



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**"PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS
DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A
NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS
DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE
MICHOACÁN"**

T E S I S

EDGARDO ELEAZAR LARA AGUILAR

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ASESOR

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

Morelia, Michoacán, marzo de 2019

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quiero agradecer a mis asesores, a la D.C. Soledad Vázquez Garcidueñas y al D.C. Gerardo Vázquez Marrufo, sin los cuales no hubiese sido posible la realización de este proyecto, gracias por creer en mí y por permitir cumplir con el desarrollo de esta tesis. A Anita y Mariana por lo mucho que me enseñaron.

A mis compañeros de laboratorio, Adrián, Eva, Rubén, Estela, con los que compartí muy buenos momentos y que al igual que yo estuvimos realizando nuestra tesis de licenciatura. Especialmente agradezco a Mar por su ayuda incondicional, por toda la enseñanza que me brindó y sobre todo por la amistad que hoy en día tenemos.

A mis padres, Eleazar y Angélica, que sin ellos yo no estaría aquí, dedico todo mi esfuerzo y trabajo a ellos que son mi todo y aunque no estuvieron cerca de mí estos largos años siempre los he tenido en mi corazón y en mis pensamientos, no cesan mis ganas de decir que es gracias a ustedes que esta meta está cumplida. A mi hermano Einer, mi mejor amigo, que siempre ha estado para mí las 24 hrs. del día para alentarme cuando yo estoy abajo, gracias por darme ánimos y por tus buenos consejos.

A mis amigos, Ben, Majo, Onassis y Mariela, con ellos compartí la mayor parte de mi vida universitaria, les doy gracias por los bellos momentos que compartimos y por todo el aprendizaje que nos dejó la escuela.

A Esmeralda, que fue mi primera amiga desde mi primer día de clases y que a pesar de habernos separado hemos seguido juntos, gracias por tus consejos, por aguantarme todo este tiempo y por no dejar de animarme cada que nos vemos.

Quiero dar un agradecimiento muy especial a Karla, mi compañera de vida, ella pues, siendo la mayor motivación en mí, por su inmensa paciencia, por extender su mano en momentos difíciles, porque no ha sido fácil llegar aquí. Por el amor que me has brindado cada día, te agradezco por tanta ayuda y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración.

Esto es por ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Descripción	Pág.
ÍNDICE GENERAL		I
ÍNDICE DE TABLAS		III
ÍNDICE DE FIGURAS		IV
ABREVIATURAS		V
RESUMEN		VII
ABSTRACT		VIII

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

ÍNDICE

	pp
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Salmonelosis	1
1.1.1 Epidemiología	1
1.1.2 Patogenia y patología	4
1.2 El género <i>Salmonella</i>	5
1.2.1 Clasificación y taxonomía	5
1.2.2 Características morfológicas y bioquímicas	7
1.2.3 Serotipificación	8
a) Estructura antigénica	9
b) Antígeno O	10
c) Antígeno H	10
d) Antígeno K o Vi	10
e) Esquema Kauffmann-White	10
1.3 Plásmidos	13
1.3.1 Perfil plasmídico	14
1.4 Genes asociados con la virulencia en <i>S. enterica</i> y su relación con plásmidos	17
1.5 Otros plásmidos descritos en <i>Salmonella enterica</i>	20
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.1 Material biológico	26
5.2 Extracción de ADN plasmídico	29
5.3 Amplificación por PCR del gen de virulencia <i>spvC</i>	29
5.4 Construcción de dendrograma	30
5.5 Tratamiento estadístico	30
6. RESULTADOS	31
6.1 Análisis de los perfiles plasmídicos de las cepas en estudio	31

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

6.2 Relación genética entre las cepas en estudio.....	33
6.3 Asociación del Perfil Plasmídico con diferentes variables epidemiológicas	33
6.4 Relación del perfil de plásmidos y antibiograma	33
6.5 Gen de virulencia	33
6.6 Distribución geográfica de los perfiles plasmídicos en el Estado de Michoacán.....	36
7. DISCUSIÓN	37
8. RESUMEN DE RESULTADOS	42
9. CONCLUSION	42
10. BIBLIOGRAFÍA	43
11. ANEXOS	54

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Descripción	Pág.
1	Pruebas bioquímicas de identificación para <i>Salmonella</i>	7
2	Ejemplos de serotipificación de <i>Salmonella</i>	12
3	Cepas analizadas	26
4	Perfil plasmídico expresado por las cepas analizadas	32
5	Relación del perfil plasmídico con el alimento y antibiograma	35

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Descripción	Pag.
1	Distribución de casos nuevos de Fiebre Tifoidea por año	2
2	Clasificación del género <i>Salmonella</i>	6
3	Mapa de la región <i>spv</i> que se encuentra en los plásmidos de virulencia en cepas de la subespecie 1	20
4	Frecuencia de serogrupos de los aislados de <i>Salmonella enterica</i>	28
5	Cantidad y porcentaje de muestras obtenidas en productos cárnicos, embutidos, lácteos y pastas	28
6	Perfil plasmídico de las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	31
7	Dendrograma de relación genética en base a los plásmidos obtenidos en las cepas de estudio	34
8	Distribución geográfica en el estado de Michoacán de los perfiles plasmídicos	36

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
dATP	Deoxinucleósido Trifosfato de Adenina
dCTP	Deoxinucleósido Trifosfato de Citocina
dGTP	Deoxinucleósido Trifosfato de Guanina
dTTP	Deoxinucleósido Trifosfato de Timina
ARN	Ácido Ribonucleico
CCC	Covalently Closed Circular (plásmidos cerrados covalentemente)
CIT	Citrato
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetracético
H ₂ S	Sulfuro de Hidrógeno
H	Hora
Kb	Kilobase
IND	Indol
KIA	Agar Hierro de Kligler
LESPM	Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán
LIS	Lisina
MAP	Mitogen-Activated Protein (proteínas activadas por mitogenos)
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
mM	Milimolar
MOT	Motilidad
µL	Microlitro
µM	Micromolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
Ng	Nanogramo
OC	Open Circular
OR	Ornitina
ONPG	O-Nitropheni-β-Galactopiranósido

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

PAD	Fenilalanina Desaminasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PP	Perfil Plasmídico
RM	Rojo de Metilo
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SPI	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>
<i>spv</i>	<i>Salmonella</i> Plásmido de Virulencia
SSA	Secretaria de Salud
Tris-HCl	Tris-Ácido Clorhídrico
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (Método de grupo de pares no ponderados con media aritmética)
URE	Ureasa
VP	Voges Proskauer

RESUMEN

Salmonella enterica es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo, la cual se asocia principalmente con la ingestión de alimentos contaminados. El control de la salmonelosis requiere de estrategias que permitan la detección temprana y la tipificación adecuada del agente causal. La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre *S. enterica* en México y en Michoacán sólo reportan la incidencia y los serotipos, encontrados en brotes o muestras de alimentos. El perfil de plásmidos se utiliza como marcador fenotípico y para caracterizar aislados, ya que puede estar relacionado con un tipo de cepa, serotipo o cualquier otro grupo subespecífico. En este trabajo se determinó el perfil plasmídico (PP) de 57 cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos en Michoacán, identificadas a nivel de serogrupo. Se extrajo el ADN con el método de lisis alcalina con posterior visualización mediante electroforesis en geles de agarosa. En 34 de las cepas analizadas se observó la presencia de 1 a 7 plásmidos, con tamaños que variaron de 900 a 12,000 pb; además, todas las cepas presentaron de una a dos bandas mayores a 12,000 pb, con excepción de la cepa 328. Con estos patrones de bandeo se construyeron matrices de ausencia y presencia, obteniéndose 23 perfiles de plásmidos distintos. Las cepas presentaron una gran diversidad de patrones y no se encontró relación con el serogrupo, con el sitio geográfico de procedencia, ni con el tipo de muestra de donde se aisló. Los resultados obtenidos muestran que el Perfil Plasmídico puede utilizarse para determinar diversidad genética entre cepas de un mismo serogrupo. Ninguna de las cepas analizadas presentó el gen de virulencia *spvC*.

Palabras clave: *Salmonella enterica*, perfil de plásmidos, serogrupo, gen *spvC*, ADN.

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the main etiological agents of gastrointestinal diseases worldwide which is mainly associated with the ingestion of contaminated food. Control of salmonellosis requires strategies that allow early detection and adequate typing of the causative agent. Most of the epidemiological studies on *S. enterica* in Mexico and Michoacán only report the incidence and serotypes found in clinical or food samples. The plasmid profile is used as a phenotypic marker and to characterize strains since it can be related to each strain, serotype or any other subspecific group. In this work, the plasmid profile of 57 strains of *Salmonella enterica* isolated from foods in Michoacán, identified at the serogroup level, was determined. The DNA was extracted with the alkaline lysis method with subsequent visualization by electrophoresis in agarose gels. Only 34 strains presented from 1 to 7 plasmids, with sizes ranging from 900 bp to 12,000 bp, in addition all strains had one to two bands greater than 12,000 bp with the exception of strain 328. With these banding patterns, matrices were constructed for both, absence and presence and thus 23 profiles of plasmids were formed. The strains presented a great diversity of patterns and there was no relationship with the serogroup, with the geographic site and the sample from where it was isolated, which indicates that this method can be used to determine genetic diversity between strains of the same serogroup. None of the strains analyzed presented the *spvC* virulence gene.

Key words: *Salmonella enterica*, plasmid profile, serogroup, *spvC* gene, DNA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Salmonelosis

1.1.1 Epidemiología

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte por enfermedades infecciosas en México y en el mundo. Por ello se les considera un problema de salud pública a nivel global, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos, así como pacientes inmunocomprometidos. Mundialmente las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad entre los lactantes y niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años puede llegar a 50%, aunque esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales (Hernández *et al.*, 2011).

Una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas es la salmonelosis, causada por la especie bacteriana *Salmonella enterica*. Se estima que dicho patógeno afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones. Hasta el presente se han identificado más de 2.500 cepas diferentes (llamadas “serotipos” o “variantes séricas”) de *Salmonella* spp., la mayoría de ellos pertenecientes a la especie *S. enterica*. Varios de estos serotipos tienen una distribución cosmopolita y presentan resistencia a antibióticos y a factores ambientales adversos, pudiendo sobrevivir varias semanas en un entorno seco y varios meses en agua (OMS, 2013).

Los alimentos de origen animal son una fuente importante de un gran número de infecciones en humanos, en particular la carne cruda de pollo, pavo y cerdo. El problema de salmonelosis causada por *S. enterica* ha venido en aumento en las últimas décadas, por tal motivo se han intensificado los programas de control (Flores, 2010). La salmonelosis se transmite por la vía fecal-oral, a través de agua o alimentos contaminados y está asociada a condiciones inadecuadas de higiene y saneamiento; es también considerada la segunda zoonosis en cuanto a número de personas afectadas. Un caso particular de afección por *S. enterica* son las infecciones causadas por el serotipo Typhi causante de la fiebre tifoidea, la mayoría de los casos de esta enfermedad ocurren en los países en desarrollo, particularmente

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

en la India y el suroeste de Asia, aunque es endémica en otras partes de Asia y África y es reportada comúnmente en centro y Sudamérica.

En México, el número de casos de Salmonelosis se encuentra entre los 80,000 y 150,000 infecciones por año, a partir del 2003 se observa un incremento significativo que se mantiene hasta el 2012. En el boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), se reportan los casos de salmonelosis y tiene la capacidad de manifestarse como pequeños brotes dentro de la población general, o bien como grandes brotes en lugares de confinación poblacional, por ejemplo: hospitales, internados, guarderías, etc. (Hernández *et al.*, 2011).

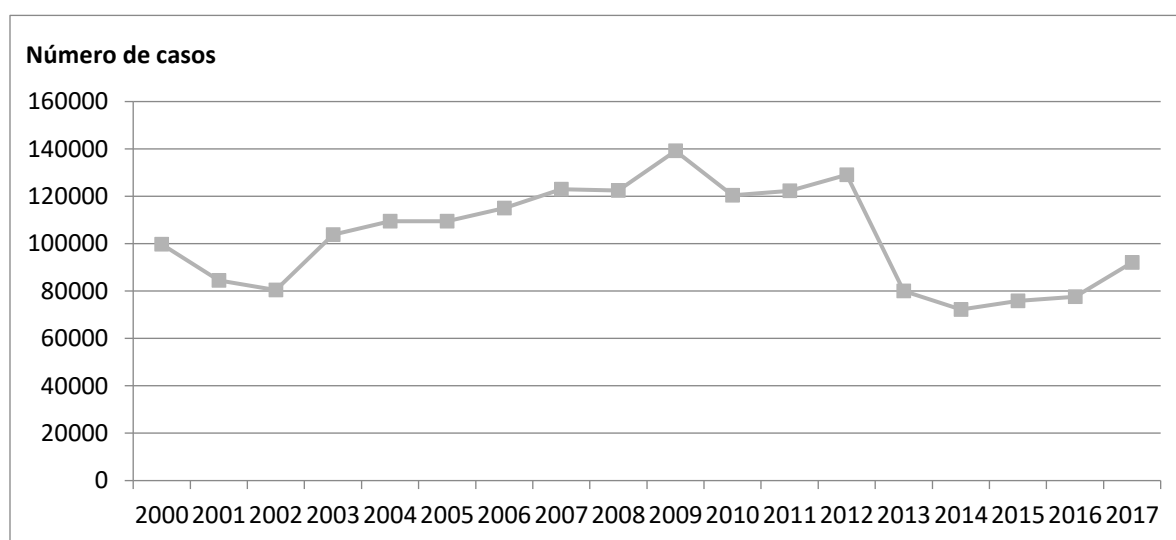


Figura 1. Distribución de casos nuevos de Salmonelosis por año, de 2000 a 2017. Gráfica generada con datos obtenidos del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA.

Por su parte, la salmonelosis en los países en desarrollo es un padecimiento principalmente de viajeros y se estima una incidencia de 3 a 30 casos por cada 100, 000 de ellos (Durango *et al.*, 2004). En los EE.UU. se estima la ocurrencia de 18,000 hospitalizaciones y 500 defunciones cada año causadas por salmonelosis. En Francia, en el año 2005, el 70% de los casos de salmonelosis en humanos fue causado por tres serotipos de *Salmonella enterica*: Enteritidis (33%), Typhimurium (32%) y Hadar (6%) (Flores Castro,

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

2010). La edad de aparición en los pacientes parece ser un factor determinante en la susceptibilidad de infectarse por *S. enterica*. Los brotes provocados con grandes inóculos involucran tasas de ataque elevadas y periodos cortos de incubación (Yáñez *et al.*, 2001).

Con respecto a la morbilidad en 2009, en México la salmonelosis ocupó el decimoctavo lugar dentro de todas las causas de enfermedad, con 139,143 casos. Los estados en los que se ha reportado el mayor número de casos son: Tabasco, Chiapas, Coahuila, Veracruz y Puebla. Las entidades federativas con menos reportes fueron Durango, Hidalgo, Colima, Querétaro y Baja California Sur. El comportamiento epidemiológico de salmonelosis ha mostrado un ascenso de casos durante el período 2003-2012. A partir de 2000, hay una disminución del número de casos, pero a partir de 2003 se observa un ascenso que se mantiene hasta 2012, cuando se comienza a ver una ligera disminución, sin embargo, el número de casos reportados sigue siendo elevado (Fig. 1) (Hernández *et al.*, 2011). Los casos reportados de salmonelosis en México hasta el 2017 son de 92,013 predominando con un número mayor de casos las mujeres siendo 59,949 y los hombres 32,064, el estado con más índices de salmonelosis a la semana 52 de 2018 es Chiapas con 7,618 hombres y 12,878 mujeres, en Michoacán 1287 casos reportados son mujeres y 592 casos hombres (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2018).

En la actualidad, la salmonelosis es la zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados. En Estados Unidos de América, Canadá, Inglaterra, Noruega y Dinamarca, entre otras naciones, se han comprobado brotes de salmonelosis transmitida por alimentos. En humanos, la forma clínica de la infección por el serotipo Enteritidis generalmente se manifiesta como un episodio de enterocolitis autolimitante, con síntomas que se resuelven en cinco días. El periodo de incubación es generalmente de 8 a 72 horas y después de la ingesta de *S. enterica*, la enfermedad dura entre 2 y 7 días, los síntomas más comunes son diarrea acuosa y dolor abdominal. La mayoría de las personas se recuperan sin recibir tratamiento con antibióticos. Sin embargo, en algunos casos la diarrea puede ser severa y la persona puede requerir hospitalización. La susceptibilidad es mayor en niños, ancianos y personas inmunodeficientes. En estos pacientes, la infección puede diseminarse desde el intestino hacia el torrente sanguíneo y de allí hacia otros sitios y puede causar la muerte, a menos de que la persona sea tratada inmediatamente con antibióticos (Castillo *et al.*, 2008).

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

En México los estudios sobre infecciones ocasionadas por *S. enterica* y su importancia en salud pública se han enfocado principalmente en registrar la incidencia de ésta en casos de brotes, así como a distinguir los serotipos más frecuentes (Gutiérrez *et al.*, 2000). Estudios futuros sobre diversidad genética, presencia y mecanismos de transmisión de genes de resistencia y de virulencia, e incluso de secuenciación completa del genoma de las cepas circulantes, podrían ofrecer información vital para mejorar la gestión de este riesgo microbiológico (Ballesteros *et al.*, 2016).

1.1.2 Patogenia y patología

Una vez que la persona ingiere alimentos contaminados con *S. enterica*, el desarrollo de la enfermedad va a depender fundamentalmente de la cantidad de microorganismos ingeridos (inóculo), de su virulencia y de factores dependientes del huésped. La acidez gástrica es una barrera natural importante, siendo factores predisponentes aquellas circunstancias que modifican el pH gástrico, como aclorhidria, vagotomía, gastrectomía o la toma de fármacos que lo modifican. Una vez superada la barrera gástrica, *S. enterica* pasa al intestino delgado donde encuentran un medio más idóneo, más aún si hay una alteración de la flora intestinal normal por el uso previo de antibióticos. Se adhiere a receptores específicos de las vellosidades intestinales, atraviesa la mucosa, alcanza los linfáticos de las placas de Peyer donde se multiplica, pasando a la sangre donde es atrapada por fagocitos y macrófagos del sistema retículo-endotelial, acumulándose en los órganos ricos en él como son hígado, el bazo y la médula ósea. Finalmente, vuelve a pasar al intestino y a la vesícula biliar. Las placas de Peyer se muestran tumefactas, pudiéndose ulcerar la mucosa intestinal pasada la primera semana y originar una hemorragia o la perforación, las dos complicaciones más graves del cuadro. La curación de la enfermedad depende del establecimiento de una eficaz inmunidad celular del huésped por parte de los linfocitos T activados. Pacientes con trastornos de su inmunidad, sobre todo celular, como ocurre en los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o en los pacientes oncológicos, presentan mayor susceptibilidad y desarrollan procesos más graves (Jurado *et al.*, 2010).

Salmonella enterica ha desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir en tipos específicos de células. Su habilidad para infectar todos y cada uno de los tejidos, incluyendo

al cerebro, son testimonio de su éxito como patógeno. Además, este patógeno también tiene la capacidad de defenderse del sistema inmune innato y adaptativo del hospedero (Lahiri *et al.*, 2010).

1.2 El género *Salmonella*

1.2.1 Clasificación y taxonomía

El género *Salmonella* forma parte del dominio Bacteria, *phylum Proteobacteria*, clase *Gamma-proteobacteria*, orden *Enterobacteriales*, familia *Enterobacteriaceae*. El género incluye a dos especies diferentes, las cuales son *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Fig. 2). Se ha propuesto también una supuesta tercera especie, *S. subterranea*, tras el aislamiento de una única cepa ambiental poco usual (OIE, 2008). *S. bongori* es una especie considerada como no patógena para el hombre, aislándose fundamentalmente de animales de sangre fría, especialmente reptiles, aunque algunos casos de enfermedad en humanos han sido reportados. *Salmonella enterica* incluye numerosas cepas patógenas.

La especie *S. enterica* puede subdividirse en 6 subespecies diferentes que son: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (Fig. 2). De éstas, *S. enterica* subespecie *enterica*, es aislada fundamentalmente de mamíferos y aves, alcanzando la cadena alimenticia e infectando accidentalmente al hombre. Se estima que el 99% de los casos de salmonelosis humana están causados por cepas y serotipos de la subespecie I (Langridge *et al.*, 2008).

Cada subespecie a su vez, está conformada por diversos serotipos, habiéndose identificado hasta la fecha más de 2500. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* aislados de muestras humanas, o de animales de sangre caliente, pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* (o subgrupo I) de los siguientes serogrupos: A, B, C1, C2, D, E1, E2, E3 y E4. Cada serogrupo comprende múltiples componentes, son las serovariedades (serotipos).

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

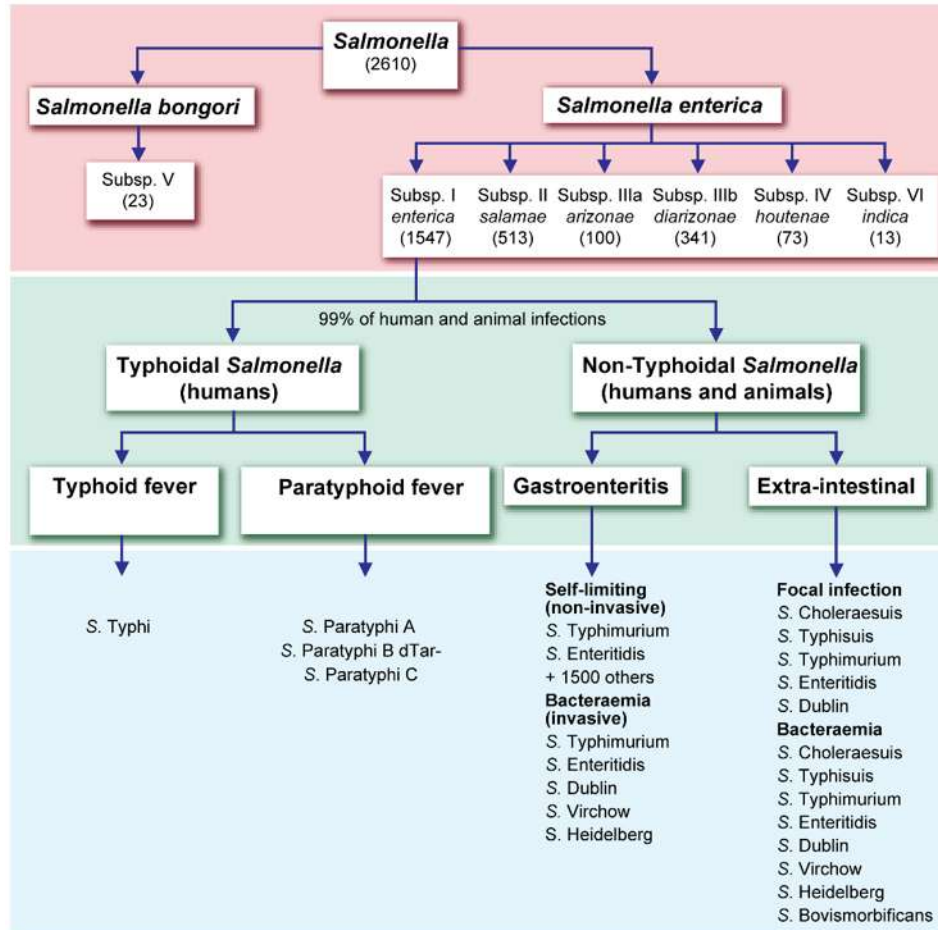


Figura 2. Clasificación del género *Salmonella* (Achtman et al., 2012).

Esta clasificación implica una terminología de uso poco práctico en la clínica bacteriológica, por lo tanto, en términos médicos, la nomenclatura es diferente y simplificada, pues se consideran los nombres de los serotipos (serovariedades) de *S. enterica* como si fuesen nombres de especies. Por ejemplo, "*Salmonella enterica* subgrupo *enterica* serotipo Typhimurium", se refiere como "*Salmonella* Typhimurium" o "S. Typhimurium". Estas denominaciones, aunque menos correctas desde el punto de vista taxonómico estricto, son de aceptación mundial. Con importancia clínico epidemiológica, las más de 2500 serovariedades de *S. enterica* pueden agruparse en tres divisiones ecológicas (spp. son subespecies):

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

- *Salmonella* spp. adaptadas a vivir en el ser humano, entre ellas, *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* y *C*;
- *Salmonella* spp. adaptadas a hospederos no humanos, que circunstancialmente pueden producir infección en el hombre, entre ellas, *S. Dublin* y *S. Cholerae-suis*;
- *Salmonella* spp. sin adaptación específica de hospedero, que incluye a unas 1800 serovariedades de amplia distribución en la naturaleza, las cuales causan la mayoría de las salmonelosis en el mundo.

1.2.2 Características morfológicas y bioquímicas

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos de 2 a 3 x 0.4 a 0.6 micras de tamaño, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*), anaerobios facultativos no encapsulados y no esporulados. Fermentan glucosa con producción de gas (excepto *S. Typhi*), no producen indol, no degradan la urea, descarboxilan lisina y ornitina (Tabla 1). *Salmonella* crece entre 8 y 45°C, a un pH de 4 a 8; no sobreviven a temperaturas mayores de 70°C (Parra *et al.*, 2002) .

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de identificación para *Salmonella*.

KIA	GAS	H ₂ S	RM	VP	IND	CIT	PAD	URE	MOT	LIS	ARG	ORN	ONPG
Alc/A	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-

KIA: agar hierro de Kligler; H₂S: sulfuro de hidrógeno; RM: rojo de metilo; VP: voges proskauer; IND: indol; CIT: citrato; PAD: fenilalanina desaminasa; URE: ureasa; MOT: motilidad; LIS: lisina; ARG: arginina; ORN: ornitina; ONPG: o-nitropheni-β-galactopiranosido.

Se ha reportado la presencia de *S. enterica* fermentadora de lactosa, como es el caso de algunas cepas de los serotipos Virchow, Tennessee, Indiana, Agona, Typhimurium, Oranienburg, Tuebingen, Newport, Typhi, Java y Toulon en humanos; y en cepas de los serotipos Typhimurium y Anatum provenientes de productos lácteos. También se ha aislado *S. enterica* lactosa positiva de animales, como cepas de *S. Typhimurium* en aves, bovinos, caninos y cerdos, causantes de altas tasas de mortalidad y morbilidad. La presencia de estas cepas de *S. enterica* lactosa positiva puede ser debido a que en las heces acumuladas en el ambiente no solamente puede hallarse dicho patógeno, sino también otras bacterias entéricas

como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus*, *Proteus* y *Serratia*, que pueden transportar el operón Lac en plásmido o como en el caso de las cepas de *Klebsiella*, en el cromosoma y que puede ser transferido horizontalmente a cepas de *S. enterica* (McDonough *et al.*, 2000).

1.2.3 Serotipificación

La serotipificación es una técnica inmunológica de interacción antígeno-anticuerpo que permite la identificación específica de un microorganismo, la cual constituye un complemento importante de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico. Esta técnica permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, también es de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión (Caffer *et al.*, 2008). El serotipo o serovar es una cepa bacteriana clasificada según los antígenos que presenta en su superficie celular. Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia en epidemiología. Un serogrupo es un grupo de serotipos que tienen uno o más antígenos en común y se identifican mediante un antisuero específico.

El sistema de serotipificación de *Salmonella* spp. es probablemente el mejor sistema de tipificación fenotípica bacteriano. La serotipificación de *Salmonella* spp. basada en el esquema Kauffmann-White reconoce 46 antígenos O (somáticos) y 119 antígenos H (flagelares), los cuales han permitido la caracterización de 2,541 serotipos. Tiene un alto poder discriminatorio y provee información con significado epidemiológico, desde el punto de vista de la vigilancia basada en laboratorio. Es un método ampliamente utilizado con fines epidemiológicos, que identifica los serovares prevalentes en cada región y la etiología de brotes e infecciones en humanos y animales (Lavalett *et al.*, 2009). La disponibilidad y el costo de antisueros de alta calidad es un problema en algunos países y regiones. La subtipificación molecular da información adicional, de mayor discriminación sin embargo todavía diversos grupos de investigación la consideran un complemento, no un sustituto de la serotipificación.

a) Estructura antigénica

La estructura antigénica de *Salmonella* spp. es similar a la de otras enterobacterias, con dos clases de antígenos principales presentes; antígenos O y antígenos H. En algunas cepas se encuentra un tercer tipo como antígeno de superficie, siendo análogo funcionalmente a los antígenos K de otros géneros; ya que anteriormente se pensó que se relacionaba con la virulencia, éste antígeno se denominó antígeno Vi (Parra *et al.*, 2002).

El uso de reacciones antígeno – anticuerpo para la serotipificación de las bacterias se basa en que los microorganismos presentan diferencias en su constitución antigénica, aún entre grupos de microorganismos relacionados. Los microorganismos expresan una gran variedad de antígenos (Ags) como componentes estructurales de la célula (pared, cápsula, fimbrias) y como productos de excreción (exotoxinas, enzimas extracelulares). Químicamente, los Ags pueden ser proteínas, carbohidratos y complejos de polipéptidos. Como son moléculas complejas, tienen más de una subestructura que puede servir como determinante antigénico. Debido a esto en los sueros inmunes se encuentran anticuerpos que reaccionan contra distintos determinantes antigénicos de la misma molécula (Caffer *et al.*, 2008).

La base de la serotipificación para todas las enterobacterias es similar, pone en evidencia la presencia de antígenos somáticos, flagelares y capsulares. La serotipificación de cepas de *S. enterica* involucra la identificación de antígenos somáticos de superficie (LPS (lipopolisacáridos), antígenos O y antígenos flagelares (proteínas, antígenos H). La mayoría de las cepas de *S. enterica* expresan dos fases flagelares, pero también se conocen variantes afásicas, monofásicas y trifásicas. La identificación de las serovariedades surge como consecuencia de la combinación antigénica de factores somáticos O y flagelares H, con el agregado del antígeno capsular Vi para unas pocas serovariedades (Grimont y Weill, 2007).

La constitución antigénica de la fracción polisacarídica del LPS define en gran parte la especie; así mismo, la clase y el número de azúcares junto con los enlaces existentes entre los mismos, definen los determinantes antigénicos que contienen los antígenos O de un determinado aislamiento. Dichos antígenos O, junto con los determinantes antigénicos existentes en la superficie de los flagelos (antígenos H), que poseen la mayoría de las cepas de *S. enterica*, contribuyen, desde el punto de vista serológico a definir como especie un

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

determinado aislamiento. Este esquema de clasificación se le denomina de Kauffmann-White (Biberstein y Chung Zee, 2004).

b) Antígenos O

Son los antígenos de la pared bacteriana, de naturaleza polisacárida. Existen numerosos antígenos O, a pesar de ello son los factores O principales los que sirven para caracterizar los diferentes tipos antigénicos, (por ejemplo, O4: grupo B, O9: grupo D).

c) Antígenos H

Son antígenos constituidos por una proteína, la flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado. Están codificados por dos genes estructurales que corresponden a la fase 1 y a la fase 2. La mayoría de las cepas del género *Salmonella* pueden expresar las dos especificidades de su antígeno H (difásicos); sin embargo, existen algunas que pueden expresar solamente una sola, ya sea la uno o la dos (monofásicas).

d) Antígenos K o Vi

El único antígeno de este tipo que se conoce en *S. enterica* es el existente en *S. Typhi*, *S. Paratyphi* y *S. Dublin*. La presencia de este antígeno hace imposible la aglutinación de sueros anti O. La expresión de este factor depende de al menos dos genes (ViA + ViB); deben existir ambos en la bacteria para que dicha expresión tenga lugar (Parra *et al.*, 2002).

e) Esquema Kauffmann-White

Sobre la base de los componentes antigénicos somáticos O y flagelares H se ha establecido lo que se denomina el Esquema de Kauffmann-White, que agrupa a todas las serovariedades de *Salmonella* spp. conocidas.

El esquema (Tabla 2) está conformado por cuatro columnas:

Primera columna: indica el nombre de la serovariedad, si la misma pertenece a *S. enterica* subesp. *enterica* (I) o las siglas S. II, S. IIIa, S. IIIb, S. IV, S. V, S. VI; indicando que la serovariedad considerada pertenece a la subespecie II o III a, etc.

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

Segunda columna: antígenos somáticos (O). Los números indican el o los factores del antígeno O y se escriben separados por una coma. Las serovariedades son agrupadas en grupos somáticos, cada uno de ellos caracterizado por un factor O mayor. Así se determinan los grupos A, B, C, etc. Por ejemplo, el grupo O:2 (A) está integrado por *S. Paratyphi* A (1,2,12:a:-) entre otras, el grupo O:4 (B) por *S. Typhimurium* (1,4,5,12:i:1,2); *S. Agona* (1,4,12:f,g,s:-); *S. Saintpaul* (1,4,5,12:e,h:1,2), entre otras, etc. El esquema de Kauffmann-White presenta 67 grupos O, desde el grupo A hasta el Z y luego continúa con números, desde el O:51 hasta el O:67

Tercera y cuarta columnas: antígenos flagelares (H). Se indican los factores de las fases 1 y 2, del antígeno H, respectivamente. Para la fase 1 los factores se denominan con letras minúsculas, seguidas algunas veces por un número que figura como subíndice y para la fase 2 se emplean en general números arábigos, aunque también se utilizan letras minúsculas. Un signo "negativo" indica que la fase considerada está ausente y por lo tanto la serovariedad es monofásica. Los símbolos para los factores somáticos determinados por conversión fágica están subrayados (por ej. 1,2,12)

[] = los factores H u O entre corchetes, no subrayados, pueden estar presentes o ausentes sin relación con la conversión fágica. Por ejemplo, factor [5] del grupo O:4 (B). Cuando los factores H están entre corchetes significa que ellos se encuentran excepcionalmente en cepas salvajes.

Como ya fue mencionado, el esquema Kaufmann-White para la serotipificación de *Salmonella* spp, reconoce 46 antígenos O y 119 antígenos H, los cuales han permitido la caracterización de alrededor de 2, 541 serovares. La serotipificación es una herramienta epidemiológica útil en la identificación de serovares circulantes y estudio de brotes; sin embargo, presenta limitaciones técnicas, de interpretación de resultados y alto costo.

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

Tabla 2. Ejemplos de serotipificación de *Salmonella*

<i>Salmonella enteritidis</i>	1, 9,12:g,m;- El Ag O es 1, 9,12; el Ag H (fase 1) es g,m; El Ag H (fase 2) es -; la fase 2 está ausente, por lo tanto la serovariedad es monofásica.
<i>Salmonella typhimurium</i>	1, 4,5,12:i:1,2 El Ag O es 1,4,5,12 ; el Ag H (fase 1) es i ; el Ag H (fase 2) es 1,2; las dos fases flagelares están presentes, por lo tanto la serovariedad es difásica.
<i>Salmonella hadar</i>	6,8:z10:e,n,x
<i>Salmonella typhi</i>	1, 9,12[Vi]:d:-

(Caffer *et al.*, 2008)

La variación del antígeno O de *Salmonella* spp. es consecuencia de la diversidad genética dentro del grupo de genes *rfb*, los cuales codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis y el ensamble de este antígeno (Fitzgerald *et al.*, 2006; Wyk y Reeves, 1989). Por otra parte, la proteína WZX es característica del grupo de antígenos O y es codificada por el gen *wzx*; esta proteína es una flipasa utilizada para la translocación de la unidad O fuera de la membrana (Liu *et al.*, 1996). La detección de estos antígenos es la base de la serotipificación con antisueros específicos, de los cuales se derivan las fórmulas antigénicas que caracterizan cada serogrupo.

Aunque la serotipificación es un método ampliamente utilizado en estudios epidemiológicos con buen poder discriminatorio, presenta limitaciones tales como la necesidad de más de 250 tipos de antisueros diferentes; los antisueros comerciales son costosos, con disponibilidad limitada y calidad variable para los antígenos menos comunes. Por otra parte, la generación de los resultados toma de tres a cinco días y, aproximadamente, 5% a 8% de los aislamientos son 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 las fases 1 y 2 (Mortimer *et al.*, 2004). Una de las limitaciones de la serotipificación se demuestra por la existencia de cepas que no pueden tipificarse debido a la pérdida del antígeno O (cepas rugosas) o porque no expresan alguno de los dos genes

flagelares. (Curd *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002). Estas cepas no pueden identificarse por serotipificación tradicional o arrojan resultados inexactos ya que este método depende de la expresión o exposición de los antígenos (Wang *et al.*, 2002). Por lo anterior y debido a la dificultad en la interpretación de los resultados, la aplicación de la serotipificación está limitada a los laboratorios de referencia.

Un aspecto epidemiológico relevante respecto a la serotipificación de cepas de *S. enterica* en distintas partes del mundo, es que en los últimos años se han incrementado los reportes de cepas asociadas a brotes que no son serotipificables hasta el nivel de serotipo o serovariedad, que se consideran variantes monofásicas (Moreno *et al.*, 2009). Así, brotes asociados a variantes monofásicas han sido asociados a la contaminación de carne de puerco (Mossong *et al.*, 2007), al consumo de carne de res (Raguenaud *et al.*, 2012; Guillier *et al.*, 2013), salami contaminado (Andreoli *et al.*, 2017) y a la contaminación de agua de irrigación de áreas de cultivo (Cito *et al.*, 2016), entre otros. Variantes monofásicas han sido reportadas tanto en animales de granja (Arnold *et al.*, 2014; Andrés-Barranco *et al.*, 2016) como en animales silvestres (Zottola *et al.*, 2013; Molina *et al.*, 2015), lo que manifiesta la amplia distribución que las variantes monofásicas han adquirido en los últimos años. Algunas de estas variantes monofásicas portan plásmidos que les confieren un fenotipo de multiresistencia a antibióticos (Mourão *et al.*, 2014).

1.3 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosomal, circular y generalmente de tamaño pequeño que se encuentran en muchas especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del DNA cromosómico. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos, a metales, a agentes xenobióticos o a determinantes de virulencia (Gómez *et al.*, 2008). Los plásmidos pueden constituir entre el 1% y >10% del genoma de muchas especies bacterianas. Algunas clases de plásmidos poseen además la propiedad conocida como "replicación relajada", esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación (Cejudo *et al.*, 2010). Suelen

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

existir como moléculas circulares de ADN de doble hebra (dsADN) cerradas covalentemente, conocidas como formas CCC (*Covalently Closed Circular*). Las alteraciones por ruptura de la dsADN dan lugar a las configuraciones plasmídicas abierta circular (formas OC, *Open Circular*) o lineal (formas L) según se afecte una o las dos hebras. Estas tres configuraciones migran a distinta velocidad en los geles de agarosa: la forma CCC más rápidamente que la OC y ésta más rápidamente que la L. Todas ellas se encuentran frecuentemente en una misma célula por lo que normalmente se observan 3 bandas correspondientes al mismo plásmido. Con frecuencia también se detectan dímeros o multímeros de las formas CCC y OC (Pere *et al.*, 2005).

Puede encontrarse más de una copia del mismo plásmido dentro de la célula bacteriana. En general los plásmidos de mayor tamaño se encuentran en una o unas pocas copias, mientras que los más pequeños pueden estar en hasta cien copias por célula (plásmidos multicopia). Como se mencionó anteriormente, aunque el ADN plasmídico no porta información genética esencial para la vida de la bacteria, sí porta genes que le confieren nuevas propiedades fenotípicas y que en algunos casos le son útiles para su adaptación al crecimiento en determinados ambientes (Betancor *et al.*, 2006). Un gran número de características fenotípicas se relacionan con la presencia de plásmidos como la producción de toxinas, metabolismo de hidratos de carbono simples, producción de bacteriocinas, síntesis de enzimas intra o extracelulares o la resistencia a determinados antibióticos (Betancor *et al.*, 2006).

1.3.1 Perfil plasmídico

La identificación de *S. enterica* tanto en muestras clínicas como en muestras de alimentos se hace inicialmente con la inoculación y el cultivo de la muestra en medios selectivos, seguido de la realización de pruebas bioquímicas para la detección del género *Salmonella*; como se mencionó anteriormente, luego de estos ensayos se realizan pruebas de serotipificación mediante el empleo de antisueros, procesos que pueden llegar a tardar varios días. Para identificar los serogrupos y serotipos, se necesitan muchos sueros específicos para cada uno de los serogrupos y sueros específicos para los antígenos flagelares de fase 1 y de fase 2. El tipado de estos antígenos mediante procedimientos de aglutinación con sueros

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

monoespecíficos es el método de referencia, denominado estándar de oro (*Gold Standard*), pero para realizarlo se requieren más de 250 sueros anti-O y anti-H. Sin embargo, este método es incapaz de tipar las cepas rugosas o mucoides.

Dichas técnicas tradicionales han sido complementadas mediante el empleo de ensayos enfocados en la identificación de marcadores moleculares, entre ellos se encuentra el perfil de plásmidos. Desde los años setenta del pasado siglo, junto con la mejora de los métodos de aislamiento de plásmidos, surgió la importancia de investigar las técnicas del contenido total de plásmidos bacterianos como medio de determinar el concepto de clon. La determinación de un número y tamaño de plásmidos en aislamientos bacterianos se denomina análisis de perfil plasmídico (Miljkovic *et al.*, 2008).

Se define como PP al contenido total de plásmidos presente en un microorganismo representado por un patrón de bandas, donde cada banda representa un plásmido. Este PP varía dependiendo de la cantidad y el tamaño de los plásmidos presentes en el microorganismo en cuestión (Gómez *et al.*, 2008). El estudio de la dotación plasmídica es el primer método genotípico de tipificación para el estudio de un brote epidémico por su mediana complejidad y puede realizarse en un laboratorio de investigación epidemiológica. Posee un alto poder de discriminación sobre todo cuando se usa en combinación con otros métodos de tipificación y una misma metodología puede ser aplicada a distintos géneros y especies bacterianas. La aplicación adicional de enzimas de restricción al estudio del ADN plasmídico es útil sobre todo en aquellas cepas con un único plásmido o cuando existan perfiles plasmídicos similares (Merino *et al.*, 1999).

El uso del PP tiene sus ventajas, particularmente el corto tiempo en el cual puede ser realizada. La rapidez combinada con la simplicidad del procedimiento y el equipo básico requerido lo hace adecuado como un procedimiento inicial que puede ser usado en laboratorios que no tienen la capacidad para métodos más complicados. La inherente movilidad de los plásmidos (DNA) sugiere inestabilidad de las características bajo escrutinio. Esta es una limitación, la cual es reconocida en investigaciones epidemiológicas. Algunos estudios consideran que la presencia de un solo e idéntico plásmido es evidencia suficiente para decir que los aislamientos son idénticos y por lo tanto epidemiológicamente relacionados. Otros estudios sugieren que numerosos plásmidos pueden estar presentes y

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

consideran que la presencia de un solo plásmido no es suficiente para representar a una clona. El estudio hecho por Liebana *et al.*, (2001) muestra que el perfil plasmídico (PP) solo, no puede ser suficientemente exacto para identificar clonas. La información genética usada en conjunción con el perfil de resistencia antibiótica, puede ayudar a detectar el surgimiento de nuevas cepas potenciales con variación genética y que pueden expandir esta resistencia antimicrobiana a otras cepas existentes.

En la actualidad existen otras técnicas de tipificación molecular y las indicaciones de mayor utilidad para el uso del estudio de los perfiles plasmídicos serían establecer la relación epidemiológica entre diferentes plásmidos obtenidos de la misma o diferente especie bacteriana y ayudar a la localización de otros elementos extracromosómicos (transposones, integrones). La aplicación adicional de enzimas de restricción al estudio del ADN plasmídico es útil sobre todo en aquellas cepas con un único plásmido o cuando existan perfiles plasmídicos similares. Para análisis de plásmidos primero es necesario partir de un cultivo bacteriano adecuado, centrifugar el cultivo, aplicar un método de extracción y purificar el ADN plasmídico obtenido. Posteriormente se puede medir el tamaño de los plásmidos y establecer las relaciones epidemiológicas. Existen muchos métodos para aislar ADN puro de plásmidos a partir de lisados celulares bacterianos, pero el método más popular para extraer y purificar el ADN plasmídico es el de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly en 1979. La cantidad y calidad de ADN plasmídico final obtenido vienen determinadas por diferentes factores como el número de copias, el tamaño del ADN heterólogo y la cepa hospedadora. Los plásmidos de alto peso molecular o con grandes secuencias en su región variable suelen estar en bajo número de copias y el rendimiento de su extracción puede optimizarse modificando el volumen, el medio de cultivo y la técnica de lisis. Los medios de cultivo suelen ser líquidos y con suplemento antibiótico para lograr amplificar las células que portan el plásmido, siendo el más utilizado el medio Luria Bertani (LB). La obtención de perfiles plasmídicos idénticos o muy similares en diferentes aislados debe ser interpretada con precaución ya que no siempre refleja una relación epidemiológica entre los mismos. Hay que tener presente que especies bacterianas próximas evolutivamente adquieren con frecuencia plásmidos similares y que determinados patrones plasmídicos

pueden ser muy estables en determinadas especies como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. (Suárez, 2015).

El análisis de perfil de plásmido es útil para determinar la cepa epidémica en brotes causados por múltiples especies de enterobacterias de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Serratia* (Wachsmuth, 1986). La aplicación de análisis de perfil de plásmido confirmó que la infección humana normal era provocada por el consumo de alimento de origen animal. Se han obtenido plásmidos de resistencia idéntica procedentes de serovares de *S. enterica* aislados de seres humanos y animales en el caso de cepas de los serotipos Typhimurium, Copenhagen, Newport y Dublin, de diferentes zonas geográficas de los Estados Unidos (Miljkovic *et al.*, 2008).

1.4 Genes asociados con la virulencia en *S. enterica* y su relación con plásmidos

El análisis experimental y epidemiológico de genes de virulencia en *S. enterica* ha sido realizado principalmente en el serotipo Typhimurium, principalmente debido a que es el serotipo de mayor distribución mundial que todavía en fechas recientes es uno de los principales causantes de brotes en todo el mundo. Se ha documentado que los genes que codifican para los factores de virulencia más relevantes se encuentran distribuidos en las “Islas de Patogenicidad de *Salmonella*” (SPIs, por sus siglas en inglés: *Salmonella Pathogenicity Islands*), en un plásmido de virulencia (pSLT), o en dispersos en el cromosoma (Fàbrega y Vila, 2013). La mayoría de los genes de virulencia se encuentran en las SPIs, de las que se han descrito 5 (SPI-1 a SPI-5) portando dichos componentes genéticos. Las SPIs son grandes casetes de genes dentro del cromosoma de *S. enterica* que codifican determinantes responsables de establecer interacciones específicas con el huésped y son necesarios para la virulencia bacteriana en un animal dado como otras islas de patogenicidad. A la fecha se han descrito más de 20 SPIs (Sabbagh *et al.*, 2010).

La SPI-1 en *S. enterica* serotipo Typhimurium codifica para diferentes proteínas relacionadas con el proceso de invasión de las células epiteliales del hospedero, las cuales se encargan de remodelar el citoesqueleto para promover la internalización del patógeno y son denominadas proteínas efectoras (Fàbrega y Vila, 2013). No obstante, los genes de algunas de estas proteínas se encuentran en otras regiones del cromosoma bacteriano. Evidencia

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

reciente sugiere que los genes que se encuentran en la SPI-2 son importantes para que la bacteria sobreviva y se replique dentro de las células epiteliales y los macrófagos del hospedero, dentro de una estructura denominada “Vacuolas que contienen a *Salmonella*” (SCV, por sus siglas en inglés, *Salmonella-containing vacuoles*). De las otras tres SPIs relacionadas con genes de patogenicidad (SPI-3, 4 y 5) todavía no se sabe con certeza su participación en el proceso de infección (Fàbrega, Vila, 2013).

Algunos serotipos de *Salmonella* contienen plásmidos con genes asociados a la virulencia (*spv*). La presencia de estos plásmidos aumenta la virulencia en ratones infectados experimentalmente, aunque en humanos aún no se ha establecido su papel durante la infección. La mayoría de los estudios realizados a la fecha se han efectuado en modelos experimentales, en los cuales las cepas de *Salmonella* producen septicemia en ratones, pero fallan en producir gastroenteritis. Además, son muy pocos los trabajos donde se ha investigado si la presencia de estos plásmidos y/o de los genes codificados en los mismos guardan relación con la presencia de diarrea en humanos (Concha *et al.*, 2004).

Son pocos los serotipos de *S. enterica* que portan un plásmido de virulencia específico de serotipo. Algunos de los serotipos comúnmente asociados a brotes en humanos o a infección de animales de relevancia pecuaria, como Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis y Dublin, comúnmente portan dicho tipo de plásmido. La característica que hace diferente al plásmido entre serotipos es particularmente el tamaño, el cual varía de 50 a 95 kb, siendo este último tamaño el que posee el del serotipo Typhimurium, que se conoce como pSLT (Fàbrega y Vila, 2013). Otros tamaños de dicho plásmido son de 80 Kb para *S. Dublin* y de 50 a 110 kbp para *S. Choleraesuis*. Aunque difieren en tamaño, todos tienen una región altamente conservada de 8 kbp involucrada con la virulencia (Marcus *et al.*, 2000). Independientemente del tamaño, los plásmidos de los diferentes serotipos conservan una región de 8 kb que contiene cinco genes, denominada el locus *spvRABCD* (Fig. 3), el cual puede restaurar la virulencia en cepas curadas de plásmidos en modelos de ratón. Una función principal del operón *spvRABCD* es potenciar la diseminación sistémica del patógeno (Heithoff *et al.*, 2008). De los componentes de dicho locus, el gen *spvR* codifica para un factor de transcripción responsable de activar la transcripción del locus *spvRABCD* (Fig. 3). La proteína *spvA* se encuentra solo en la membrana exterior de la bacteria y *spvD* es una

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

proteína exportada al exterior, de las cuales se desconoce con certeza su papel en el proceso infeccioso. *spvB* es una proteína citotóxica asociada a la sobrevivencia intracelular de la bacteria, mientras que *spvC* se ha asociado a la respuesta proinflamatoria del hospedero (Fàbrega y Vila, 2013). Otros plásmidos menos comunes asociados a virulencia se han descrito en distintos serotipos de *S. enterica*, portando genes de resistencia a antibióticos y de tamaño considerablemente más grande que el plásmido que porta el locus *spvRABCD*.

En un estudio realizado por Matsui *et al.* (2001), se logró determinar que los genes *spvB* y *spvC* pueden remplazar la virulencia del plásmido completo en el serotipo Typhimurium después de ser inoculados subcutáneamente en ratones. La proteína *spvB* es una ADP ribosiltransferasa y parece ser la principal responsable de la virulencia del locus *spv* ya que se ha visto que enzimas ADP ribosiltransferasas (toxinas de cólera, difteria, etc.,) son los factores de virulencia clave para una gran variedad de bacterias patógenas extracelulares (Marchelletta *et al.*, 2015).

El locus *spv* está fuertemente asociado con cepas que causan bacteremia no tifoidea, pero no están presentes en cepas de fiebre tifoidea. La región *spv* contiene tres genes necesarios para el fenotipo de virulencia en ratones: el regulador transcripcional positivo *SPVR* y dos genes estructurales *SPVB* y *SPVC*. *SPVB* impide la polimerización de actina por ADP-ribosilación de monómeros de actina, mientras que *SPVC* tiene actividad liasa fosfotreonina y se ha demostrado que inhibe la señalización de la quinasa MAP (*Mitogen-Activated Protein*) (Guiney y Fierer, 2011).

Otros factores de virulencia que no están asociados a plásmidos o SPIs son las adhesinas, que se han asociado con adhesión a células epiteliales, acumulación de fluido intestinal, persistencia intestinal en modelos de ratón y formación de biofilm. Las proteínas de flagelo, estructura relevante en la movilidad y la quimiotaxis de *S. enterica*, son codificadas en el cromosoma y también son consideradas factores de patogenicidad y virulencia (Fàbrega y Vila, 2013).

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

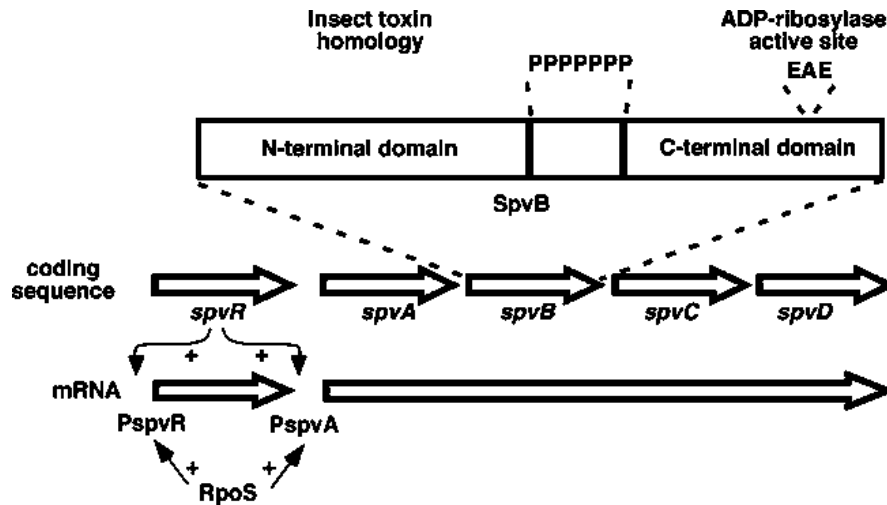


Figura 3. Mapa de la región *spv* que se encuentra en los plásmidos de virulencia en cepas de la subespecie 1. El gen *spvR* se transcribe por separado de los genes *spvABCD*. *spvR* activa la transcripción en ambos promotores de acuerdo con el factor sigma RpoS. El dibujo no está a escala. (Guiney y Fierer, 2011).

1.5 Otros plásmidos descritos en *Salmonella enterica*.

A lo largo de diversos estudios epidemiológicos realizados en los últimos años en distintas partes del mundo, se han ido describiendo plásmidos específicos de algunas cepas, asociados a brotes. Por ejemplo, recientemente se ha reportado que en cepas del serotipo Typhimurium y sus variantes monofásicas (4,5,12:i:- and 4,12:i:-) relacionadas con brotes, la resistencia a colistina, un antibiótico tipo polimixina, está codificada en genes presentes en plásmidos (Litrup *et al.*, 2017). En cepas del mismo serotipo aisladas de un brote en Kenia se encontraron dos plásmidos, uno del tipo pSLBT IncFII, asociado a la mutiresistencia a antibióticos y una variante del plásmido IncHI2 a la que se le denominó pKST313 (Kariuki *et al.*, 2015). Este último plásmido posee un tamaño aproximado de 300-kb y contiene tanto genes de resistencia a metales pesados (mercurio, arsénico, cobre), como genes de resistencia a antibióticos, particularmente del tipo β -lactamas. Evidencia experimental reciente empleando *S. Typhimurium* muestra que variantes de plásmidos tipo IncHI1 ayudan a la supervivencia del patógeno fuera del hospedero (Paytubi *et al.*, 2014). Las células que portando dichos plásmidos regulan la expresión de genes de manera diferencial a las que no lo portan, induciendo la transcripción de genes asociados a la incorporación de fosfato, a la resistencia a antibióticos y de proteínas asociadas a choque térmico, por un mecanismo

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

desconocido. Por otra parte, en el caso del serotipo Infantis se ha documentado la presencia de un megaplásmido de aproximadamente 280 kb el cual porta genes de resistencia a antibióticos y les confiere a las cepas resistencia a mercurio y estrés oxidativo (Aviv *et al.*, 2014). Además de la resistencia a factores de estrés, el plásmido incrementa la capacidad de formación de biofilm y la adhesión e invasión de células hospedadoras de aves y mamíferos. Dicho plásmido se encuentra presente en una población emergente de *S. Infantis* en Israel, por lo que se ha propuesto que dicha población puede reemplazar a las otras poblaciones de dicho serotipo en el área (Aviv *et al.*, 2014).

Los perfiles de plásmidos han sido utilizados como herramienta epidemiológica, en conjunto con otros marcadores genético-moleculares en el análisis de cepas de *S. enterica* provenientes de brotes y de alimentos. En el caso de cepas del serotipo Dublin obtenidas de ganado vacuno empleado para la producción de leche y carne, se han encontrado perfiles de plásmidos restringidos a la presencia o ausencia de cinco de estos elementos genéticos, relacionados con la resistencia múltiple a antibióticos y con virulencia (Davis *et al.*, 2007). Otro estudio encontró la presencia de 14 plásmidos distintos en una colección en cepas del mismo serotipo provenientes de muestras clínicas humanas y de distintas muestras de bovino (Vilela *et al.*, 2017); de manera interesante, la presencia de plásmidos en las cepas no se relacionó con el perfil de resistencia a antibióticos. En cepas del serotipo Heidelberg obtenidas en ambiente o muestras relacionadas con pavos, se ha observado la presencia de distintos perfiles plasmídicos y algunos de los plásmidos encontrados relacionados con la multiresistencia a antibióticos son de 100 kb o mayores (Kaldhone *et al.*, 2008). En México son escasos los estudios en los cuales se hacen perfiles de plásmidos como herramienta epidemiológica o de tipificación. En un análisis de cepas del serotipo Typhimurium provenientes de cinco estados de la República Mexicana se encontró que solo cepas de la secuencia tipo ST19 portaban el plásmido de virulencia pSTV (Wiesner *et al.*, 2009). El mismo grupo de trabajo mostró posteriormente que la presencia de plásmidos tipo IncA/C solo se encuentran presentes en cepas de la secuencia tipo ST213 y que los tipos de plásmidos presentes en dichas cepas correlacionan con su procedencia geográfica (Wiesner *et al.*, 2011). Esto es, las cepas que portan los plásmidos IncA/C Tipo I provienen de Yucatán, las que portan los plásmidos Tipo II provienen de Sonora y las que portan ambos

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

tipos provienen del centro, de los estados de San Luis Potosí y Michoacán (Wiesner *et al.*, 2011). Un estudio reciente muestra que una cepa clínica de la secuencia tipo ST213 del serotipo Typhimurium proveniente de México porta plásmidos tipo IncA/C, IncFIIA, ColE1, pero carece del plásmido de virulencia pSTV (Wiesner *et al.*, 2016). Hasta donde se consultó, estos tres son los únicos estudios en los que se caracterizan plásmidos en cepas de *S. enterica* en México.

Otro aspecto importante de resaltar por el interés de este trabajo, es el hecho de que en cepas monofásicas prácticamente no hay estudios sobre perfiles de plásmidos a nivel global, destacándose el trabajo de la Torre *et al.*, (2003) en el que se establece el perfil plasmídico de cepas monofásicas 4,5,12:i:- aisladas de cerdos enfermos y sanos en España, encontrándose 19 patrones, uno de los cuales coincide plenamente con el grupo formado mediante el análisis PFGE.

2. JUSTIFICACIÓN

Dentro de los principales patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales, se encuentra *Salmonella enterica*, que es responsable de causar aproximadamente cada año 550 millones de infecciones a nivel mundial, de las cuales 220 millones son niños menores de 5 años. *Salmonella enterica* causa infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede ocasionar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunosuprimidos.

En México las estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella enterica* tienen pocos años reportándose con base en el registro de los casos de atención en centros de salud públicos. No obstante, con frecuencia el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero, por lo que es de esperar que las estadísticas nacionales sean subestimaciones de los cuadros que se presentan anualmente. La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos, clínicos y el sector veterinario, así como la falta de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar no solo las principales serovariedades de *Salmonella enterica* en las diferentes clases de alimentos y el riesgo que cada una de esta entraña para la salud de los seres humanos, sino también contar con información referente a los determinantes genéticos que puedan estar influyendo en la multiresistencia a antibióticos y la virulencia de las cepas circulantes. Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella enterica* (Zaidi *et al.*, 2006).

En el estado de Michoacán todavía son escasos los estudios de tipificación genético molecular de *S. enterica*, por lo que nuestro grupo de trabajo ha iniciado este tipo de estudios en aislados provenientes de alimentos obtenidos por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán (LESPM). Los resultados obtenidos incluyen determinación de serotipo (Regalado, 2011) elementos repetitivos (Vázquez, 2012), secuencia tipo (Inocencio, 2013), perfiles de virulencia (Maldonado, 2015) y búsqueda de genes *sul*, *tet* e integrones (Hernández, 2015). Todos los trabajos mencionados tienen la finalidad de caracterizar genético-molecularmente a las cepas obtenidas utilizando diversas

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

técnicas que permitan establecer las relaciones entre éstos, así como patrones de dispersión y fuentes de contaminación, todos estos aspectos indispensables en estudios epidemiológicos.

En este trabajo se estudiaron cepas que no fueron serotificables, denominados también como variantes monofásicas, con la finalidad de obtener el perfil plasmídico de dichas cepas para determinar si puede ser usado como marcador epidemiológico y ver si existe relación entre los diferentes serogrupos para un posible estudio posterior en el que ayude a estudios de serotipificación ya que es un método genotípico de mediana complejidad. El perfil plasmídico constituye un primer paso en la caracterización de estos elementos extracromosomales para conocer en mayor detalle su influencia en perfiles de resistencia a antibióticos y sus patrones de virulencia. Además, debido a la posibilidad de transmisión horizontal de muchos de estos plásmidos, la generación de información sobre los plásmidos de cepas provenientes de alimentos en Michoacán permitirá establecer patrones de diseminación a mediano y largo plazo de dichos elementos genéticos.

Por lo anterior, es de esperar que la información genético molecular generada relacionada con el perfil de plásmidos ayude a optimizar los sistemas de vigilancia epidemiológica para establecer estrategias de prevención y control de las enfermedades ocasionadas por *S. enterica* al ingerir alimentos contaminados en Michoacán.

3. HIPÓTESIS

Las cepas no serotificables de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos del estado de Michoacán, presentan perfiles plasmídicos diversos que se relacionan con el área geográfica de procedencia y la presencia del gen de virulencia *spvC*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener el perfil plasmídico de cepas de *Salmonella enterica* no serotificables y establecer la relación entre dichos perfiles con la procedencia geográfica y la presencia del gen de virulencia *spvC*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Obtener el perfil de plásmidos en las cepas de estudio.
- ii. Detectar el gen de virulencia *spvC* de las cepas de estudio.
- iii. Generar un patrón de agrupamiento con base en los perfiles plasmídicos en las cepas de estudio.
- iv. Establecer la relación entre el perfil plasmídico y gen de virulencia *spvC* en las cepas de estudio.
- v. Evaluar la relación entre el perfil plasmídico obtenido y el área geográfica de procedencia de las cepas de estudio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Se analizaron 57 cepas de *Salmonella enterica* tipificadas hasta nivel de serogrupo por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán (LESPM), durante los años 2008-2013. (Tabla 3), y que fueron aisladas de alimentos del Estado de Michoacán.

Tabla 3. Cepas analizadas

Aislado	Serotipo	Muestra	Municipio
010	Serogrupo B	Cárnico crudo	José Sixto Verduzco
013	Serogrupo B	Cárnico crudo	Uruapan
032	Serogrupo B	Embutido	Pátzcuaro
036	Serogrupo B	Embutido	Uruapan
038	Serogrupo B	Cárnico crudo	Uruapan
047	Serogrupo B	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
048	Serogrupo C1	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
049	35	Cárnico crudo	Uruapan
067	Serogrupo B	Lácteo	Zacapu
068	Serogrupo D Monofásica	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
070	Serogrupo E1	Embutido	Lázaro Cárdenas
075	Serogrupo B	Cárnico crudo	Zamora
083	Serogrupo B	Embutido	Uruapan
094	Serogrupo C1	Embutido	-
097	Serogrupo B	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
099	Serogrupo C1	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
100	Serogrupo E1 Monofásica	Embutido	Zitácuaro
103	Serogrupo B	Embutido	Huetamo
105	Serogrupo C1	Lácteo	Huetamo
107	Salmonella I	Embutido	Lázaro Cárdenas
113	Serogrupo B	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
125	Serogrupo B	Embutido	Uruapan
141	Serogrupo E4	Lácteo	Tepalcatepec
153	Serogrupo E1	Embutido	Morelia
157	Serogrupo B	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
160	Serogrupo E1	Cárnico crudo	Yurécuaro
167	Serogrupo B	Embutido	Zamora
169	Serogrupo E4	Cárnico crudo	Huetamo
170	Serogrupo E4	Lácteo	Huetamo
178	Serogrupo B	Cárnico crudo	Pátzcuaro
180	Serogrupo C1	Cárnico crudo	Morelia
181	Serogrupo E1	Cárnico crudo	Uruapan

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

191	Serogrupo C2 Monofásica	Embutido	José Sixto Verduzco
193	Serogrupo B	Embutido	Uruapan
200	Serogrupo B	Cárnico crudo	Morelia
201	Serogrupo D Monofásica	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
202	Serogrupo D Monofásica	Cárnico crudo	Lázaro Cárdenas
213	Serogrupo B	Cárnico crudo	Zitácuaro
214	Serogrupo B	Cárnico crudo	Ocampo
223	Serogrupo B Monofásica	Cárnico crudo	Purépero
224	Serogrupo B Monofásica	Embutido	Zamora
227	Serogrupo B	Cárnico crudo	Múgica
228	Serogrupo E4	Cárnico crudo	Múgica
233	Serogrupo B	Cárnico crudo	Tuxpan
236	Serogrupo B	Cárnico crudo	Hidalgo
239	Serogrupo E4	Pasta	Lázaro Cárdenas
243	Serogrupo E1	Lácteo	Zitácuaro
252	Serogrupo B	Embutido	Lázaro Cárdenas
258	Serogrupo C1	Embutido	Gabriel Zamora
264	Serogrupo C1	Cárnico crudo	Morelia
272	Serogrupo D	Cárnico crudo	La Piedad
276	Serogrupo B	Embutido	Zitácuaro
283	Serogrupo B	Embutido	Hidalgo
290	Serogrupo B	Cárnico crudo	Pátzcuaro
327	Serogrupo C1	Cárnico crudo	Morelia
328	Serogrupo B	Cárnico crudo	La Piedad
335	Serogrupo C1	Embutido	Zitácuaro

De los 57 aislados de *Salmonella enterica* estudiados, 28 corresponden al serogrupo B, 9 al serogrupo C1, E1 y E4 con 5 aislados cada uno, 3 al serogrupo D Monofásica, 2 al serogrupo B Monofásica y con 1 aislado los serogrupos C2 Monofásica, D, E1 Monofásica, 35 y *Salmonella* I (Fig. 4).

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

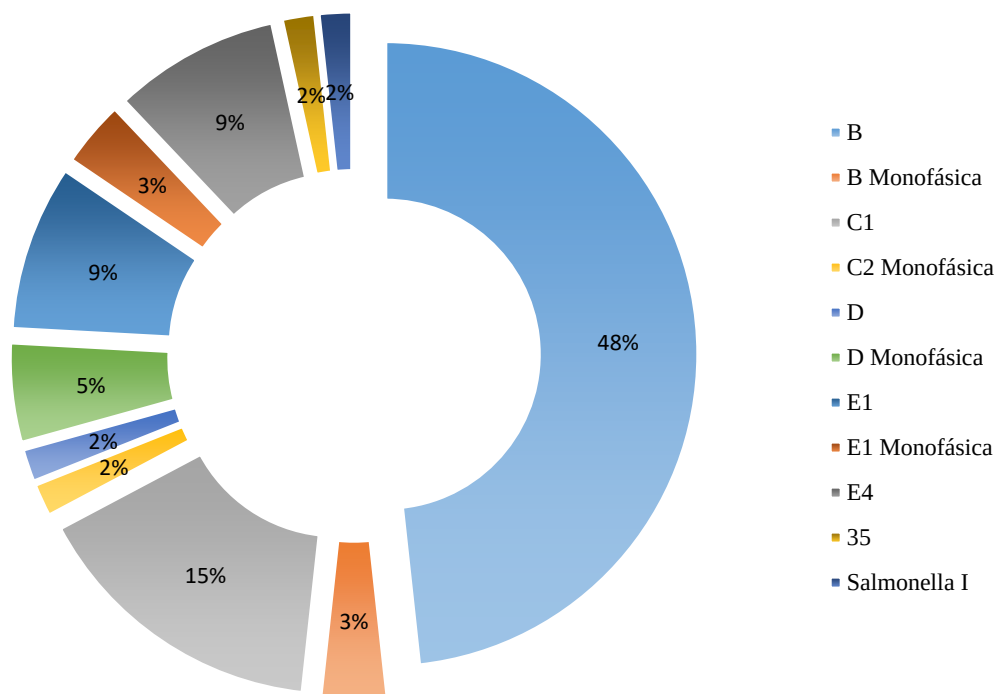


Figura 4. Frecuencia de serogrupos de los aislados de *Salmonella enterica*.

Las cepas fueron aisladas de cárnicos crudos, embutidos, lácteos y pastas (Fig. 5).

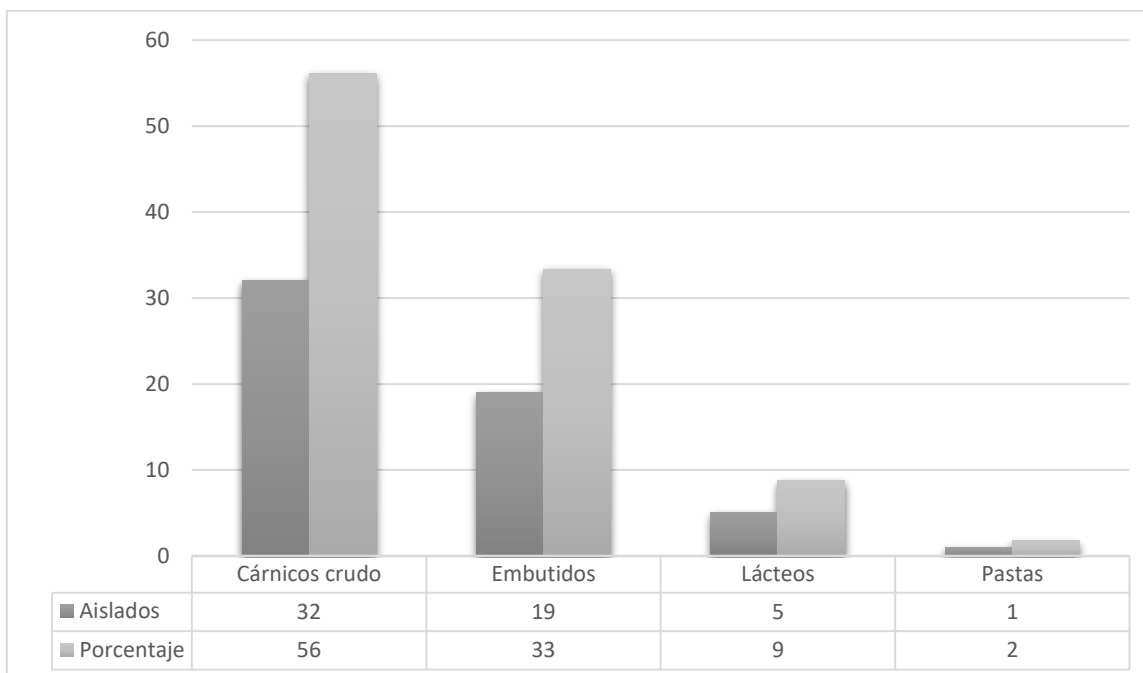


Figura 5. Cantidad y porcentaje de muestras obtenidas en productos cárnicos, embutidos, lácteos y pastas.

5.2 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo de lisis alcalina de Birnboim-Doly (Sambrook *et al.*, 2001): en un microtubo de 1.5 mL se agregó 1 mL de caldo LB (Luria Bertani) previamente inoculado por el aislado en estudio, incubado a 37°C por 12 h no excediendo las 15 h y en agitación continua a 150 rpm. Se centrifugó durante 1 min a 12000 x *g* para empaquetar a las células y después se desechó el sobrenadante, para repetir este procedimiento dos veces más, se agregaron 150 µL de una solución isotónica (Glucosa 50 mM opcional, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, RNAasa A 10 µg/mL). Posteriormente se homogeneizó en vórtex y se incubó en hielo por 5 min. A continuación, se adicionaron 300 µL de solución de desnaturalización o lisis (NaOH 200 mM y SDS 1%) mezclando por inversión e incubando en hielo por 5 min. En seguida se adicionaron 300 µL de solución de neutralización (Acetato de Potasio, Ácido Acético Glacial y agua bidestilada pH 4.8, 1:1:1 v/v) recién preparada y a temperatura ambiente, mezclando en vórtex 2 s a máxima velocidad e incubando en hielo de 7-15 min. Luego se adicionó un volumen de 300 µL de cloroformo mezclando en vórtex hasta un cambio de coloración, centrifugando 10 min a 13000 x *g* y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El ADN obtenido se precipitó con un volumen 1:1 de isopropanol frío agitando por inversión, incubando 15 min a -20°C y centrifugando 15 min a 12000 x *g*, el sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó una vez con 200 µL de etanol 70% dejándose secar a temperatura ambiente para finalmente ser resuspendido en 20 µL de agua inyectable. La integridad del ADN obtenido se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 2001). El ADN extraído se guardó a -20°C hasta su utilización. Las imágenes de los geles se obtuvieron empleando un fotodocumentador CHEMI-DOC Molecular Viewer (Bio-Rad, USA).

5.3 Amplificación por PCR del gen de virulencia *spvC*

Las reacciones de PCR para amplificar el fragmento de 467 pb del gen *spvC* contenían 1µM de los iniciadores RE (SV7-R: ACT CCT TGC ACA ACC AAA TGC GGA; SV7-F: TGT CTT CTG CAT TTC GCC ACC) (Huehn *et al.*, 2010), 0.2 mM de mezcla de d-desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Invitrogen, USA), 10 mM de Tris-

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

HCl (pH 8.2), 1.5 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen, USA) y de 30 a 100 ng de ADN en un volumen total de 15 µl.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Corbett Palm Cyclyer CG-196 utilizando el programa descrito por Borges *et al.* (2013): desnaturalización inicial a 95°C por 1 min, seguida de 30 ciclos de 93°C/1 min, 42°C/1 min y 72°C/2 min, terminando con una extensión final a 72°C/4 min. Estas condiciones fueron modificadas para optimizar la amplificación del producto buscado. Todos los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 2001) y las imágenes de los geles fueron capturadas con el sistema ChemiDOC (BioRad, USA).

5.4 Construcción de dendrograma

Las imágenes de los geles con los perfiles plasmídicos fueron analizadas con el Software GelJ (Domínguez *et al.*, 2017), para detectar el peso de las bandas y construir con estos datos un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA.

5.5 Tratamiento estadístico

Para determinar la asociación entre el perfil de plásmidos con serogrupo, alimento donde se aisló la muestra y el área geográfica de procedencia, se utilizó la prueba estadística de Chi Cuadrada de Pearson, considerando como asociación positiva cuando el valor de *p* era igual o menor a 0.05 utilizando el programa estadístico informático SPSS versión 23.0.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de los perfiles plasmídicos de las cepas de estudio

De las 57 cepas de *Salmonella enterica* utilizadas en este estudio, 34 presentaron de 1 a 7 plásmidos con tamaños que van de 900 pb a 12,000 pb; además, todas las cepas presentaron de una a dos bandas de un tamaño mayor a 12,000 pb a excepción de la cepa 328 (Fig. 6).

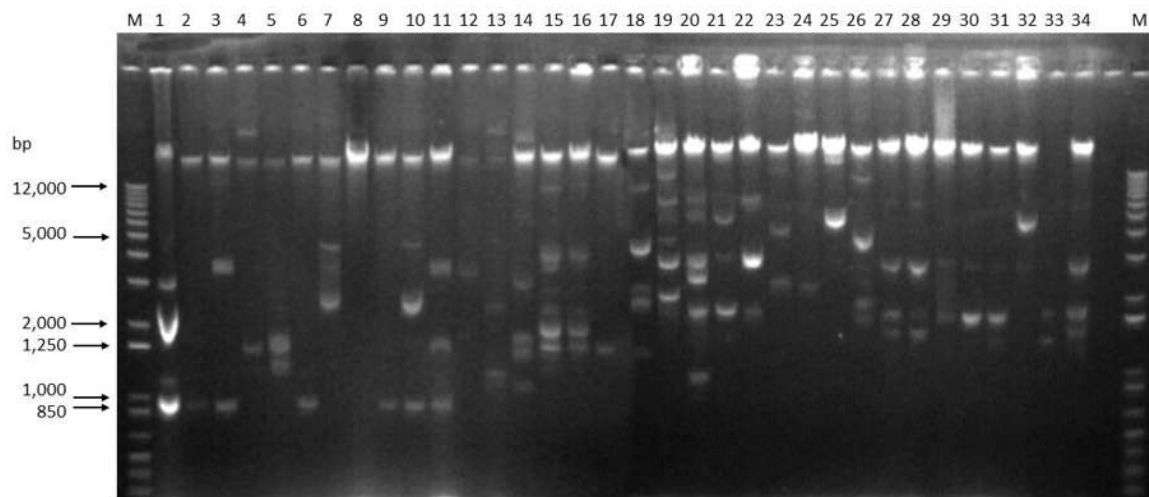


Figura 6. Perfil plasmídico de las cepas de *Salmonella enterica* que presentaron de 1 a 7 bandas. Gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio que muestra: Carriles: M, marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (Invitrogen, USA).; carril:cepa; 1: 010, 2: 013, 3: 032, 4: 036, 5: 038, 6: 047, 7: 068, 8: 070, 9: 075, 10: 083, 11: 097, 12: 103, 13: 125, 14: 141, 15: 160, 16: 170, 17: 180, 18: 191, 19: 193, 20: 214, 21: 223, 22: 224, 23: 227, 24: 228, 25: 239, 26: 243, 27: 258, 28: 264, 29: 272, 30: 276, 31: 283, 32: 290, 33: 328, 34: 335.

Se obtuvieron 23 perfiles plasmídicos diferentes los cuales contenían entre 2 y 7 plásmidos con tamaños en un intervalo de 850 pb a 12,000 pb (Tabla 4). Se presentaron 12 perfiles plasmídicos únicos y el resto estuvieron presentes en más de una cepa.

Las cepas analizadas mostraron 23 perfiles plasmídicos diferentes, que fueron enumerados del I al XXIII (Tabla 4). Los perfiles I, IX y XI presentaron 3 cepas cada uno, los perfiles XII a XXIII presentaron una cepa cada uno y el resto de perfiles presentaron dos cepas cada uno.

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

Tabla 4. Perfil plasmídico expresado por las cepas analizadas.

Perfil plasmídico	Cepas	Plásmidos (pb)	Serogrupo
I	013, 047, 075	16151, 779	B, B, B
II	032, 097	16151, 4317, 2666, 779	B, B
III	036, 180	22463, 15450, 1487	B, C1
IV	038, 328	15063, 1636, 1230	B, B
V	068, 083	15450, 5390, 2734, 774	D Monofásica, B
VI	160, 170	16566, 11109, 4901, 3225, 2550, 1881, 1155	E1, E4
VII	223, 272	20345, 5097, 2625, 1241	B Monofásica, D
VIII	227, 228	18912, 4067, 1812	B, E4
IX	258, 264, 335	19795, 2310, 11,86, 985	C1, C1, C1
X	264, 283	21296, 2178, 985	C1, B
XI	272, 276, 283	19615, 2415, 1123	D, B, B
XII	010	18105, 3414, 1941, 1038, 779	B
XIII	070	16151	E1
XIV	103	15847, 4078	B
XV	125	22463, 16151, 2666, 1147	B
XVI	141	16566, 3371, 1754, 1487, 997	E4
XVII	191	18741, 8960, 2971, 1372, 822	C2 Monofásica
XVIII	193	20345, 10800, 7006, 3627, 2310, 1441	B
XIX	214	20345, 7254, 5455, 2397, 1889, 1213, 681	B
XX	224	19615, 7067, 2415, 1227	B Monofásica
XXI	239	21102, 4607	E4
XXII	243	18235, 10515, 3319, 2210, 1812, 1355, 1100	E1
XXIII	290	18912, 4493	B

Las cepas que presentaron el perfil VIII procedían del mismo municipio (Múgica, Nueva Italia), pero correspondían a diferentes serogrupos. Las cepas con los perfiles II, IV, IX y XI pertenecen al mismo serogrupo, pero diferente ubicación geográfica a excepción del perfil XI en el que solo dos de tres cepas fueron del mismo serogrupo.

6.2 Relación genética entre las cepas en estudio

Para establecer las relaciones genéticas entre las cepas analizadas se construyó un dendrograma con los resultados de los patrones plasmídicos (Fig. 7). El árbol muestra 21 grupos a un corte de 80% de similitud y 34 genotipos a un corte de 95% de similitud, lo que indica que el método puede diferenciar perfectamente entre las cepas que presentaron plásmidos a pesar de pertenecer a diferente serogrupo.

6.3 Asociación del Perfil Plasmídico con diferentes variables epidemiológicas.

Para determinar si existía una asociación entre los Perfiles Plasmídicos con el serogrupo, sitio de aislamiento y el alimento de procedencia, se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba Chi cuadrada de Pearson. De acuerdo al análisis estadístico, no hubo correlación alguna entre las cepas que presentaron o no plásmidos, ($p = 0.885$), tampoco hubo correlación entre el perfil plasmídico con el área geográfica de aislamiento ($p = 0.224$), ni con el alimento ($p = 0.085$).

6.4 Relación del perfil de plásmidos y antibiograma.

Con los datos obtenidos por nuestro equipo de trabajo en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, se hizo una relación de los perfiles de plásmidos con el antibiograma el cual no dio relación alguna, en la Tabla 5 se puede observar el acomodo de acuerdo a los PP y el alimento. La resistencia que más predominó entre las cepas fue STX (trimetoprim/sulfametoxazol).

6.5 Gen de virulencia

Se determinó la presencia de un gen asociado a virulencia en las 57 cepas de estudio, amplificando por PCR un fragmento del gen *spvC*, los resultados revelaron que ninguna de las cepas presentaba el gen buscado.

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

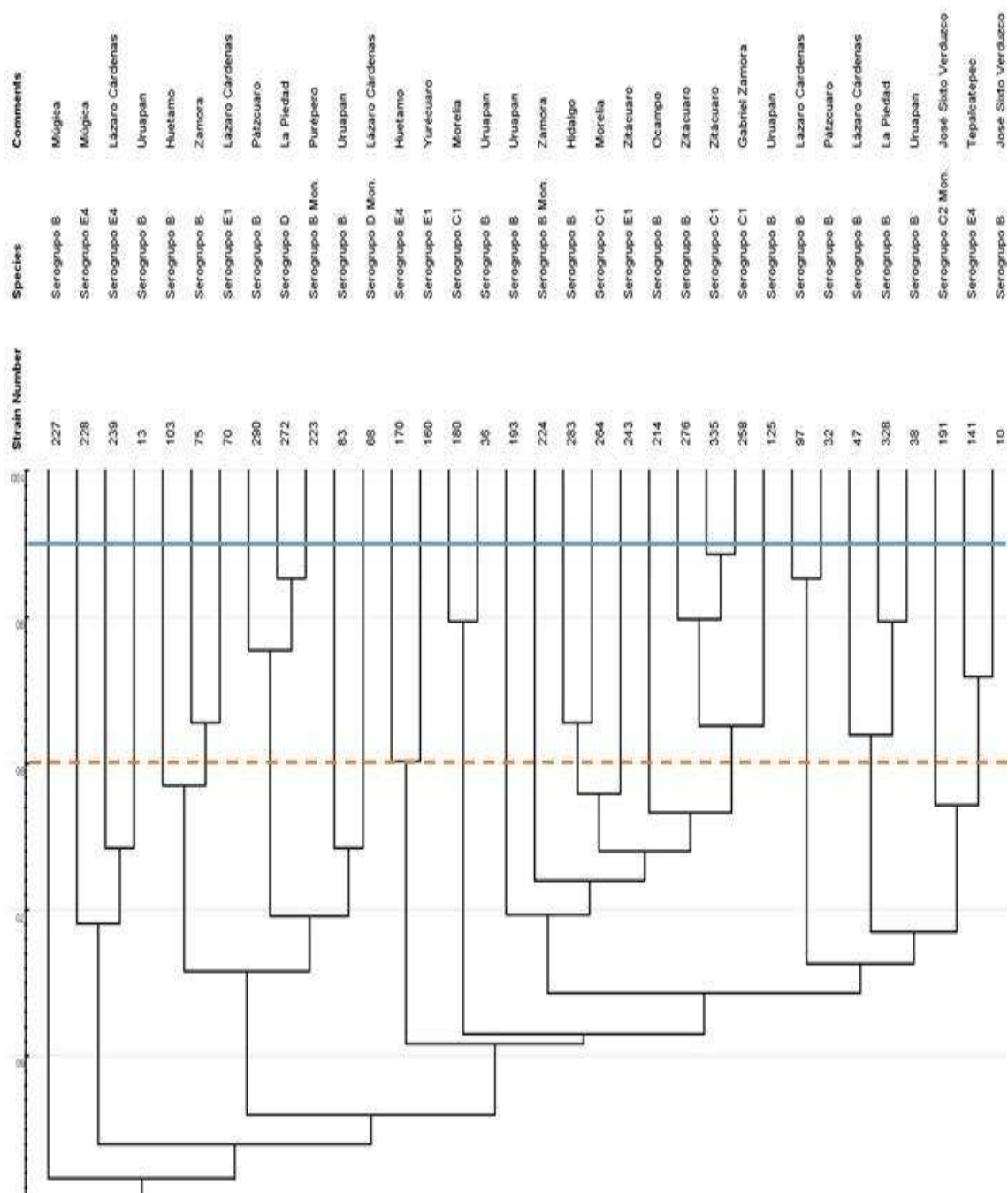


Figura 7. Dendrograma de relación genética en base a los plásmidos obtenidos en las cepas de estudio. La línea punteada roja representa un corte al 80% de similitud y la línea azul representa un corte a 95% de similitud, en donde solo se observan 23 genotipos.

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

Tabla 5. Relación del PP con el alimento de procedencia y la resistencia a antibióticos de cada cepa.

Perfil plasmídico	Cepas	Serogrupo	Alimento	Antibiograma (Resistencia)
I	013, 047, 075	B, B, B	CC, CC, CC	AMP STX
II	032, 097	B, B	E, CC	CB
III	036, 180	B, C1	E, CC	AK
IV	038, 328	B, B	CC, CC	CIP, MXF
V	068, 083	D Monofásica, B	CC, E	AM, CB, CL, GE
VI	160, 170	E1, E4	CC, L	Sin datos
VII	223, 272	B Monofásica, D	L, CC	Sin resistencia
VIII	227, 228	B, E4	CC, CC	Sin datos
IX	258, 264, 335	C1, C1, CI	E, CC, E	AMP, CIP, MXF, STX
X	264, 283	C1, B	CC, E	Sin resistencia
XI	272, 276, 283	D, B, B	CC, E, E	Sin resistencia
XII	010	B	CC	Sin resistencia
XIII	070	E1	E	Sin resistencia
XIV	103	B	E	CB
XV	125	B	E	AMP, CB, CLO, STX
XVI	141	E4	L	Sin datos
XVII	191	C2 Monofásica	E	Sin datos
XVIII	193	B	E	Sin datos
XIX	214	B	CC	Sin datos
XX	224	B Monofásica	E	Sin datos
XXI	239	E4	P	Sin datos
XXII	243	E1	L	FEP, TZP
XXIII	290	B	CC	Sin resistencia

Clave: E: Embutidos, CC: Cárnicos crudos, L: Productos Lácteos, P: Pastas; AK- amikacina, AM- ampicilina, AMP- ampicilina + sulbactam, CB- carbenicilina, CIP- ciprofloxacino, CL- cefalexina, CLO- cloranfenicol, CRO- ceftriaxone, CTX- cefotaxime, FEP- cefapime, GE- gentamicina, MXF- maxifloxacino, PEF- pefloxacina, STX- trimetoprim/sulfametoxazol, TZP- piperacilina + tazobactam

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

6.6 Distribución geográfica de los perfiles plasmídicos en el Estado de Michoacán.

Se ubicó cada perfil plasmídico en el mapa del estado de Michoacán de acuerdo al lugar de procedencia de cada una de las cepas analizadas (Fig. 8). El municipio de Uruapan posee la mayor diversidad con un total de 6 perfiles plasmídicos seguido del municipio de Lázaro Cárdenas con un total de 5 perfiles plasmídicos, Morelia y Zitácuaro tan solo presentaron 3 perfiles cada uno, el resto de los municipios presentaron 1 o 2 perfiles plasmídicos.

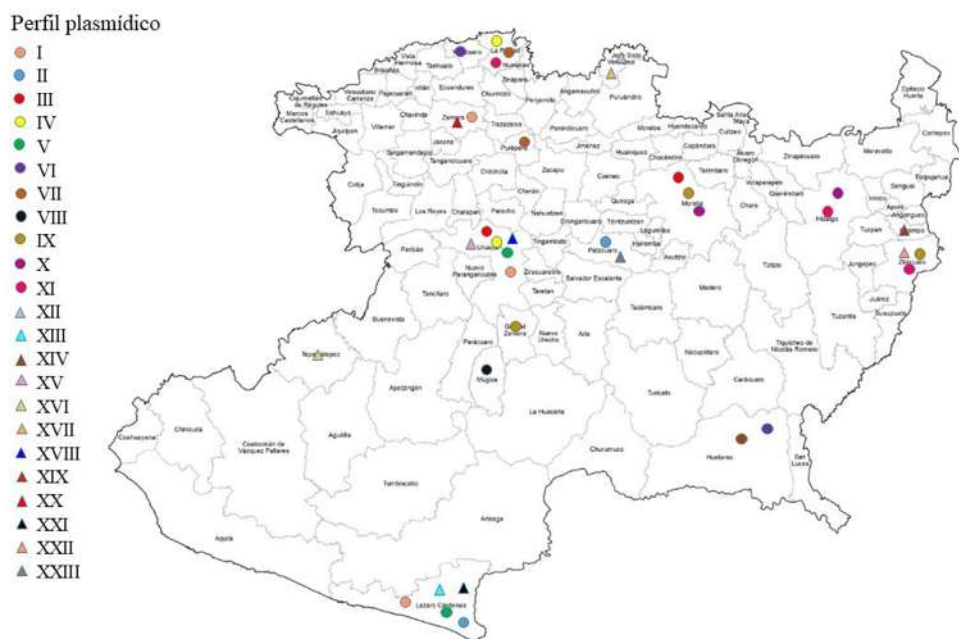


Figura 8. Distribución geográfica en el estado de Michoacán de los perfiles plasmídicos encontrados en las cepas de estudio. Círculo: indica la presencia de dos a tres cepas; Triángulo: indica la presencia de una sola cepa. Clave: Círculo: PP conformado por dos o más cepas, Triángulo: PP conformado por una cepa.

7. DISCUSIÓN

El análisis del contenido de plásmidos fue una de las técnicas epidemiológicas moleculares más utilizadas en la década de 1980-1990 para la investigación de brotes epidémicos en *S. enterica* y otras bacterias gram negativas asociadas a la contaminación de alimentos (Foley *et al.*, 2009). Aunque en algunos trabajos relativamente recientes se sigue utilizando dicha técnica, se hace en complemento con otros métodos de tipificación genético-molecular (Kaldhone *et al.*, 2008; Morshed y Peighambariy, 2010; Ozdemir y Acar, 2014) y se intenta caracterizar algunos de los plásmidos en relación con la resistencia a antibióticos (Litrup *et al.*, 2017; Szmolka *et al.*, 2017) la patogenicidad (Aviv *et al.*, 2014) y la transmisibilidad (Mills-Robertson *et al.*, 2003). En la actualidad las indicaciones de mayor utilidad serían: establecer la relación epidemiológica entre plásmidos diferentes aislados de la misma o diferente especie bacteriana y ayudar a la localización de otros elementos extracromosómicos como transposones e integrones. Además, caracterizar la estructura y composición de genes de los plásmidos sería importante para un mejor entendimiento de su relevancia epidemiológica.

Las cepas monofásicas de *S. enterica* para las que no se puede obtener su perfil de serotipo de manera completa han incrementado su incidencia en la presencia de brotes en todo el mundo (Moreno *et al.*, 2009; Arya *et al.*, 2017). No obstante, en México no se han analizado las consecuencias epidemiológicas de la presencia de cepas monofásicas de *S. enterica* en alimentos contaminados. En este trabajo se analizó si el perfil plasmídico de 57 cepas de *Salmonella enterica* tipificadas a nivel de serogrupo estaba relacionado con la procedencia geográfica, el gen de virulencia *spvC* y el tipo de muestra de procedencia.

En *S. enterica* se han caracterizado diferentes tipos de plásmidos relacionados principalmente con virulencia, resistencia a metales pesados y resistencia a antibióticos, aunque también tienen determinantes genéticos para otro tipo de funciones (Rychlik *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2017). Nuevos plásmidos o variantes de plásmidos ya descritos se describen continuamente, algunos de ellos relacionados con nuevas características fisiológicas, como la resistencia a estrés (Aviv *et al.*, 2015; Szmolka *et al.*, 2017). Mientras

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

que hay plásmidos que se encuentran en más de un serotipo, otros parecen ser específicos de serotipo (Rychlik *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se observaron en las 57 cepas estudiadas 23 perfiles plasmídicos que abarcaban desde 2 hasta 7 plásmidos, con tamaños entre 850 pb y 12,000 pb. De las cepas estudiadas, 34 no presentaron plásmidos. Al comparar dichos resultados con reportes previos se encuentra que este estudio muestra algunas coincidencias, pero también algunas particularidades. Por ejemplo, previamente al analizar 11 cepas del serotipo Dublin aisladas de productos cárnicos y lácteos, se encontró que tres portaban dos plásmidos y el resto únicamente uno, de tamaños entre 54 y 200 kb, con seis perfiles plasmídicos (Davis *et al.*, 2007). De manera interesante, la mayoría de los plásmidos resultaron positivos para la presencia del gen *spvC* y las cepas que portaban un solo plásmido de 68 kb resultaron susceptibles a todos los antibióticos, mientras que las que portaban un plásmido de 200 kb fueron mutiresistentes a los antibióticos probados. Además, los perfiles plasmídicos no muestran relación con el origen geográfico, con el tipo de muestra, o con el patrón de resistencia a antibióticos y aunque se realizó análisis de patrones PFGE, los autores no mencionan si hubo o no correlación con el pulso tipo (Davis *et al.*, 2007).

En otro estudio al analizar 48 cepas del serotipo Typhimurium y de los serogrupos 4,5,12:i:- y 4,5,12:-:- provenientes de cerdos enfermos y portadores sanos, se encontraron 19 perfiles plasmídicos y nueve de las cepas no presentaron ningún plásmido, aunque no se reportaron los tamaños de los plásmidos y los patrones de ausencia de dichos tamaños (De la Torre *et al.*, 2003). En este estudio 17 cepas presentaron el perfil plasmídico I y de manera interesante las tres cepas con el perfil XIV se agruparon en el dendrograma mediante PFGE generado con los resultados combinados de dos enzimas de restricción. Además, las cepas con el perfil de plásmidos I presentaron combinaciones cercanas de patrones de restricción con la combinación de las dos enzimas utilizadas en el ensayo PFGE y la mayoría de ellas (n=13) presentaron el mismo fagotipo. En general, no se observó relación entre el perfil de plásmidos y el perfil de resistencia a antibióticos.

El análisis de 108 cepas del serotipo Heidelberg provenientes de muestras clínicas y ambientes relacionados con la crianza de pavo mostró la presencia de más de 30 perfiles plasmídicos, con plásmidos de tamaños entre 3 y más de 150 kb (Kaldhone *et al.*, 2008).

**PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE
SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN**

Algunas de las cepas no presentaron plásmidos y las cepas en las que si se observaron presentaron de uno a cuatro de estos elementos extracromosomales. Algunos de los plásmidos de mayor tamaño, superiores a las 100 kb, se relacionaron con la multiresistencia a antibióticos y se encontró que se podían transferir horizontalmente entre cepas de distinto pulso tipo (PFGE).

Para el análisis de 49 cepas del serotipo Enteritidis provenientes de muestras clínicas de heces humanas y de res, así como clínicas y ambientales de ambiente de crianza de pollo, se encontraron seis perfiles plasmídicos con prevalencia en la mayoría de las cepas (98%) de un plásmido de 68 kb (Morshed y Peighambari, 2010). Los perfiles de plásmidos no mostraron relación con la procedencia del aislado. En otros estudios analizando cepas del mismo serotipo provenientes de muestras humanas y de animales se han encontrado, siete perfiles plasmídicos en 105 cepas (Fernandes *et al.*, 2003) nueve en 65 cepas (Bakeri *et al.*, 2004) y 17 perfiles en 250 cepas (Liebana *et al.*, 2004). En un trabajo posterior se analizaron 32 cepas de *S. Enteritidis* provenientes de muestras clínicas humanas y de pollo, de tres fagotipos distintos, se encontró que todas las cepas del fagotipo PT13, salvo una, presentaban un plásmido de alto peso molecular (mayor de 16,000 pb); una cepa del fagotipo PT4 tampoco presentó dicho plásmido y una del fagotipo PT1 presentó un plásmido más pequeño, de aproximadamente de 4 kb (Olson *et al.*, 2007). De manera interesante, las cepas que carecían del plásmido de alto peso molecular presentaban un patrón de PFGE distinto a las cepas de su mismo fagotipo y todas las cepas que presentaron dicho plásmido fueron positivas para el análisis de la presencia del gen *spvC*.

Una característica interesante de las cepas aquí estudiadas es que poseían al menos dos plásmidos, en contraste con análisis de cepas de serotipos bien identificados en los que se presentaron cepas con un solo plásmido. También es interesante destacar el hecho de la gran diversidad de perfiles plasmídicos en relación al número de cepas analizadas, al comparar este dato con los estudios previos. En ese sentido, estudios previos con mayor número de cepas reportan un menor número de perfiles plasmídicos, destacando en particular el caso del serotipo Enteritidis en el que análisis de más de 100 o más de 200 cepas solo se encuentran siete y 17 perfiles, respectivamente (Fernandes *et al.*, 2003; Liebana *et al.*, 2004). El único caso en el que se encontraron más perfiles plasmídicos que

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

los aquí generados fue en el serotipo Heidelberg, en el que se reportaron 30 perfiles, pero en una muestra de más de 100 cepas (Kaldhone *et al.*, 2008).

Destaca la ausencia del plásmido de virulencia en las cepas aquí analizadas y que está presente en distintos serotipos de *S. enterica*. No obstante, dicho dato es coherente con análisis previos de cepas del serotipo Typhimurium en el estado de Michoacán, en las que únicamente se encontró el plásmido de virulencia en cepas de la secuencia tipo ST19 y no en las ST213 (Weisner *et al.*, 2009). El mismo estudio previo documenta que las cepas de la secuencia tipo ST213 portan un plásmido de resistencia a antibióticos del tipo β -lactámicos que no se encuentra presente en las cepas del genotipo ST19. Esto es, la presencia del plásmido de virulencia está restringida en el estado de Michoacán a ciertos genotipos dentro del serotipo Typhimurium y esa observación puede aplicarse a las variantes de serogrupo aquí analizadas. En principio, la ausencia del plásmido de virulencia implicaría que las cepas aquí analizadas representan un riesgo menor para la salud pública en el estado de Michoacán. No obstante, los determinantes de patogenicidad y virulencia también se encuentran presentes en islas genómicas del cromosoma bacteriano (Hurley *et al.*, 2014). Por lo anterior, a futuro es necesario evaluar determinantes genéticos asociados a virulencia y localizados en el cromosoma bacteriano de las cepas de estudio, con el objetivo de conocer a mayor detalle el potencial patogénico de éstas. Otro aspecto que es importante estudiar a futuro en las cepas de estudio es el genotipo ya sea mediante PFGE o MLST, con el objetivo de conocer si la presencia de ciertos plásmidos es exclusiva de genotipo, como se ha reportado previamente para los plásmidos de virulencia en cepas del serotipo Typhimurium del estado de Michoacán.

En el dendrograma generado a un corte al 80% o de 95% de similitud, no se encuentra relación entre los grupos formados y la procedencia geográfica de las cepas de estudio; tampoco se observa relación entre el patrón de agrupamiento y el tipo de muestra, o serogrupo. En relación a la resistencia a antibióticos, a varias de las cepas aquí estudiadas no se les pudo hacer el perfil de resistencia/sensibilidad, por lo que no se puede saber si existe una relación entre dicho perfil y el perfil plasmídico. Sin embargo, para aquellas cepas en las que se cuenta tanto con el PP como con el perfil de resistencia a antibióticos se observa que ciertos PP no guardan relación con la resistencia; por ejemplo, las cepas que presentan los

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

PP VI, IX, X y XXV son sensibles a todos los antibióticos. Estos datos muestran claramente que los plásmidos de dichos perfiles no tienen relación con la resistencia a fármacos.

No obstante, la falta de relación entre PP y genotipo o procedencia geográfica, el mapa de distribución obtenido de los PP con dos o más cepas en el estado de Michoacán muestra ciertas tendencias. Por ejemplo, los PP VIII y X presentan amplia distribución, encontrándose en el centro, norte y noreste de la entidad; en contraste, el patrón VII con dos cepas solo se encuentra en Múgica. No se puede establecer con claridad si estos datos guardan una relación epidemiológica hasta no conocer los serotipos, genotipo y las características de los plásmidos de las cepas de estudio.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

- a) El 59.6% de las cepas presentaron plásmidos.
- b) Se establecieron 23 perfiles plasmídicos.
- c) No se encontró relación entre el serogrupo con el perfil plasmídico, el sitio geográfico de aislamiento ni con el alimento de donde se aisló.
- d) Se encontraron 3 cepas pertenecientes al PP IX que posiblemente pueden pertenecer al mismo serotipo.
- e) Ninguna de las cepas presentó el gen de virulencia *spvC*.

9. CONCLUSIÓN

No se cumple la hipótesis planteada ya que no hay relación del perfil de plásmidos con la procedencia geográfica o la presencia del gen *spvC* en las cepas de estudio.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Brisse S. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*. 8(6): <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>
- Andreoli G, Merla C, Valle CD, Corpus F, Morganti M, D'incau M, Carra E. (2017). Foodborne Salmonellosis in Italy: Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic variant 4,[5], 12: i– isolated from salami and human patients. *Journal of food Protection*. 80(4): 632-639.
- Andrés-Barranco S, Vico JP, Marín CM, Herrera-Leon S, Mainar-Jaime RC. (2016). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from pigs and pig environment–related sources and evidence of new circulating monophasic strains in Spain. *Journal of Food Protection*. 79(3): 407-412.
- Arnold ME, Gosling RJ, La Ragione RM, Davies RH, Martelli F. (2014). Estimation of the impact of vaccination on faecal shedding and organ and egg contamination for *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium and monophasic *Salmonella* Typhimurium. *Avian Pathology*. 43(2): 155-163.
- Arya G, Holtslander R, Robertson J, Yoshida C, Harris J, Parmley J, Poppe C. (2017). Epidemiology, Pathogenesis, Genosero typing, Antimicrobial Resistance, and Prevention and Control of Non-Typhoidal *Salmonella* Serovars. *Current Clinical Microbiology Reports*, 4(1), 43-53.
- Aviv G, Tsyba K, Steck N, Salmon Divon M, Cornelius A, Rahav G, Gal Mor O. (2014). A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environmental microbiology*, 16(4), 977-994.
- Bakeri SA, Yasin RM, Koh YT, Puthuchear SD, Thong KL. (2003). Genetic diversity of human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Malaysia. *Journal of*

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

applied microbiology, 95(4), 773-780.

Betancor L, Gadea M, Flores K. (2006). Genética bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, (C), 59–80.

Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.

Biberstein EL, Chung Zee Y. (2004). Tratado de Microbiología veterinaria. *Zaragoza España: Blakwell Scientific Publications*.

Borges K A, Furian TQ, Borsoi A, Moraes HL, Salle CT, Nascimento VP. (2013). Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 33(12), 1416-1422.

Caffer MI, Terragno R, Binsztein N. (2008). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas*, 76.

Castillo A del CG, Martínez LHP, Apodaca NLC. (2008). Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansion en el mundo. *Veterinaria Mexico*, 39(1), 81–90.

Cejudo AG, Tejada M, Camargo A, Higuera J, Mariscal V, Reyes EF. (2010). Aislamiento y purificación del DNA de un plásmido recombinante, 1–5.

Cito F, Baldinelli F, Calistri P, Di Giannatale E, Scavia G, Orsini M, Conte A. (2016). Outbreak of unusual *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1, 4 [5], 12: i:-, Italy, June 2013 to September 2014. *Eurosurveillance*, 21(15).

Concha Valdez FG, Flores Abuxapqui JJ, Puc Franco MA, Heredia Navarrete MR. (2004). Frecuencia del gen *spvB* en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de niños con y sin diarrea. *Rev Biomed*, 15(4), 201–206. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2004/bio044a.pdf>

Curd H, Liu D, Reeves PR. (1998). Relationships among the O-antigen gene clusters of *Salmonella enterica* groups B, D1, D2, and D3. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 1002–1007.

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

- Davis MA, Hancock DD, Besser TE, Daniels JB, Baker KN, Call DR. (2007). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Dublin isolates from beef and dairy sources. *Veterinary microbiology*, 119(2-4), 221-230.
- De la Torre E, Zapata D, Tello M, Mejia W, Frias N, Pena FG, Torre E. (2003). Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4, 5, 12: i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2395-2400.
- Domínguez C, Heras J, Mata E, Pascual V, Vázquez Garcidueñas MS, Vázquez Marrufo G(2017). Extending GelJ for interoperability: Filling the gap in the bioinformatics resources for population genetics analysis with dominant markers. *Computer methods and programs in biomedicine*, 140, 69-76.
- Durango J, Arrieta G, Mattar S. (2004). Presencia de *Salmonella* spp. en un área del Caribe colombiano : un riesgo para la salud pública. *Biomédica*, 24, 89–96.
- Fàbrega A, Vila J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 308-341.
- Fernandes SA, Ghilardi ÂC, Tavechio AT, Machado AM, Pignatari AC. (2003). Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(2), 59-63.
- Fitzgerald C, Gheesling L, Collins M, Fields PI. (2006). Sequence analysis of the *rfb* loci, encoding proteins involved in the biosynthesis of the *Salmonella enterica* O17 and o18 antigens: Serogroup-specific identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7949–7953. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-06>
- Flores Castro R. (2010). La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. *Gaceta Médica de México*, 146(6), 423–429.
- Foley SL, Lynne AM, Nayak R. (2009). Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 430-440.
- Fuche FJ, Sow O, Simon R, Tennant SM. (2016). *Salmonella* serogroup C: Current status of

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

- vaccines and why they are needed. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(9), 737–745.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00243-16>
- Gómez CG, Carrillo CS. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC*. ISBN, 84-609.
- Grimont PA, Weill FX. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9, 1-166.
- Guillier L, Danan C, Bergis H, Delignette Muller ML, Granier S, Rudelle S, Brisabois A. (2013). Use of quantitative microbial risk assessment when investigating foodborne illness outbreaks: The example of a monophasic *Salmonella* Typhimurium 4, 5, 12: i:– outbreak implicating beef burgers. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 471-478.
- Guiney DG, 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>
- Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. (2000). *Salmonella* serotypes identified in Mexican health services. *Salud Publica de Mexico*, 42(6), 490–495. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342000000600004>
- Hernández Cortez C, Aguilera Arreola MG, Castro Escarpulli G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 31(4), 137–151.
- Huehn S, La Ragione RM, Anjum M, Saunders M, Woodward MJ, Bunge C, Brisabois A. (2010). Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne pathogens and disease*, 7(5), 523-535.
- Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M. (2014). *Salmonella*–host interactions–modulation of the host innate immune system. *Frontiers in immunology*, 5, 481.
- Inocencio Velázquez AG. (2013) Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

provenientes de Michoacán. Tesis de Maestría Fac. de Ciencias Médicas y Biológicas, “Dr Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán, México.

Jurado Jiménez R, Arenas Muñoz C, Doblas Delgado A, Rivero A, Torre-Cisneros J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *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)

Kaldhone P, Nayak R, Lynne AM, David DE, McDermott PF, Logue CM, Foley SL. (2008). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from turkey-associated sources. *Applied and environmental microbiology*, 74(16), 5038-5046.

Kariuki S, Okoro C, Kiiru J, Njoroge S, Omuse G, Langridge G, Revathi G. (2015). Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium sequence type 313 from Kenyan patients is associated with the blaCTX-M-15 gene on a novel IncHI2 plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(6), 3133-3139.

Lahiri A, Lahiri A, Iyer N, Das P, Chakravorty D. (2010). Visiting the cell biology of *Salmonella* infection. *Microbes and Infection*, 12(11), 809–818.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.010>

Langridge GC, Wain J, Nair S. (2012). Invasive Salmonellosis in Humans. *EcoSal Plus*, 5(1).

Lavalett L, Sánchez MM, 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*.

Liebana E, Clouting C, Garcia Migura L, Clifton-Hadley FA, Lindsay E, Threlfall EJ, Davies RH. (2004). Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. *Veterinary microbiology*, 100(3-4), 189-195.

Liebana E, Guns D, Garcia-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley FA, Davies RH. (2001). Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England:

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

- Assessment of methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3609–3616.
<https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3609-3616.2001>
- Liu D, Cole RA, Reeves PR. (1996). An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): A promising candidate for O-unit flippase. *Journal of Bacteriology*, 178(7), 2102–2107.
<https://doi.org/10.1128/JB.178.7.2102-2107.1996>
- Litrup E, Kiil K, Hammerum AM, Roer L, Nielsen EM, Torpdahl M. (2017). Plasmid-borne colistin resistance gene mcr-3 in *Salmonella* isolates from human infections, Denmark, 2009–17. *Eurosurveillance*, 22(31).
- Maldonado Ruíz LP (2015) Perfiles de virulencia de aislados de *salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán. Tesis de Maestría Fac. de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán, México
- Marchelletta RR, Gareau MG, Okamoto S, Guiney DG, Barrett KE, Fierer J. (2015). *Salmonella*-induced diarrhea occurs in the absence of IL-8 receptor (CXCR2)-dependent neutrophilic inflammation. *Journal of Infectious Diseases*, 212(1), 128–136.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu829>
- Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: Big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2(2), 145–156.
[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2)
- McDonough PL, Shin SJ, Lein DH. (2000). Diagnostic and public health dilemma of lactose-fermenting *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in cattle in the northeastern United States. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1221-1226.
- Merino LA, Alonso JM, Ronconi MC, Hreňuk GE. (1999). Dotación Plasmídica como Marcador Epidemiológico Bacteriano. *Comunic. Cientif. Tecnol.*, 3(3500), 113–116.
- Mills-Robertson F, Crupper SS, Addy ME, Mensah P. (2003). Antibiotic resistance and genotyping of clinical group B *Salmonella* isolated in Accra, Ghana. *Journal of applied microbiology*, 94(2), 289-294.

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

- Miljkovic-selimovic B, Babic T, Kocic B, Stojanovic P, Ristic L, Dinic M. (2008). Review article PLASMID PROFILE ANALYSIS OF SALMONELLA ENTERICA SEROTYPE. *Public Health Institute Clinical Center in Nis*, 47, 54–57.
- Mortimer CKB, Peters TM, Gharbia SE, Logan JMJ, Arnold C. (2004). Towards the development of a DNA-sequence based approach to serotyping of *Salmonella enterica*. *BMC Microbiology*, 4, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-31>
- Molina López RA, Vidal A, Obón E, Martín M, Darwich L. (2015). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 4, 12: i:-isolated from asymptomatic wildlife in a Catalan wildlife rehabilitation center, Spain. *Journal of wildlife diseases*, 51(3), 759-763.
- Morshed R, Peighambari SM. (2010). Drug resistance, plasmid profile and random amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of *Salmonella Enteritidis*. *The new microbiologica*, 33(1), 47.
- Moreno Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. (2009). Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4, 5, 12: i:-. *Foodborne pathogens and disease*, 6(4), 407-415.
- Mossong J, Marques P, Ragimbeau C, Huberty-Krau P, Losch S, Meyer G, Schneider F. (2007). Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5], 12: i:-in Luxembourg, 2006. *Eurosurveillance*, 12(6), 11-12.
- Mourão J, Machado J, Novais C, Antunes P, Peixe L. (2014). Characterization of the emerging clinically-relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5], 12: i:-(monophasic variant of *S. Typhimurium*) clones. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(12), 2249-2257.
- Ballesteros NN, Rubio Lozano MS, Delgado Suárez E, Méndez Medina D, Braña Varela D, Rodas Suárez O. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud pública de*

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

México, 58, 371-377.

- OIE (World Organisation for Animal Health). (2008). Salmonellosis. *Manual De La OIE Sobre Animales Terrestres*, 1–18. Retrieved from <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>. Consultado el día: 14 de agosto de 2017
- Olson AB, Andrysiak AK, Tracz DM, Guard-Bouldin J, Demczuk W, Ng LK, Gilmour MW. (2007). Limited genetic diversity in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT13. *BMC microbiology*, 7(1), 87.
- OMS. (2013). Centro de prensa Cáncer. OMS, 1–6. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es>. Consultado el día: 07 de junio de 2017
- 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), e95976.
- 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.
- Paytubi S, Aznar S, Madrid C, Balsalobre C, Dillon SC, Dorman CJ, Juárez A. (2014). A novel role for antibiotic resistance plasmids in facilitating *Salmonella* adaptation to non-host environments. *Environmental Microbiology*. 16(4): 950-962.
- Pere Coll MTC, Domínguez MA, Vázquez J. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC*.
- Raguenaud ME, Le Hello S, Salah S, Weill FX, Brisabois A, Delmas G, Germonneau P. (2010). Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium 4, 5, 12: i:-in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010. *Eurosurveillance*, 17, 40.
- Regalado Pineda I. (2010) Aislamiento y caracterización Bioquímica y Genética de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de productos cárnicos y derivados lácteos de

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

- Michoacán México. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. México.
- Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. (2006). Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*. 112(1): 1-10.
- Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F. (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS microbiology letters*, 305(1), 1-13.
- Sambrook J, Russel DW. (2001). Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harboc Laboratory Press*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655>
- Silva C, Puente JL, Calva E. (2017). *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. *Pathogens and disease*, 75(6): 1-5.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2017). Índice. *Boletín Epidemiológico*, 34(10), 1-3
- Suárez Rojas CJ. (2015). Análisis de perfiles plasmídicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido aisladas en urocultivos en el Instituto Nacional de Salud del Niño. Tesis de Licenciatura. Fac. de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Szmolka A, Szabó M, Kiss J, Pászti J, Adrián E, Olasz F, Nagy B. (2018). Molecular epidemiology of the endemic multiresistance plasmid pSI54/04 of *Salmonella* Infantis in broiler and human population in Hungary. *Food Microbiology*. *Food microbiology*, 71, 25-31.
- Vázquez Narváez EG. (2012). Elementos Repetitivos para el análisis de Diversidad Genética de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de productos cárnicos y lácteos del Estado de Michoacán. Tesis de Maestría Fac. de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán, México.

- Vilela FP, Frazão MR, Rodrigues DP, Costa RG, Casas MRT, Fernandes SA, Campioni F. (2018). Genetic diversity, anti-microbial resistance, plasmid profile and frequency of the Vi antigen in *Salmonella* Dublin strains isolated in Brazil. *Zoonoses and public health*. 65(1), e34-e43.
- Wang L, Andrianopoulos K, Liu D, Popoff MY, Reeves PR. (2002). Extensive variation in the O-antigen gene cluster within one *Salmonella enterica* serogroup reveals an unexpected complex history. *Journal of Bacteriology*, 184(6), 1669–1677. <https://doi.org/10.1128/JB.184.6.1669-1677.2002>
- Wiesner M, Zaidi MB, Calva E, Fernández Mora M, Calva JJ, Silva C. (2009). Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC microbiology*, 9(1), 131.
- Wiesner M, Calva E, Fernández Mora M, Cevallos MA, Campos F, Zaidi MB, Silva C. (2011). *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC microbiology*, 11(1), 9.
- Wiesner M, Calva JJ, Bustamante VH, Pérez Morales D, Fernández Mora M, Calva E, Silva C. (2016). A multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the bla CMY-2 gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC microbiology*, 16(1), 18.
- Wyk P, Reeves P. (1989). Identification and sequence of the gene for abequose synthase, which confers antigenic specificity on group B salmonellae: Homology with galactose epimerase. *Journal of Bacteriology*, 171(10), 5687–5693.
- Yáñez Ortega JL, Carramiñana Martínez I, Bayona Ponte M. (2001). Brote por *Salmonella* Enteritidis en una residencia de ancianos. *Revista Espanola de Salud Publica*, 75(1), 81–88. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342001000300006>
- Zaidi MB, Macías CL, Calva E. (2006). Estudios Mexicanos sobre *Salmonella*: Epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de*

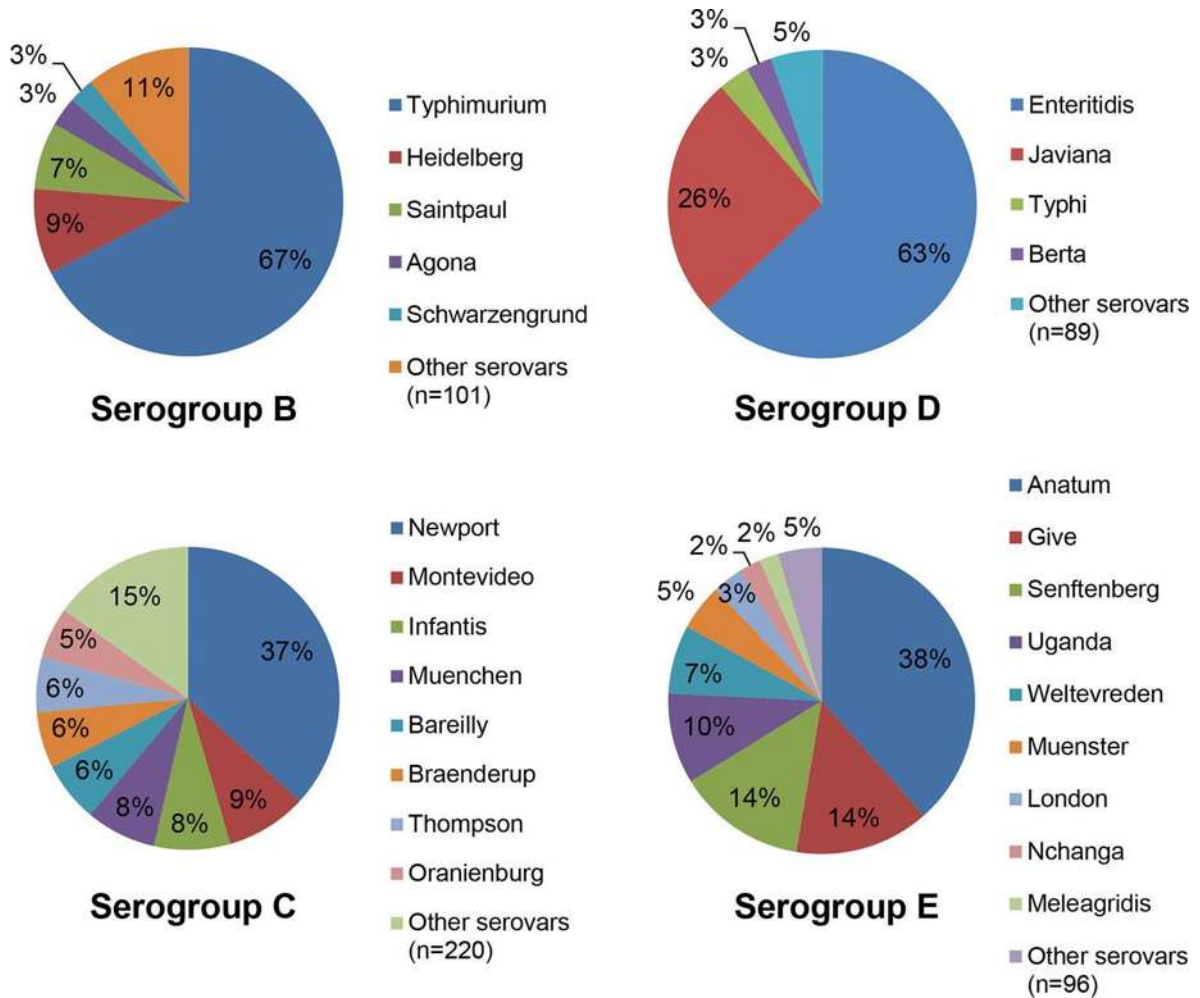
PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

Microbiologia, 48(2), 121–125. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>

Zottola T, Montagnaro S, Magnapera C, Sasso S, De Martino L, Bragagnolo A, Pagnini U. (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* in European wild boar (*Sus scrofa*); Latium Region–Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 36(2), 161-168.

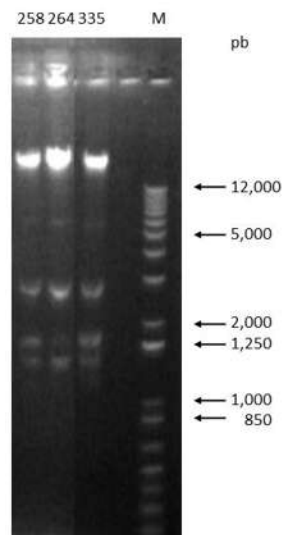
PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN

11. ANEXOS



Anexo 11.a. Ejemplo de agrupación de serotipos por serogrupo de *Salmonella enterica* trabajo realizado por (Fuche *et al.*, 2016)

PERFIL PLASMÍDICO DE CEPAS DE *Salmonella enterica* TIPIFICADAS A NIVEL DE SEROGRUPO, AISLADAS DE ALIMENTOS PROVENIENTES DE MICHOACÁN



Anexo 11.b PP SVIII Serogrupo C1. 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); carril: 258, 264y 335, PP de las cepas 258, 264y 335 respectivamente.