://www.vi.cl/foro/topic/1071-apuntes-de-biologia-y-quimica-revisado-y-corregido/page-62>.
3. **Aula Biogeotoni.** Mecanismo de Conjugación. Obtenido de: Mecanismo de Conjugación. Obtenido de: <http://biogeotesttoni.blogspot.mx/2015/05/2-biologia-bachillerato.microorganismos.html>.
4. **Aktas, Z., Día, M., Bal Kayacan, C., Diren, S., & Threlfall E.J** (2007) Caracterización molecular de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* mediante análisis de plásmidos y electroforesis en gel de campo pulsado. *Int J Antimicrob Agents* 30: 551-5.
5. **Betancor, L., Gadea, P., & Flores, K.** (2005). Genética bacteriana. Mecanismos de las Enfermedades Infecciosas, 1–15. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 12.pdf>.
6. **Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B.** (2000). Guest Commentary. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465–2467. <https://doi.org/10.1128/JB.00499-06>.
7. **Bugarel, M., Granier, S. A., Weill, F.-X., Fach, P., & Brisabois, A.** (2011). A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-151>
8. **Charles, G. L., Medina, C. E., & Hernández, J.** (2007). Prevalencia de *Salmonella* sp en alimentos en el Estado de Tamaulipas durante el año 2005, 437–443.
9. **Coburn, B., Grass, G. A., & Finlay, B.** (2006). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85, 112–118.
10. **Cofepris.** (2012). Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios Comisión de Autorización Sanitaria (Primera ed). México, D.F.
11. **Courvalin, P.** (2009). Flujo de resistencia inducido antibiótico (3a). (M. Schaechter, Ed.). París, Francia.
12. **Domínguez, A. M., Coll, P., Coque, M. T., Dominguez, A. M., Vázquez, J., & Vila, J.** (2005). Procedimientos en Microbiología Clínica. (E. Cercenado & R. Cantón, Eds.). España.





13. **Durango, J., Arrieta, G., & Mattar, S.** (2004). Presencia de *Salmonella* spp. en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomedica*, 24, 89–96.
14. **Echeita, M. A., Aladueña, A. M., Díez, R., Arroyo, M., Cerdán, F., Gutiérrez, R., & Ángel, M.** (2005). Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001, 23(3), 127–134.
15. **Frederick M., Ausubel, R.B., Robert E., Kingston D., More, D., Seidman J.G., John A., & Smith, K.S** (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. Editorial Board.
16. **Figueroa Ochoa, I. M., & Verdugo, A.** (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1–2), 25–42. <https://doi.org/10.1107/S1744309108039882>.
17. **Fluit, A. C.** 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43:1-11.
18. **Gal-Mor, O., & Finlay, B.B.** (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8: 1707–1719.
19. **Gatto, A.J., Peters, T.M., Green, J., Fisher, I.S.T., & Gill, O.N.** (2006) Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries 2000–2004: results of an international multi-center study. *Epidemiol Infect* 25:1–8.
20. **Giannella, R.** (1996). *Salmonella* - Medical Microbiology - NCBI Bookshelf. Medical Microbiology.
21. **Guiney, D. G., & Fierer, J.** (2011). The role of the *spv* genes in *Salmonella* pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 2(JUNE), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00129>.
22. **Gutiérrez, L., Montiel, V.E., Aguilera P.P., & González, A.M.** (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México*. 42:490-495.
23. **Hernández, C.** (2015) Búsqueda de genes *SUL*, *TeT* e Integrones de clase 2 en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos en Michoacán. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH, Morelia Michoacán.
24. **Huehn, S., La Ragione, R. M., Anjum, M., Saunders, M., Woodward, M. J., Bunge, C., & Malorny, B.** (2010). Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5), 523–535. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0447>.
25. **Informed Health.** (2016). *Diarrea infecciosa aguda: gérmenes comunes y vías de infección.* Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0088724/>.



26. **Inocencio, A.** (2011) Resistencia a antibióticos y presencia de integrones en aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y lácteos en el Estado de Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH, Morelia Michoacán.
27. **Inocencio, A.** (2013) Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Facultad de ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" UMSNH, Morelia Michoacán.
28. **Jurado Jiménez, R., Arenas Muñoz, C., Doblas Delgado, A., Rivero, A., & Torre-Cisneros, J.** (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*. *Medicine*, 10(52), 3497–3501. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70069-X](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70069-X).
29. **Lahiri, A., Lyer, N., Das, P., & Chakravorty, D.** (2010) Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes infect.* 12: 809 – 818.
30. **Lavalett, L., Sánchez, M. M., Muñoz, N., & Moreno, J.** (2009). Desarrollo y validación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple para la identificación de los serogrupos B, C2 , D y E de *Salmonella enterica*. *Biomedica*, 244–252.
31. **Loeza Lara, P., Valdez Alarcon, J., Baizabal Aguirre, V., & López Meza, J.** (2004). Mecanismos De Replicación De Los Plásmidos Bacterianos. *Reb*, 23(2), 71–78.
32. **Lopardo, H. A.** (2016). Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología volumen (Vol. I). Buenos Aires, Argentina.
33. **Madigan, M. T., Martinko & Parker, J.** (1998b). Biología de los microorganismos, 8ª edición. Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. pp.807.
34. **Maldonado, L. P.** (2015). Perfiles de virulencia de aislados de salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Facultad de ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" UMSNH, Morelia Michoacán.
35. **María, D., Mota, I., Varela, G., María, B., María, D., Caffer, I., & Schelotto, F.** (2005). Serotipos, perfil plasmídico y antibiotipos de cepas de *Shigella flexneri* aisladas de niños menores de 5 años con diarrea sanguinolenta usuarios de los servicios de Salud Pública.
36. **Martínez, L. G. M.** (2013). Genética Bacteriana y Mecanismos de la Transferencia Horizontal Genética Concepto de especie bacteriana. *Genetica Bacteriana*, 1, 5. Retrieved from <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/t1texto1.pdf>
37. **Martínez, A.** (2007). Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología, 202.



38. **Mazurkiewicz, P.,** Thomas, J., Thompson, J. A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., & Holden, D. W. (2008). *spvC* is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Molecular Microbiology*, 67(6), 1371–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06134.x>.
39. **Mezal, E.H., Stefanova R., & Khan, A. A.** (2013). Isolation and Molecular Characterization of *Salmonella enterica* serovar Javiana from food, environmental and clinical samples. *International Journal of food microbiology*, 164(1), 113-118 OMS (2013). Centro de prensa de Cáncer. OMS, 1-6. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es>.
40. **Merino, L. A., Alonso, J. M., -Ronconi, M. C., & -Hreňuk, G. E.** (n.d.). Dotación Plasmídica como Marcador Epidemiológico Bacteriano, (3500).
41. **Mills, R., Addy, M., Mensah, P., & Grupper S.** (2002). Molecular characterization of antibiotic resistance in clinical *Salmonella typhi* isolated in Ghana. *FEMS Microbiol Lett*, 215:249-53.
42. **Miriago, V., Filip, R., Comon, G., & Tzovelek L.** (2002). Expanded-Spectrum cephalosporin-Resistant *Salmonella* strains in Romania. *J Clin Microbiol*, 40:4334-36.
43. **Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M.** (2009). *Microbiología Médica* (6a.ed). Barcelona: Elsevier, 34-36.
44. **Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., & Kruse, H.** (2010). Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S3–S15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021>.
45. **OMS.** (2015). OMS | *Salmonella* (no tifoidea). Who. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>.
46. **Ozdemir, K., & Acar, S.** (2014). Plasmid profile and pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Salmonella enterica* isolates from humans in Turkey. *PLoS ONE*, 9(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095976>.
47. **Pachón, D. A.** (2009). Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *crocodylus intermedius* y *testudinos* mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical roberto franco e.b.t.r.b de la Facultad de Ciencia Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio – meta diana.
48. **Parra, M., Durango, J., Máttar, S., & De Tema, R.** (2002). microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Mvz-Córdoba*, 7(2), 187–200.
49. **Pang, J. C., Chlu, T. H., Chiou, C. S., Schroeter, A., Guerra, B., Helmuth, R., & Tsen, H. Y.** (2005). Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage



- types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6), 1472–1483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02749.x>
50. **Patiño, D. F., Cardona, N. M., & Margot, S. M.** (2011). Búsqueda del plásmido de virulencia de *Salmonella* en aislamientos clínicos colombianos Search of the *Salmonella* virulence plasmid in Colombian clinical isolates. *Revista CES Medicina*, 25, 54–64.
  51. **Prescott, L., Harley, J. P., & Klein, D.A** (2004). *Microbiología*. 5ª edición. Ed McGraw Hill, Madrid. pp 62-63.
  52. **Puerta, A., & Mateos, F.** (2010). *Enterobacterias*, 10(51).
  53. Sánchez Jiménez, M. M., & Cardona Castro, N. M. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio: Revista de La Asociación Colombiana de Infectología*, 7(1), 23–29.
  54. **Ramírez, M., Valdés, N., Bravo, L., Fernández, A., & Castañeda, N.** (2004). Perfil plasmídico y resistencia antimicrobiana en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(3), 178-185.
  55. **Sambrook, J., & Russell, D.W** (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring, USA. Sharples GJ and Lloyd RG. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*. 18: 6503-6508
  56. **Sharp, P. A., Roberts, R. J., Nobel, P., Gilbert, W., Nobel, P., Cech, T. R., & Altman, S.** (1993). Ilustración del proceso de ajuste desde pre-ARN a ARN., 1–4.
  57. **Silva, C., Wiesner, M., & Calva, E.** (2012). The Importance of Mobile Genetic elements in the evolution of *Salmonella*: pathogenesis, antibiotic resistance and Host Adaptation. *Salmonella-A Diversified*. <https://doi.org/10.5772/52807>.
  58. **SINAVE.** Boletín epidemiológico (2017). <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/272138/sem44.pdf>.
  59. **Stein, C., Hendrickx, S., Pru, A., Wolfson, L., Engels, D., & Kuchenmu, T.** (2007). The Global Burden of Disease Assessments, 1(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000161>.
  60. **Suárez, C. J.** (2015). “Análisis de perfiles plasmídicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de urocultivos en el instituto nacional de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
  61. **The center for food Security & Public Health.** (2013). Salmonelosis asociada a los reptiles. Ames, Iowa.
  62. **Turki, Y., Mehr, I., Ouzari, H., Khessairi, A. & Hassen, A.** (2014). Molecular typing, antibiotic resistance, virulence gene and biofilm formation of different *Salmonella enterica* serotypes. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(4), 123–130. <https://doi.org/10.2323/jgam.60.123>.



63. **Van Duynhoven, Y.T., Widdowson, M.A., de Jager C.M., Fernandes, T., Neppelenbroek, S., & van den Brandhof, W.** (2002). Salmonella enterica serotype Enteritidis phage type 4b outbreak associated with bean sprouts. *Emerg Infect Dis*, 8: 440-3.
64. **Vergara, C., Visbal, J., & Máttar, S.** (2002). Serotipia, resistencia a antimicrobianos y perfiles plasmídicos de bacterias enteropatógenas aisladas de procesos diarreicos de Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2): 211-215.
65. **Zaidi, M. B., Macías, C. L., & Calva, E.** (2006). Estudios Mexicanos sobre *Salmonella*: Epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 121–125. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>.
66. **WHO.** (2013) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>. Consultado el 27 de Septiembre, 2013.



## ANEXOS

Patrones de resistencia a antibióticos de cada una de las cepas de *Salmonella enterica* analizadas en este trabajo (Inocencio, 2011).

CEPA	SEROTIPO	PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS
01	Derby	SENSIBLE
02	Anatum	CB
03	Give	SENSIBLE
04	Typhimurium	SENSIBLE
05	Anatum	SENSIBLE
06	Give	SENSIBLE
07	Senftenberg	SENSIBLE
08	Panama	AM,CB,CL,GE,NF,STX
09	Derby	SENSIBLE
011	Montevideo	AK,CB,NET,
012	Agona	CB
014	Mbandaka	SENSIBLE
015	Anatum	AM,CB,STX
016	Typhimurium	CL,GE,STX
017	Anatum	CL,STX
018	Anatum	AM,CB,STX
019	London	SENSIBLE
020	London	SENSIBLE
021	Typhimurium	CRO, STX
022	Anatum	CLO
023	Bovismorbificans	AK,CB
024	Typhimurium	AMP,CB,CF,CLO,STX
025	Anatum	AMP,CB,GE,STX
026	Agona	SENSIBLE
027	Reading	AK
028	Typhimurium	AM,CF,CL,PEF
029	Anatum	AM,CB,STX
031	Anatum	SENSIBLE
033	Vejle	CB,NET
034	Enteritidis	AMP, CB, CF, CTX, CLO, GE, NET, NF, PEF
035	Poona	CB
037	Newport	SENSIBLE

---

PERFIL PLASMÁTICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN



039	Typhimurium	AM, CB, CF, CL, GE, STX
040	Agona	SENSIBLE
042	Meleagridis	SENSIBLE
043	Anatum	AMP, CB, CF, CLO
044	Anatum	AMP, CB, STX
045	Anatum	CB
050	Senftenberg	SENSIBLE
051	Infantis	AK,AMP,CB,CF,CTX,CRO,CLO,GE,NET,NF,STX
052	Derby	SENSIBLE
053	Anatum	CB
054	Typhimurium	AMP, CF, CLO, GE, STX
055	Sinstorf	AM, CB, CF, CL, STX
056	Anatum	AMP, CB, CF, CTX, STX
057	Lockleaze	AM, CB, CTX, CRO, CL, STX
058	Mbandaka	AMP, CB, CF, CLO, GE, STX
059	Havana	GE,STX
060	Typhimurium	SENSIBLE
061	Havana	AM, CB, CF, CL, GE, NF, PEF, STX
062	Agona	SENSIBLE
063	Newport	SENSIBLE
064	Senftenberg	SENSIBLE
065	Agona	SENSIBLE
069	Typhimurium	AM, CB, CF, CL, STX
071	Havana	SENSIBLE
073	Muenster	SENSIBLE
074	Derby	SENSIBLE
076	Sinstorf	STX
077	Saintpaul	SENSIBLE
078	Give	CTX,CRO,NET
079	Sandiego	SENSIBLE
080	Panama	AK, CL
081	Agona	SENSIBLE
082	Muenchen	AK
084	Anatum	AM, CB, NF, STX
085	Muenster	SENSIBLE
086	Agona	CB
087	Adelaide	SENSIBLE
088	Muenchen	CLO
089	Typhimurium	AM, CF, CL, GE, STX
090	Agona	SENSIBLE
091	Agona	SENSIBLE

---

PERFIL PLASMÁTICO Y PRESENCIA DE GEN *spvC* EN CEPAS DE *Salmonella enterica* DE DIFERENTES SEROTIPOS, OBTENIDAS EN MICHOACÁN





092	Panama	CL
093	Derby	SENSIBLE
095	Muenster	SENSIBLE
096	Typhimurium	PEF
101	Give	CL
102	Oranienburg	CB
104	Agona	SENSIBLE
106	Montevideo	AK
108	Panama	AMP, CF, CTX, CLO, GE, PEF, STX
109	Typhimurium	AM, CB, CF, CTX, CRO, CL, GE, NET
110	Give	SENSIBLE
111	Vejle	CB
112	Agona	CB, CLO, GE, NF, PEF, STX
114	Newport	SENSIBLE
115	Typhimurium	AM, CB, CF, CL
116	Typhimurium	SENSIBLE
117	Weltevreden	SENSIBLE
118	Vejle	SENSIBLE
119	Vejle	SENSIBLE
120	Typhimurium	AM, CB, CF, CTX, CRO, CL, GE, PEF, STX
121	Vejle	SENSIBLE
122	Reading	SENSIBLE
123	Derby	CB
124	Adelaide	AM, CB, CL, GE, NF, STX
126	Adelaide	CB
127	Typhimurium	AMP, CB, CF, CTX, CLO
128	Give	CB
129	Vejle	AM, CB, CL, STX
130	Give	SENSIBLE

CB: Carbencilina, CL: Cloranfenicol, STX: Trimetroprim Sulfametoxazol, AM: Ampicilina, GE: Gentamicina, CF: Cefotaxima, AK: Amikacina, NET: Netilmicina, NF:Nitrofurantoína, PEF: Pefloxacina

