



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS
"Dr. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

**Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de
aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos
cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

QFB ARACELI GABRIELA INOCENCIO VELÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS

CO-DIRECTOR DE TESIS

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

Morelia, Mich., agosto del 2013

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.

A mis padres: J. Socorro Inocencio y Ma. Elena Velázquez les dedico ésta Tesis con mucho cariño, donde quiera que se encuentren siempre los llevo en mi mente y en mi corazón. Gracias por el tiempo compartido conmigo, gracias por su paciencia, sus enseñanzas y valores inculcados que no olvido.

A mis hermanos: Jesús, Leticia, Miguel y Alejandro. Sobre todo a mis hermanos mayores Chucho y Lety y al mejor cuñado del mundo Eutiquio, gracias por tomarse el tiempo para escucharme, darme consejos que siempre me orientaron de la mejor manera, por sus muestras de cariño y comprensión cuando las necesito, por creer en mí. Gracias por su apoyo incondicional me han llenado de fuerza y voluntad para seguir adelante. Los quiero mucho.

A mi bebé: Rocío Maribel por darme ánimo y amor cada vez que lo necesito, toma este logro como tuyo, pues te lo mereces por tanto amor y comprensión.

A todos mis sobrinos: gracias por contagiarme de esa alegría y energía que los caracteriza.

A mi familia en general: gracias por su apoyo y por estar presentes en diferentes momentos de mi vida.

A mis mejores y grandes amigos que he conocido en diferentes etapas de mi vida, desde el preescolar hasta ahora, los recuerdo con mucho cariño y soy muy afortunada por contar con su amistad.

A mis compañeros y amigos incondicionales del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, gracias por todos los momentos compartidos, momentos llenos de conocimientos, sentimientos, pensamientos, sueños, anhelos, risas y lágrimas, gracias por su amistad incondicional, sin lugar a dudas, en mi memoria, quedará grabado cada segundo compartido con ustedes.

A mi Directora de Tesis la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas primeramente por la confianza depositada en mí persona, por acogerme en este Laboratorio, en el mundo de la investigación, por sus conocimientos compartidos y por hacerme partícipe de un equipo de trabajo maravilloso, gracias por la atención prestada y por toda su ayuda para la realización de este trabajo, pero sobre todo, gracias por sus muestras de cariño y afecto, factores muy importantes que desde mi formación de profesional me han motivado para llegar hasta aquí.

A mí Co-Director de Tesis, el D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo por tener la paciencia de explicarme, gracias por su valioso tiempo y sus conocimientos que me fueron de gran ayuda.

A mis sinodales: la D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza, el D. en C. Omar Chassin Noria y el D. en C. Carlos Cortés Penagos, gracias por las correcciones, y críticas constructivas así como sus valiosas observaciones para el desarrollo de este trabajo.

Gracias a todos, los que de alguna manera estuvieron cerca de mí para realizar este logro.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR MICROBIANA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “Dr. IGNACIO CHÁVEZ” DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DE LA D. EN C. Ma. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS Y EL D. EN C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO. EL TRABAJO SE LLEVÓ A CABO CON LA COLABORACIÓN DEL LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA DE MICHOACÁN, PARTICIPANDO POR DICHA INSTITUCIÓN LA M. EN C. GLORIA ALICIA FIGUEROA AGUILAR Y EL M. EN C. IVÁN DAVID REGALADO PINEDA. SE CONTÓ CON EL APOYO DEL FONDO SECORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT AL PROYECTO “MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL ANÁLISIS DE DIVERSIDAD DE AISLADOS DE *Salmonella enterica* OBTENIDOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS Y LÁCTEOS” CON CLAVE SALUD-2009-01-11517.

COMITÉ TUTORAL

- D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas**
- D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo**
- D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza**
- D. en C. Omar Chassin Noria**
- D. en C. Carlos Cortés Penagos**

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	II
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El Género <i>Salmonella</i>	1
1.1.1. Generalidades.....	1
1.1.2. Nomenclatura.....	1
1.1.3. Epidemiología y Patología.....	2
1.1.4. Identificación de <i>Salmonella</i>	5
1.2. Tipificación molecular de microorganismos.....	5
1.2.1. Técnicas que no se encuentran basadas en la reacción de PCR.....	6
1.2.2. Técnicas basadas en la reacción de PCR.....	7
1.2.3. Tipificación por secuenciación Multi locus: <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST).....	9
a) Asignación de alelos y ST.....	12
1.3. Epidemiología molecular de <i>S. enterica</i> empleando MLST.....	12
1.3.1. Estudios de diversidad genética de <i>Salmonella enterica</i> en el Estado de Michoacán.....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	20
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7. 1. Material biológico.....	22
7. 2. Extracción del ADN de los aislados bacterianos.....	25
7. 3. Amplificación del ADN por PCR de los genes de mantenimiento.....	26
7.4. Secuenciación de los productos de PCR.....	27
7.5. Asignación de Secuencias Tipo.....	28
7.6. Análisis filogenético.....	28

8. RESULTADOS.....	30
8.1. ADN extraído de los aislados utilizados en este estudio.....	30
8.2. Amplificación por PCR de los genes de mantenimiento.....	30
8.3. Secuenciación de los productos de PCR.....	33
8.4. Análisis BLAST de las secuencias.....	33
8.5. Análisis de secuencias en la base de datos del MLST.....	33
a) Asignación de perfil alélico en aislados de <i>Salmonella enterica</i>	33
b) Asignación de ST por MLST en aislados de <i>Salmonella enterica</i>	38
8.6. Patrón de agrupamiento de las ST.....	45
8.7 Patrón de agrupamiento de las ST por gBurst.....	47
9. DISCUSIÓN.....	51
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
°C	Grado Centígrado
dATP	Deoxinucleosido Trifosfato de Adenina
dCTP	Deoxinucleosido Trifosfato de Citocina
dGTP	Deoxinucleosido Trifosfato de Guanina
dTTP	Deoxinucleosido Trifosfato de Timina
eBG	Grupos eBurst
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetracético
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
h	Horas
Kb	Kilobase
LBA	Agar Luria Bertani
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
MLST	Multi Locus Sequence Typing
mm	Milímetros
NA	No asignado
ND	No determinada
PFGE	Electroforesis en geles de campo pulsante
mM	Milimolar
μL	Microlitro
μM	Micromolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	Centro Nacional de Información para Biotecnología
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio

Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

Seg	Segundos
ST	Secuencia Tipo
Tris-HCl	Tris-Ácido Clorhídrico

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Esquema de genes de mantenimiento para el análisis por MLST en <i>Salmonella enterica</i>	11
Tabla 2. Aislados utilizados en este estudio.....	22
Tabla 3. Condiciones empleadas en los ensayos de PCR para amplificar los genes de mantenimiento en aislados de <i>salmonella enterica</i>	26
Tabla 4. Iniciadores utilizados para la caracterización de aislados de aislados de <i>Salmonella enterica</i> por Multi Locus Sequence Typing.....	27
Tabla 5. Perfiles alélicos y ST asignados por la base de datos para los aislados utilizados en este estudio.....	34
Tabla 6. Número y porcentaje de <i>alelos</i> encontrados para cada <i>locus</i> de los aislados de <i>Salmonella enterica</i> utilizados en este estudio.....	38
Tabla 7. ST encontradas por MLST en los aislados de <i>Salmonella enterica</i> utilizados en este estudio.....	39
Tabla 8. Comparación de la distribución geográfica en el estado de Michoacán y diferentes países de los aislados de <i>Salmonella enterica</i> de las ST obtenidas por MLST.....	42
Tabla 9. Comparación de ST obtenidas por MLST de los serotipos encontrados en aislados de <i>Salmonella enterica</i> utilizadas en este estudio con los serotipos de las ST reportadas en la base de datos.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Antígenos somáticos y flagelos de <i>Salmonella enterica</i>	1
Figura 2. Poder de resolución de diferentes técnicas para obtener marcadores moleculares.....	9
Figura 3. Localización genómica de los genes de mantenimiento o housekeeping empleados en el análisis mediante MLST en <i>Salmonella enterica</i>	11
Figura 4. Porcentaje de serotipos de aislados de <i>Salmonella enterica</i> utilizados en este estudio.....	24
Figura 5. Porcentaje de aislados de <i>Salmonella enterica</i> confirmados a nivel de Serogrupo utilizados en este estudio.....	24
Figura 6. Porcentaje de aislados de <i>Salmonella enterica</i> obtenidos de diversos productos cárnicos y derivados lácteos.....	25
Figura 7. ADN extraído de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en este estudio.....	30
Figura 8. Amplicones de los genes de mantenimiento obtenidos con ADN de la cepa de referencia <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028.....	31
Figura 9. Amplicones de los genes de mantenimiento obtenidos con ADN de los aislados bacterianos.....	32

Figura 10. Ejemplos de electroferogramas de las secuencias obtenidas para cada uno de los 7 <i>loci</i> analizados en los aislados de <i>Salmonella enterica</i> de interés.....	33
Figura11. Distribución geográfica en el estado de Michoacán de las ST encontradas por MLST en aislados de <i>Salmonella enterica</i>	41
Figura 12. Dendograma construido con Neighbour-Joining y utilizando el programa MEGA versión 5.2.....	47
Figura 13. Agrupamientos gBurst de los aislados de <i>S. enterica</i> de Michoacán.....	48
Figura 14. Árbol de mínima expansión que muestra la distribución de serotipos en cada secuencia tipo.....	50

RESUMEN.

Salmonella enterica es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo y se asocia principalmente con la ingestión de alimentos contaminados, presentando altos índices de morbilidad y mortalidad. El control de la salmonelosis requiere de estrategias de monitoreo que permitan la detección temprana y la tipificación adecuada del agente causal. La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre *Salmonella* en México y en especial en el estado de Michoacán, sólo reportan la incidencia y los serotipos presentes. Una herramienta molecular muy útil en el estudio de poblaciones bacterianas es la caracterización por Multi Locus Sequence Typing (MLST), técnica que incluye la amplificación y secuenciación de fragmentos de genes de mantenimiento (*housekeeping*) cuyos productos se encuentran involucrados en funciones celulares esenciales. Esta técnica permite la determinación de las relaciones filogenéticas entre cepas, así como una visualización global de la distribución de los principales complejos clonales en una población analizada, trazando procesos de dispersión. **Los objetivos del presente trabajo fueron** determinar las ST de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de productos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán, comparar los perfiles alélicos obtenidos con los de cepas analizadas con los de otros países y asignar a un serogrupo y grupo clonal, las cepas no asignadas mediante serotipificación convencional. Se utilizaron 72 cepas de los serotipos Typhimurium (12), Anatum (16), Agona (13) y 31 cepas no asignadas a un serotipo por métodos convencionales, aisladas de carne y productos lácteos del estado de Michoacán colectadas durante el periodo 2008 - 2011. Se encontraron 20 ST diferentes y 2 ST no determinadas con una amplia distribución geográfica mundial así como su persistencia en una amplia variedad de hospederos y contaminando varios alimentos y muestras de medio ambiente. Se logró asignar serotipos a algunos aislados que sólo se encontraban confirmados a nivel de serogrupo, así como un grupo clonal. Para el caso específico de México se encontraron dos ST previamente reportadas y los árboles de mínima expansión como los grupos eBG formados con las ST de los aislados de *S. enterica* aquí estudiados, sugieren que la ST19 puede ser la fundadora original de la población estudiada para Michoacán.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El género *Salmonella*

1.1.1 Generalidades

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos de tamaño 0.7 – 1.5 x 2.5 µm pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son anaerobios facultativos, no forman esporas, bioquímicamente se caracterizan por no fermentar lactosa y por la producción de ácido a partir de glucosa, son oxidasa negativo, catalasa positivo, indol y Voges-Proskauer negativo, citrato de Simmons positivo, lisina y ornitina descarboxilasa positivo. También son capaces de reducir los nitratos a nitritos (Bergey, 2000; Hawley, 2004).

1.1.2 Nomenclatura

El género *Salmonella* comprende a las especies *S. bongori* y *S. enterica*, reconociéndose seis subespecies de esta última (Tindall et al., 2005). Las especies de *Salmonella* se han dividido en distintos serotipos, establecidos con base en las diferencias en la porción de polisacárido de la capa de lipopolisacárido (antígeno O) y la porción de filamento del flagelo (antígeno H) presentes en la superficie celular de la bacteria (Voogt et al., 2002). En la actualidad se han descrito más de 2, 500 serotipos de *Salmonella*, encontrándose el 99% de estos dentro de la especie *S. enterica*, la cual contiene la mayoría de serotipos que son patógenos de humano (Popoff et al., 2001).

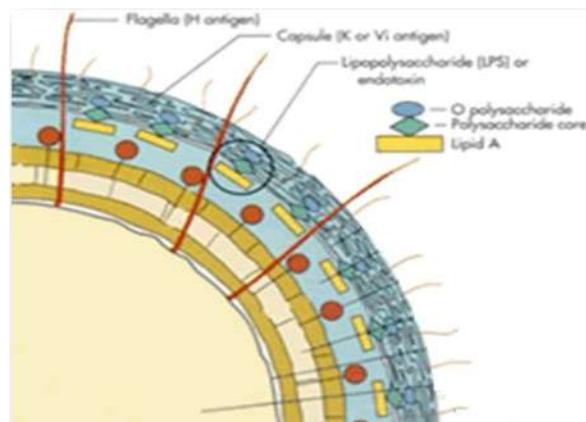


Figura 1. Antígenos somáticos y flagelares de *Salmonella enterica* (Tomado de Caffer 2001)

1.1.3 Epidemiología y Patología

Un alto porcentaje de las enfermedades diarreicas son originadas por alimentos contaminados, aunque las estimaciones de enfermedades ocasionadas por alimentos contaminados son difíciles de realizar debido a distintas circunstancias, entre las que se encuentran las diferencias para definir una enfermedad diarreica aguda en distintos estudios, el hecho de que la mayoría de este tipo de padecimientos no son reportadas a los sistemas de salud pública y debido a que pocas enfermedades pueden ser ligadas con seguridad a la comida ingerida (WHO, 2008). Uno de los agentes patógenos comúnmente asociados a alimentos contaminados es *Salmonella* spp. (WHO, 2008). La salmonelosis puede manifestarse mediante distintos síndromes que incluyen gastroenteritis, bacteremia, fiebre tifoidea e infecciones localizadas en ciertas áreas del cuerpo (Darwin y Miller, 1999). La fiebre tifoidea es una manifestación única de enfermedad asociada con infección por *S. enterica* serotipo *Typhi*. La manifestación más común de salmonelosis no tifoidea es una gastroenteritis de leve a moderada, con presentación de diarrea, dolor abdominal, vómito y fiebre. Los síntomas de gastroenteritis aparecen normalmente entre las 6 a 72 h después de ingerir alimentos contaminados con la bacteria (Pegues et al., 2005) y aunque normalmente pueden remitir en un lapso de 2 a 7 días, se puede desarrollar septicemia e infecciones invasivas de órganos, originando problemas de salud más serios como osteomielitis, neumonía y meningitis (Cohen et al., 1987).

Los grupos sociales más susceptibles a estas manifestaciones severas de la enfermedad son los niños, los adultos mayores y las personas inmunocomprometidas, las cuales requieren de terapia antimicrobiana para superar la enfermedad (Benenson y Chin, 1995). La salmonelosis es una enfermedad transmitida por alimentos contaminados que ha sido reportada durante décadas, sin embargo, dicho padecimiento se considera emergente debido a que en diversas partes del mundo se ha vuelto más frecuente. En los últimos 25 años el serotipo *Enteritidis* se ha vuelto predominante en el hemisferio Oriental y Europa, debido en gran parte al consumo de alimentos contaminados de origen animal, que incluyen pollos y huevos (WHO, 2002). Diversos factores han sido enumerados para que la salmonelosis, junto con otras enfermedades infecto-contagiosas, represente aún un riesgo para la salud y sea considerada como

enfermedad emergente por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002). Entre estos factores se encuentran la globalización del tráfico de alimentos y la introducción accidental de patógenos en nuevas áreas geográficas. También se han considerado los cambios asociados a las poblaciones microbianas, lo que permite que surjan cepas más virulentas y con resistencia a antibióticos, o con la capacidad de sobrevivir a condiciones adversas (Gutiérrez-Cogco et al., 2000).

Otro factor importante es la movilidad internacional de personas expuestas a patógenos, por ejemplo, se estima que cerca del 90% de los casos de salmonelosis que se presentan en Suecia son importados de viajeros que fueron a lugares con alta incidencia del patógeno. Los cambios en la población humana, incluyendo modificaciones en la edad de la población, la alimentación deficiente y otras enfermedades como las infecciones por VIH, ocasionan una mayor susceptibilidad a infecciones por *Salmonella* y otras bacterias patógenas. En el caso de los países en vías de desarrollo como México, los niños con alimentación deficiente son una población más susceptible a las enfermedades transmitidas por alimentos. Los cambios en el estilo de vida son otro factor que favorece la transmisión de salmonelosis por alimentos, debido al incremento en el consumo de comida rápida en lugares con escasas condiciones de higiene.

Un estudio realizado en el 2011 reporta la incidencia de serotipos que causan salmonelosis en diferentes regiones del mundo. Los serotipos que frecuentemente se identifican en alimentos contaminados con *Salmonella* son los serotipos Typhimurium y Enteritidis. Para la región de África los 5 serotipos mayormente aislados son: Enteritidis, Typhimurium, Livingstone, corvallis y Tiphys. Para Asia, los serotipos Enteritidis, Weltevreden, Typhi, Stanley y Typhimurium son los 5 serotipos más frecuentemente encontrados. Para la región de Europa, son los serotipos, Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow e Infantis, para Norteamérica, Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg y Javiana. En Oceanía son los serotipos, Typhimurium, enteritidis, Virchow, Saintpaul e infantis. Por último, en Latinoamérica los 5 serotipos mayoritariamente aislados son: Enteritidis, Typhimurium, Typhi, Agona y Paratyphi B (Hendriksen et al., 2011).

En México, los estudios sobre *Salmonella* y su importancia en salud pública se han enfocado principalmente en registrar la incidencia de ésta en casos de diarrea, así como a distinguir los serotipos más frecuentes. En un primer reporte se encontró que el serotipo más comúnmente encontrado en los pacientes ingresados a los servicios de salud pública sin distinción de edad, fue Typhimurium, mientras que el serotipo menos frecuente fue Ohio (Gutiérrez-Cogco et al., 2000). Estudiando una población de 300 niños que cursaban un cuadro de diarrea, se encontró que *Salmonella enterica* estaba asociada a un 53.5% de casos de niños menores de 12 años, sola o en combinación con otros enteropatógenos (Paniagua et al., 2007). En dicho estudio, los serotipos encontrados con mayor frecuencia fueron Ohio (28.3%), Typhimurium (16.3%), Infantis (8%), Anatum (0.6%) y Newport (0.3%). En uno de los estudios más amplios realizados en México, en el que se incluyeron 4 estados con distintas características socioeconómicas (Sonora, San Luis Potosí, Michoacán y Yucatán) se aisló *Salmonella* del 12.3% (2, 893 muestras) de niños menores de 6 años con cuadro de diarrea y del 5.3% de niños asintomáticos (6, 685 muestras) (Zaidi et al., 2008). Los serotipos más comúnmente aislados de niños con padecimiento gastrointestinales fueron Typhimurium (22.2%) y Enteritidis (14.5%), encontrándose en menor proporción también los serotipos Agona, Muenchen, Oranienburg, Anatum, Newport y Meleagridis. El serotipo más abundante en carne de res fue el Anatum (17.7%), seguido del Meleagridis (13%). En este mismo estudio se encontró una alta incidencia de contaminación de carne de vaca por *Salmonella* (21.3%-36.4%) al analizar 1, 733 muestras de carne en expendios de venta al menudeo.

En el caso del estado de Michoacán, la prevalencia de contaminación por *Salmonella* en carne de bovino fue del 16%, encontrándose un 5.8% de prevalencia de la bacteria en casos de niños con episodios de diarrea y de aproximadamente 2% en muestras de niños asintomáticos. En particular, los serotipos más frecuentemente aislados de carne de res en el estado de Michoacán son Typhimurium (34.1%) y Derby (24.4%), seguidos del Anatum (9.8%), más otros 11 serotipos en menor proporción. En total, se han detectado 24 serotipos distintos contaminando carne de cerdo, res y pollo en el estado de Michoacán (A. Figueroa, Laboratorio Estatal de Salud Pública, comunicación personal).

1.1.4 Identificación de *Salmonella*

La detección de *Salmonella* en alimentos se realiza comúnmente mediante el cultivo en medios selectivos, seguido de la realización de pruebas bioquímicas, proceso que puede tardar varios días. Estas técnicas tradicionales han sido complementadas con el uso de ensayos de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) que permiten la tipificación genético-molecular de *Salmonella* empleando iniciadores selectivos o específicos para la amplificación de diversas regiones genéticas. La especificidad de los iniciadores diseñados ha ido mejorando con el tiempo, lo que ha originado ensayos de PCR más selectivos (Ziemer y Steadham, 2003).

1.2 Tipificación genético- molecular de bacterias

Las técnicas moleculares que analizan propiedades o polimorfismos genéticos en los microorganismos han ampliado notablemente el campo de la tipificación en microbiología. La mayor ventaja de estos métodos radica en la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y en la posibilidad de aplicarlos universalmente a distintos géneros y especies de microorganismos.

Los marcadores genético-moleculares se han definido como una secuencia de ADN que puede o no codificar para una función que por herramientas moleculares se puede identificar y observar variaciones en un organismo (Srivastana and Mishra., 2009). La identificación y caracterización de marcadores genético- moleculares ha tenido aplicación en diferentes campos y su disponibilidad ha mejorado nuestro conocimiento sobre la patogénesis e historia natural de ciertas infecciones; la detección de brotes y epidemias; la identificación de reservorios y de mecanismos de transmisión de patógenos; el diseño de medidas de control de propagación de la infección, y la evolución genética de poblaciones microbianas (Domínguez et al., 2005).

En todas estas aplicaciones el objetivo de los marcadores moleculares es el de definir la relación existente, clonal o no, entre los aislamientos estudiados. El término clona o grupo clonal en epidemiología hace referencia al grupo de aislamientos relacionados por el hecho de descender de un ancestro común, esto es, por formar parte de una cadena de replicación y transmisión. Las cepas relacionadas provienen, pues, de la expansión clonal de un precursor

único y poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y fenotipos significativamente superior al que se encontraría entre aislamientos no relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente (Ruiz y Moreno., 2005). En este trabajo se utiliza la definición de cepa como variante fenotípica de una especie que en conjunto comparten al menos una característica, mientras que aislamiento se considera como un conjunto de microorganismos que se encuentran en un cultivo puro.

Se han implementado diversas técnicas para obtener marcadores genético moleculares, que presentan varias ventajas y desventajas de su empleo en estudios epidemiológicos, éstas técnicas se dividen en dos grandes tipos, aquéllas no basadas en la amplificación mediante PCR y aquéllas que si están basadas en dicha amplificación (Winokur, 2003).

1.2.1 Técnicas que no se encuentran basadas en la reacción de PCR

El análisis mediante la técnica de ribotificación está basado en la detección y análisis de la subunidad ribosomal 16s del RNA. Consiste en el tratamiento del DNA con enzimas de restricción seguido de la separación de los fragmentos por electroforesis transfiriéndolo a una membrana de nylon, posteriormente se realiza la hibridación con una sonda del gen de RNA ribosomal, detectándose así las diferencias en los patrones de hibridación. Actualmente, ésta técnica puede ser realizada haciendo uso de la amplificación del gen de la subunidad 16s por PCR, y los productos amplificados pueden visualizarse realizando una electroforesis en geles de agarosa (Bouchet et al., 2008).

Otra técnica es la técnica de PFGE la cual ha sido aceptada como el estándar de oro para la genotipificación de aislados de *Salmonella* por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos (Cimons, 2000) y es recomendada por la Organización Mundial de la Salud para estudios epidemiológicos de enfermedades y brotes ocasionados por alimentos contaminados (WHO, 2008). Esta técnica consiste en la macrorrestricción del DNA con enzimas de restricción de corte poco frecuente generándose de 20 a 30 fragmentos en el orden de las megabases, estos fragmentos son separados por electroforesis sometiéndolos a dos campos eléctricos de distinta orientación, de esta manera, se obtiene un patrón de bandeo, el cual es interpretado bajo varios criterios. (Ribot et al., 2006). Existen distintos trabajos que reportan el

uso de PFGE aplicado al análisis de relaciones genéticas entre aislados de *Salmonella* (Murakami et al., 1999; Liebana et al., 2001; Perron et al., 2007). No obstante que la técnica de PFGE ha mostrado un gran poder de discriminación en diferentes serotipos de *S. enterica*, también se han documentado casos en los que no ha podido distinguir entre aislados del serotipo *Enteritidis* (Boxrud et al., 2007; Goering RV, 2010).

1.2.2 Técnicas basadas en la reacción de PCR

Existe una gran diversidad de técnicas para la tipificación de aislados de *Salmonella enterica* que se encuentran basadas en la PCR, por mencionar algunas de ellas: la amplificación de fragmentos de ADN polimórficos (AFLP) (Giammanco et al., 2007), la amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD) (Regalado., 2010), el análisis de elementos repetitivos que incluyen a los ensayos de ERIC (secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias), REP (secuencias palindrómicas repetitivas extragénicas) y BOX (elementos mosaico repetitivos) (Sharples y Lloyd., 1990; Stern et al., 1984; Martin et al., 1992). Los AFLP combinan las ventajas de las enzimas de restricción con el análisis por PCR. Utilizan varios sitios de restricción a lo largo del genoma para poder definir diversidad genética entre aislados (Mueller y Wolfenbarger, 1999). Los RAPD's son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN. (Williams et al., 1990). En la PCR el iniciador se hibrida a lo largo del genoma en secuencias homólogas tanto en sentido 5' como 3', permitiendo amplificar fragmentos de distintos tamaños. Como resultado se obtienen múltiples amplicones de distinto peso molecular y esto nos permite distinguir un patrón típico para cada cepa (Busch y Nischko, 1999). Los productos de amplificación son separados por electroforesis en geles de agarosa y los patrones de bandeo son utilizados para identificar la relación entre distintas cepas bacterianas (Franciosa et al., 2001; Abdelhalim et al., 2009). Es una técnica relativamente fácil de implementar que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN que se va a analizar. Los productos de amplificación obtenidos son el resultado de un "mapeo" realizado a lo largo de todo el genoma. Además, es una técnica de bajo costo, se requiere poca cantidad de ADN en comparación con otras metodologías, y es capaz de identificar altos niveles de polimorfismo que nos ayudan a encontrar diferencias intra e interespecífica en bacterias (Ruiz

et al., 2008; Abdelhalim et al., 2009). Sin embargo, una de las principales críticas realizadas al ensayo RAPD ha sido su falta de reproducibilidad, debido a que pequeños cambios en los reactivos utilizados o a la variación en las condiciones de amplificación pueden alterar el patrón de amplificación obtenidos (Meunier y Grimont, 1993; Micheli et al., 1994).

La tipificación basada en el análisis de elementos repetitivos pueden discriminar cepas a nivel de subespecie debido a la distribución de esos elementos en los genomas de varios miembros de Eubacterias e incluyen los ensayos de REP-PCR (secuencias palindrómicas repetitivas extragénicas), ERIC (secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias), y BOX (elementos mosaico repetitivos). Estos métodos están basados en la amplificación de las secuencias de ADN por PCR con un grupo de iniciadores complementarios y secuencias altamente conservadas repetitivas de ADN presentes en múltiples copias en distintas posiciones intergénicas en el genoma de la mayoría de las bacterias Gram negativas y varias de las Gram positivas (Dias et al., 2007).

En la actualidad, las técnicas de biología molecular más empleadas para la diferenciación y el establecimiento de relaciones genéticas entre aislados de *Salmonella* son la electroforesis en geles de campo pulsante (PFGE) y aquellas basadas en el ensayo de PCR. De particular interés para este trabajo, la genotipificación de aislados de *Salmonella* mediante la tipificación de Secuencias Multi Locus (*Multi Locus Sequence Typing*, MLST, por sus siglas en inglés) que se considera como una herramienta que provee un alto poder de discriminación y una poderosa capacidad de análisis de los datos requiriendo una mínima interpretación humana (Kotetishvili et al., 2002).

Los marcadores moleculares anteriormente mencionados poseen distintos poderes de resolución, por ejemplo, la amplificación de secuencias repetitivas y la amplificación de ADN polimórfico amplificado al azar, poseen menor poder de resolución comparado con el poder de resolución que posee la secuenciación del ADN (Fig. 2)

Familia	Género	Especie	Sub-especie	Cepa
	Secuenciación del DNA (MLST, Genomas completos)			
	DNA Ribosomal			
	Reasociación DNA-DNA			
	ARDRA			
	tRNA-PCR			
	ITS-PCR			
	AFLP, PFGE			
	AP-PCR/RAPD			
	Rep-PCR			

Figura 2 . Poder de resolución de diferentes técnicas para obtener marcadores moleculares

Por otro lado, dichos marcadores poseen diferente poder de discriminación (capacidad de un método de distribuir las cepas en el mayor número de grupos). Un índice de discriminación para los métodos de tipificación se describe sobre la base de la probabilidad de que dos cepas no relacionadas estén caracterizadas con el mismo tipo. Este índice se puede utilizar para comparar los métodos de tipificación y seleccionar el más discriminatorio (Hunter y Gaston., 1988)

1.2.3 Tipificación por secuenciación Multilocus: *Multi Locus Sequence Typing* (MLST).

Es una técnica genética para la caracterización taxonómica de bacterias, desarrollada y diseñada para identificar clonas y/o líneas clonales. El procedimiento caracteriza muestras de especies microbianas mediante el uso de secuencias de ADN de fragmentos internos de varios genes de mantenimiento (*housekeeping*, en inglés). El MLST es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo (identificación de grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente),

aunque ha sido ocasionalmente utilizado para dar respuesta a interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo, como caracterización de brotes, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, entre otras (Domínguez et al., 2005).

En general, regiones específicas de los genes analizados son responsables de la mayor parte de la variabilidad observada, mientras que el resto del *locus* presenta un alto grado de conservación. Este hecho ha permitido definir en el desarrollo del análisis mediante MLST que es suficiente analizar solo un fragmento interno de entre 450-500 pb de cada gen. Así, el nivel de variabilidad combinado entre los genes analizados proporciona un alto grado de discriminación y permite reducir el número de *loci* o genes analizados. Así mismo, la secuenciación permite detectar variantes que suponen tan sólo un cambio en una base en el gen analizado, de forma que se calcula que encontrando una media de 30 alelos diferentes por locus, y estudiando tan sólo 7 genes, se podrían distinguir hasta 30^7 genotipos diferentes. Esta circunstancia ha llevado a consensuar 7 como el número de genes que se considera adecuado para el análisis por secuenciación de los fragmentos seleccionados (Domínguez et al., 2005).

La técnica de MLST ha sido utilizada para la caracterización genotípica de varias especies de bacterias patógenas de humano como *Neisseria meningitidis* (Birtles et al., 2005), *Streptococcus pneumoniae* (Dunne et al., 2011), *Staphylococcus aureus* (Lamers et al. 2011), *Vibrio cholerae* (Lee et al., 2006), *Listeria monocytogenes* (Wang et al., 2012), *Escherichia coli* O78 (Adiri et al., 2003) y recientemente *Campylobacter jejuni* (Nielsen et al., 2009). Dicha herramienta ha sido utilizada además para la caracterización genotípica de cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes a distintos serotipos (Fakhr et al., 2005; Kidgell et al., 2002; Ikumapayi et al., 2007; Hughes et al., 2010).

Para el análisis mediante MLST en aislados de *Salmonella enterica*, se recomienda el esquema de 7 *loci* (Fig. 3, Tabla 1). Dichos genes codifican para proteínas con diferentes funciones dentro de la célula como por ejemplo, la biosíntesis de aminoácidos, la síntesis de metabolitos intermediarios del metabolismo basal y la replicación del ADN, estos se expresan de forma constitutiva en todas las células y son necesarios para el funcionamiento y la sobrevivencia celular (Riley, 1993; Gil et al., 2004).

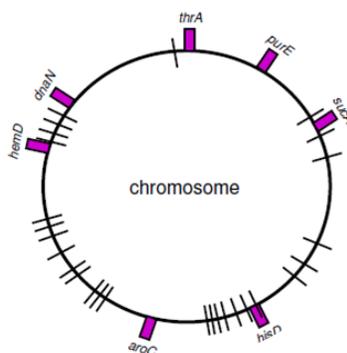


Figura 3. Localización genómica de los genes de mantenimiento o *housekeeping* empleados en el análisis mediante MLST en *Salmonella enterica* Clave: hemD, gen uroporfirinógeno III cosintasa; dnaN, gen DNA polimerasa III subunidad beta; thrA, gen aspartocinasa homoserina deshidrogenasa; purE, gen fosforribosil aminoimidazol carboxilasa; sucA, gen alfa cetoglutarato deshidrogenasa; hisD, gen histidinol deshidrogenasa ; aroC, gen corismato sintasa.

Tabla 1. Esquema de genes de mantenimiento para el análisis por MLST en *Salmonella enterica*

PROTEÍNA	GEN	FUNCIONES
Biosíntesis de pequeñas moléculas		
Aspartocinasa homoserina deshidrogenasa	<i>thrA</i>	Regulación de la biosíntesis de Treonina e Isoleucina
Fosforribosil aminoimidazol carboxilasa	<i>purE</i>	Biosíntesis de novo de nucleótidos de purina
Histidinol deshidrogenasa	<i>hisD</i>	Biosíntesis de Histidina
Corismato sintasa	<i>aroC</i>	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos Fenilalanina, Tirosina y Triptófano
Uroporfirinogeno III cosintasa	<i>hemD</i>	Síntesis de Grupo hem y porfirinas
Metabolismo central intermediario		
Alfa Cetoglutarato deshidrogenasa	<i>sucA</i>	Cataliza la carboxilación oxidativa de α -cetoglutarato
Metabolismo de macromoléculas		
DNA polimerasa III subunidad beta	<i>dnaN</i>	Síntesis y modificación del DNA. Replicación, restricción, modificación, recombinación y reparación del DNA

a) Asignación de *alelos* y ST

Existe una base de datos disponible en internet para la caracterización genotípica por MLST en aislados de *Salmonella enterica* que consiste en comparar las secuencias de ADN de los genes de mantenimiento para asignar alelos y ST, esta base de datos se encuentra a cargo del Instituto de Investigación ambiental (ERI) de la Universidad de Cork Irlanda, en el sitio web: <http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Senterica/>. Hasta la fecha (14 de agosto del 2013) se encuentran registradas 1793 ST diferentes de un total de 6094 ST depositadas e incluye información de cada uno de los aislados ahí depositados como por ejemplo: serotipo, fagotipo, complejos clonales, año de aislamiento, región geográfica, detalles del hospedero, etc.

1.3 Epidemiología molecular de *S. enterica* empleando MLST

Kotetishvili *et al.*, (2002) fueron los primeros que emplearon un ensayo de MLST basado en 4 genes (16S RNA, *pduF*, *glnA*, y *manB*) para discriminar tanto entre serotipos como entre cepas de origen clínico y ambiental. El ensayo MLST mostró un mejor poder de discriminación que el PFGE sobre las cepas analizadas. El análisis de los genes *manB*, *glnA* y *pduF* mediante Splitstree encontró que los orígenes evolutivos de estos genes son distintos y que han estado sujetos a recombinación. El primer ensayo de MLST basado en un esquema de 7 genes de mantenimiento (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* y *thrA*) fue realizado por Kidgell *et al.* (2002). Los genes empleados se eligieron del genotipo de una cepa del serotipo Typhi debido a que se encuentran dispersos a lo largo de todo el cromosoma, a que son genes circundantes tienen funciones conocidas y a la ausencia de presión selectiva en el proceso de diversificación. El estudio mostró una composición altamente clonal en el serotipo Typhi debido a la identificación de solo tres ST en una colección de 26 aislados. El uso de mediciones de reloj molecular basado en dos polimorfismos de nucleótidos sinónimos en los aislados analizados permitió estimar en 50, 000 años la separación del serotipo Typhi del resto de serotipos de *S. enterica*, con un rango entre 15, 000 y 150, 000 años.

Después de estos dos reportes pioneros se desarrollaron esquemas de MLST que presentaron variantes en el número y tipo de genes empleados en el ensayo. La inclusión de los

genes *pefB* y *fimH* de fimbria y de virulencia *hilA* incrementó el poder de discriminación entre aislados del serotipo Typhimurium (Foley et al., 2006).

Otro esquema desarrollado empleando 7 genes de mantenimiento y virulencia distintos a los empleados previamente (*panB*, *fimA*, *aceK*, *mdh*, *icdA*, *manB*, y *spaN*) (Sukhnanand et al., 2005) mostró un alto poder discriminatorio. En este estudio se documentó por primera vez que dentro de una misma secuencia tipo se podían encontrar aislados de serotipos diferentes o, dicho en otros términos, que había serotipos polifiléticos y otros monofiléticos. Este mismo trabajo propone la reducción de 7 genes al uso de los tres genes con mayor variación (*manB*, *fimA*, *mdh*) para realizar el análisis de MLST con buenos resultados. Este último esquema de MLST basado en tres genes (*fimA*, *manB*, y *mdh*) fue utilizado para analizar 335 aislados de *S. enterica* de muestras de humano y bovino, dividiendo a los aislados de estudio en 72 ST, 7 de las cuales agrupaban a cepas de distinto serotipo. Se encontraron tanto ST compartidas como específicas de cada uno de los hospederos analizados (Alcaine et al., 2006.). Dicho estudio también mostró que las cepas del serogrupo 4,5,12:i:- estudiadas están filogenéticamente relacionadas con las del serotipo Typhimurium, y que las cepas del serotipo Newport estaban divididas en dos líneas evolutivas independientes, cuyas frecuencias difieren entre los hospederos estudiados. Algunos de los aislados mostraron dos copias del gen *manB* y deleciones en el gen *fimA*, cambios posiblemente relacionados con vías de rápida diversificación en moléculas de superficie.

La combinación de dos genes de mantenimiento con dos genes de flagelina (*fliC* y *fliB*) desarrollado posteriormente por Tankouo-Sandjong et al. (2007) mostró un gran poder de discriminación, encontrándose una ST/1.23 aislados analizados; dicho valor fue superior al reportado por los trabajos de Sukhnanand et al. (2005) de una ST/2.64 aislados y Kidgell et al. (2002) de una ST/2.2. También se han empleado genes de profagos para el ensayo MLST en aislados del serotipo Typhimurium, con mejores resultados de discriminación que el ensayo convencional de 7 genes de mantenimiento (Ross et al., 2005). El estudio de Tankouo-Sandjong et al. (2007) muestra la transferencia horizontal y eventos de recombinación del gen *fliC* entre distintos serotipos, así como el origen polifilético de distintos serotipos, en concordancia con estudios previos.

El esquema de MLST de 7 alelos ha permitido evaluar a nivel global la expansión de la resistencia a antibióticos mediada por integrones en *S. enterica*, determinando que tanto la expansión clonal como la transferencia horizontal juegan un papel importante en dicho fenómeno (Krauland et al., 2009).

Una opción que se ha ensayado con buenos resultados es la combinación de MLST con otras técnicas de tipificación, por ejemplo, se ha reportado que la combinación del análisis de dos genes de virulencia (*sseL* y *fimH*) con dos *loci* CRISP provee de un poder de discriminación elevado para aislados del serotipo Enteritidis, diferenciando aislados de un brote y clones de otros serotipos (Liu et al., 2011)

En el único reporte para México de análisis de aislados de *Salmonella enterica* mediante MLST, Wiesner et al. (2009) analizan 114 aislados del serotipo Typhimurium obtenidos de alimentos cárnicos e intestinos animales, así como de heces de humanos sanos y con cuadro clínico de diarrea, provenientes de cuatro estados distintos, incluido Michoacán; 66 de estos son analizados mediante el esquema de 7 genes y 48 mediante el esquema de tres genes. En dicho trabajo se encuentran tres nuevos alelos para los genes *housekeeping* analizados, los cuales fueron denominados *purE70*, *purE110* y *sucA144*. Los aislados se distribuyeron en 4 ST, las cuales fueron ST19, ST213, ST302 y ST429. De manera interesante, al momento del estudio se encontró que la ST429 estaba presente solo en México (únicamente en Michoacán) y Zimbawe, y que las ST213 (Michoacán, Sinaloa, Yucatán, San Luis Potosí) y ST302 (Sonora) se encontraban exclusivamente en México. La ST19 presenta una amplia distribución geográfica a nivel global. Las ST19 (n=41) y ST213 (n=68), fueron los genotipos más abundantes, estando presentes en todos los estados analizados durante todo el periodo de muestreo que abarcó el periodo 2000 al 2005. Un hallazgo importante fue que la ST213 predominaba en muestras de alimentos animales más que en muestras clínicas humanas y que dicho genotipo modificó su abundancia, incrementando del año 2000 al 2005 en la mayoría de los estados analizados y volviéndose el genotipo más frecuente hacia el final del estudio en todas las áreas, indicando un reemplazo de la ST19, la cual había sido el más abundante al inicio del estudio. Por otra parte, los resultados muestran una estrecha correlación entre las ST y la presencia de

elementos genéticos de resistencia o virulencia. Así, el plásmido portador de genes de virulencia pSTV fue encontrado únicamente en las ST19 y ST302, la isla de genes de resistencia a antibióticos SGI1 estuvo presente únicamente en aislados ST19, todos los aislados que tenían el plásmido pCMY-2, portador de genes de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, así como los que portaban el integrón IP-1, también relacionado con determinantes de resistencia a antibióticos, fueron ST213

Las conclusiones derivadas del estudio de Wiesner et al. (2009) incluyen: existen mecanismos efectivos de dispersión de *S. Typhimurium* por todo el país, por lo que puede considerarse que los aislados analizados constituyen una sola población. Los aislados provenientes de humanos y muestras animales están genéticamente relacionados, lo cual es congruente con la transmisión de *S. enterica* al hombre mediante la cadena de producción de alimentos. Las clonas presentes en humanos sanos son iguales a las presentes en individuos enfermos, lo que muestra que la densidad del inóculo y el estado inmunológico del individuo son determinantes en la manifestación de un cuadro clínico.

Recientemente Achtman *et al.* (2012) han propuesto el reemplazo definitivo del esquema de serotipificación establecido hace 70 años en *S. enterica* por la tipificación mediante MLST. Entre los argumentos señalados por los autores para desechar el esquema de serotipificación incluyen el bajo rendimiento, alto costo, el requerimiento de una gran batería de anticuerpos y la complejidad técnica para obtenerlos, la susceptibilidad de dicha técnica para generar errores de tipificación y el hecho de que no es adecuada para la automatización.

No obstante, el principal argumento contra la serotipificación consiste en la información que proporciona, lo cual genera en algunos casos interpretaciones epidemiológicas erróneas (Achtman *et al.*, 2012). La serotipificación puede agrupar a cepas que no necesariamente poseen las mismas características de virulencia o que no guardan relación epidemiológica, debido a que detecta diferencias esenciales en los fondos genéticos de las cepas comparadas. Adicionalmente, la serotipificación puede separar a individuos genéticamente cercanos, debido a que no poseen los mismos determinantes antigénicos, los cuales pudieron haber sido adquiridos mediante transferencia horizontal. Aún más, la serotipificación tiene problemas para tipificar aquellas cepas que no presentan algunos de los determinantes antigénicos.

Achtman *et al.* (2012) hacen énfasis en el hecho de que el análisis mediante MLST de *S. enterica* subs. *enterica* muestra una estructura de población en grupos (*clusters*) bien definidos que semejan una estrella explotando (*starburst*) a los cuales designan grupos eBG. Estos grupos son soportados estadísticamente por distintos tipos de análisis realizados con diferentes algoritmos, lo que para los autores implica la generación de grupos “naturales”, los cuales predicen que en su mayoría dichos grupos serán estables a largo plazo no obstante la generación de secuencias genómicas adicionales o la inclusión de más aislados y ST en la base de datos. No obstante, aunque la pertenencia de un grupo de organismos a un eBG implica que estos están estrechamente relacionados por descendencia de un ancestro común, los datos actuales no permiten afirmar con certeza por qué existen y como emergieron, debido a las inconsistencias en las velocidades de mutación de los genes de distintas bacterias patógenas (Achtman *et al.*, 2012). El poder predictivo de la pertenencia de un aislado a uno de estos grupos es más fuerte, en todo caso, en el área epidemiológica, particularmente en relación a la adaptación a hospederos.

Desde el punto de vista de la complejidad técnica, el costo y la rapidez para la obtención de resultados, el MLST es comparable con la serotipificación o aún más accesible. Lo anterior, aunado al hecho de la existencia de una base de datos de acceso global, hace del MLST una técnica adecuada para la tipificación de *S. enterica* que posibilita la comparación y el análisis de los resultados a cualquier escala geográfica. Así, el análisis mediante otras técnicas más discriminatorias para ciertos serotipos (PFGE, MLVA, fagotipificación) es recomendado para el estudio de brotes o seguimientos locales. Dado que todavía en un futuro cercano la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) es más eficiente mediante MLST que por análisis de genomas completos, es de esperar que esta técnica no sea reemplazada en el corto plazo (Achtman *et al.*, 2012).

1.3.1 Estudios de diversidad genética de *Salmonella enterica* en el Estado de Michoacán

En el estado de Michoacán ya se han realizado análisis para evaluar la diversidad genética en aislados de *Salmonella enterica* haciendo uso de diferentes marcadores moleculares.

En un estudio realizado en el 2011, Regalado- Pineda (2011) evaluó la diversidad genética de 130 aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos en el estado de Michoacán durante los años 2008 y 2009. Mediante la serotipificación convencional se encontraron 34 serotipos diferentes. El dendograma generado mediante marcadores obtenidos de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) mostró 28 genotipos distintos a un corte de similitud a un 95%. En dicho estudio no se encontró correlación entre los genotipos y el tipo de muestra de procedencia del aislado, la localidad de origen o el serotipo. Al analizar los genotipos de los serotipos mayoritarios (Typhimurium, Anatum y Agona) se encontró que algunos de éstos tienen una amplia distribución geográfica en el estado de Michoacán, mientras que otros se encuentran restringidos a ciertas áreas.

En otro estudio realizado por Vázquez-Narváez (2012) se evaluó la diversidad genética de algunos de los aislados de *S. enterica* utilizados en el estudio de Regalado-Pineda. Se tipificaron un total de 102 aislados haciendo uso de tres marcadores moleculares basados en la amplificación de elementos repetitivos ERIC, REP y BOX. El análisis de agrupamiento realizado empleando dichos marcadores mostró un número diferente de genotipos para cada ensayo a un corte de similitud de 95%. Para el ensayo REP se encontraron 19 genotipos, con el marcador BOX 20 genotipos y para ERIC 22 genotipos. También, se encontraron diferentes valores de poder de discriminación, para REP se obtuvo un poder de discriminación de 0.953, para BOX el índice de discriminación fue igual a 0.964 y para ERIC de 0.959. Se realizó el análisis de agrupamiento mediante la combinación de estos tres marcadores y el análisis arrojó al mismo nivel de corte, un total de 44 genotipos y un índice de discriminación de 0.984. Los resultados obtenidos de este estudio muestran que los ensayos de amplificación de elementos repetitivos presentan un alto nivel de discriminación entre los aislados de estudio y los patrones de agrupamiento de los dendogramas generados sugieren que varios de los genotipos de *Salmonella enterica* encontrados tienen una gran capacidad de dispersión por el estado de Michoacán.

2. JUSTIFICACIÓN

En México un alto porcentaje de las enfermedades diarreicas son originadas por alimentos contaminados. Los estudios realizados sobre *Salmonella* en México generalmente se enfocan al registro de la incidencia y la identificación de los serotipos. Con la finalidad de tener información que permita generar mejores estrategias de vigilancia epidemiológica y prevención de brotes resulta importante incluir técnicas genético-moleculares para la tipificación de aislados, y la evaluación de la diversidad genética en *Salmonella enterica*.

El comercio de carne y otros productos alimenticios entre distintas áreas geográficas con distintos niveles de control sobre la higiene en la producción puede facilitar la dispersión de líneas clonales de *Salmonella* dentro del estado de Michoacán y en el país. Por lo anterior, es necesario aplicar técnicas con un mayor poder de discriminación entre aislados. La combinación de técnicas convencionales con técnicas genético moleculares posibilita un mejor entendimiento del comportamiento epidemiológico y de la capacidad de dispersión de ciertos genotipos. La tipificación genética de aislados de *S. enterica* provenientes de alimentos permite establecer relaciones con cepas obtenidas de las infecciones y brotes, posibilitando una rápida identificación de la fuente de contaminación. El grado de polimorfismo genético dentro de una población es un factor de vital importancia en los estudios de epidemiología molecular, por lo que la detección y diferenciación genética de aislados provenientes de productos alimenticios de origen animal pueden tener un alto impacto en el desarrollo de estudios epidemiológicos posteriores.

En el estado de Michoacán todavía son escasos los estudio de tipificación genético molecular de *S. enterica*. En el caso de tipificación mediante MLST, el número de aislados tipificados en el estado es particularmente bajo y únicamente del serotipo Typhimurium. Incrementar el número de aislados y serotipos tipificados mediante MLST permitirá depositar las secuencias tipo (ST) encontradas en una base de datos internacionales. Esto, a su vez, ayudará a comparar los genotipos encontrados en el estado con los reportados para otras regiones del mundo. También permitirá, a futuro, conocer la persistencia o el recambio de genotipos dentro del estado. Dichas comparaciones geográficas y temporales son una herramienta muy útil para conocer los patrones de dispersión y permanencia de genotipos

particularmente virulentos o resistentes a antibióticos. Esta información es muy valiosa para el diseño de estrategias a corto y largo plazo para la prevención de brotes. Por esto, con el fin in de mejorar los estudios epidemiológicos en el Estado, en el presente trabajo se pretende tipificar a una colección de cepas del estado de Michoacán mediante *Multi Locus Sequence Typing*.

3. HIPÓTESIS

Existen múltiples perfiles alélicos en aislados de *S. enterica* obtenidos de alimentos del estado de Michoacán, algunos de los cuales son específicos de la región y otros de dispersión global.

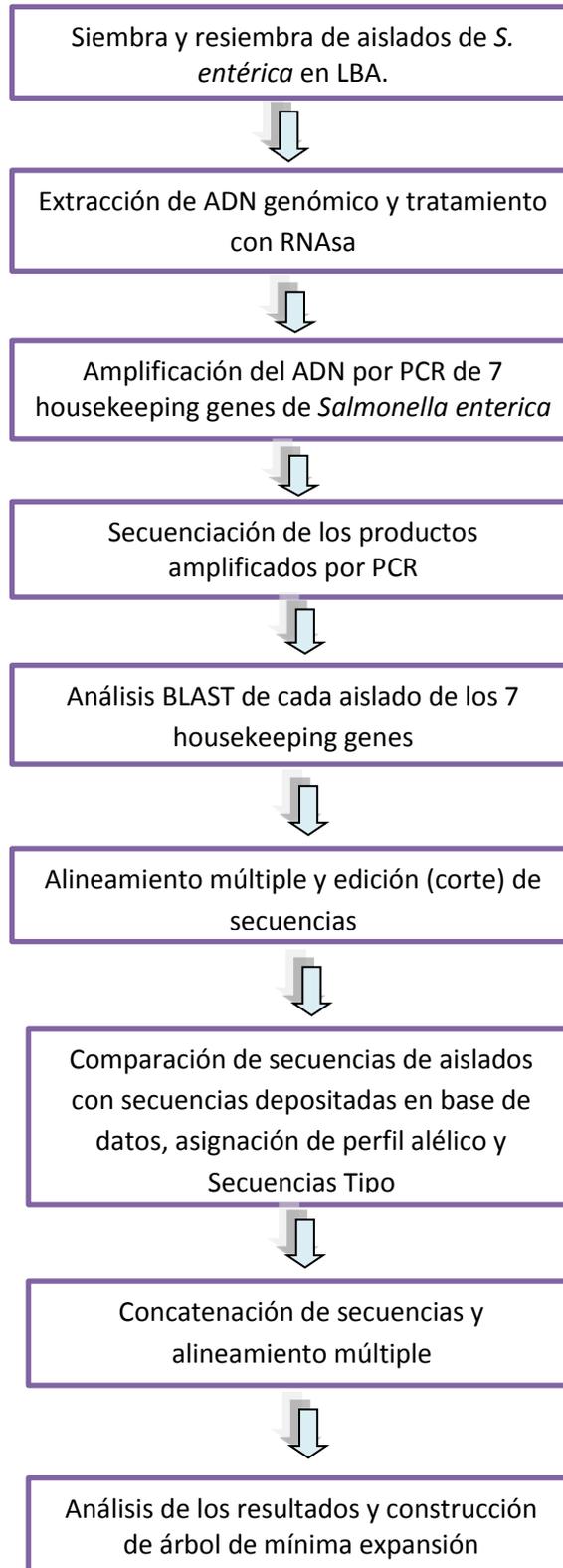
4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genóticamente aislados de *Salmonella enterica* encontrados en productos cárnicos y derivados lácteos del Estado de Michoacán

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los perfiles alélicos y las secuencias tipo obtenidas para las cepas de *S. enterica* del estado de Michoacán con otras regiones.
- Establecer relaciones entre las secuencias tipo y los posibles serotipos a los que pertenecen las cepas no tipificadas mediante la serotipificación convencional.
- Establecer grupos clonales entre las cepas analizadas.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Material biológico

Se analizaron 72 cepas de *S. enterica*. Todas las cepas analizadas fueron aisladas de productos cárnicos y derivados lácteos del estado de Michoacán por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán durante los años del 2008 al 2011 (LESPM, comunicación personal; Regalado- Pineda, 2011) (Tabla 2.)

Tabla 2. Aislados utilizados en este estudio

AISLADO	SEROTIPO	PRODUCTO	LOCALIDAD	AÑO
2	Anatum	Ch	Morelia	2009
4	Typhimurium	QF	Ciudad Hidalgo	2009
5	Anatum	QF	La Piedad	2009
10	Serogrupo B	CR	Pastor Ortíz	2009
13	Serogrupo B	CR	Uruapan	2009
15	Anatum	CR	Ciudad Hidalgo	2009
16	Typhimurium	CR	Morelia	2009
17	Anatum	CR	Morelia	2009
22	Anatum	Ch	Apatzingán	2009
24	Typhimurium	Ch	Lázaro Cárdenas	2009
26	Agona	Ch	Apatzingán	2009
28	Typhimurium	Ch	Uruapan	2009
29	Anatum	CC	Morelia	2009
32	Serogrupo B	Ch	Pátzcuaro	2009
38	Serogrupo B	CR	Uruapan	2008
39	Typhimurium	CR	Apatzingán	2008
40	Agona	CR	Lázaro Cárdenas	2008
43	Anatum	Ch	Lázaro Cárdenas	2008
44	Anatum	CR	Uruapan	2008
45	Anatum	CR	Huetamo	2008
47	Serogrupo B	CR	Lázaro Cárdenas	2008
48	Serogrupo c1	CR	Lázaro Cárdenas	2008
49	Salmonella35	CR	Uruapan	2008
53	Anatum	CR	Lázaro Cárdenas	2008
54	Typhimurium	CR	Tacámbaro	2009
56	Anatum	CR	Morelia	2009
62	Agona	Ch	Yurécuaro	2009
65	Agona	CR	Mújica	2008
67	Serogrupo B	QF	Zacapu	2008
68	Serogrupo D monofasica	CR	Lázaro Cárdenas	2009
69	Typhimurium	CR	Lázaro Cárdenas	2009
70	Serogrupo E1	Ch	Lázaro Cárdenas	2009
75	Serogrupo B	CR	Zamora	2009
86	Agona	Ch	Apatzingán	2008
89	Typhimurium	Ch	Charo	2008
90	Agona	Ch	Apatzingán	2008

Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

96	Typhimurium	CR	Zamora	2008
97	Serogrupo B	CR	Lázaro Cárdenas	2009
99	Serogrupo c1	CR	Lázaro Cárdenas	2008
100	Serogrupo E1 monofásica	L	Zitácuaro	2008
112	Agona	CR	Lázaro Cárdenas	2009
113	Serogrupo B	CR	Lázaro Cárdenas	2009
115	Typhimurium	QA	Tanhuato	2009
125	Serogrupo B	Ch	Uruapan	2009
127	Typhimurium	CR	La Piedad	2008
132	Agona	Ch	Morelia	2010
133	Anatum	CR	Lázaro Cardenas	2010
139	Anatum	QF	Tuxpan	2010
146	Agona	Ch	Apatzingán	2010
149	Agona	CR	Huetamo	2010
153	Serogrupo E1	Ch	Morelia	2010
155	Anatum	CR	Zamora	2010
156	Agona	CR	Angamacutiro	2010
157	Serogrupo B	CR	Lázaro Cárdenas	2010
160	Serogrupo E1	CC	Yurécuaro	2010
161	Agona	L	Zamora	2010
167	Serogrupo B	Ch	Zamora	2010
180	Serogrupo c1	CR	Morelia	2010
193	Serogrupo B	Ch	Uruapan	2011
196	Typhimurium	Ch	Pátzcuaro	2011
200	Serogrupo B	CR	Morelia	2011
201	Serogrupo D monofásica	CR	Lázaro Cárdenas	2011
202	Serogrupo D monofásica	CR	Lázaro Cárdenas	2011
208	Anatum	CR	Morelia	2011
214	Serogrupo B	CR	Ocampo	2011
224	Serogrupo B monofásica	L	Zamora	2011
227	Serogrupo B	CR	Mújica	2011
228	Serogrupo E4	P	Mújica	2011
229	Anatum	CR	Lázaro Cárdenas	2011
231	Agona	CR	Lázaro Cárdenas	2011
233	Serogrupo B	CC	Tuxpan	2011
236	Serogrupo B	CC	Ciudad Hidalgo	2011

Clave: QF: Queso Fresco, CR: Carne de res, CC: Carne de cerdo, Ch: Chorizo, L: Longaniza, QA: Queso asadero, P: pollo. Todos los productos cárnicos fueron obtenidos de productos crudos, excepto el aislado número 89 que fue Obtenido de producto guisado.

De un total de 72 aislados de *Salmonella enterica* se tienen 16 aislados de *Salmonella* Anatum, 13 aislados de *Salmonella* Agona, 12 de *Salmonella* Typhimurium y 31 aislados confirmados a nivel de serogrupo (Fig. 4).

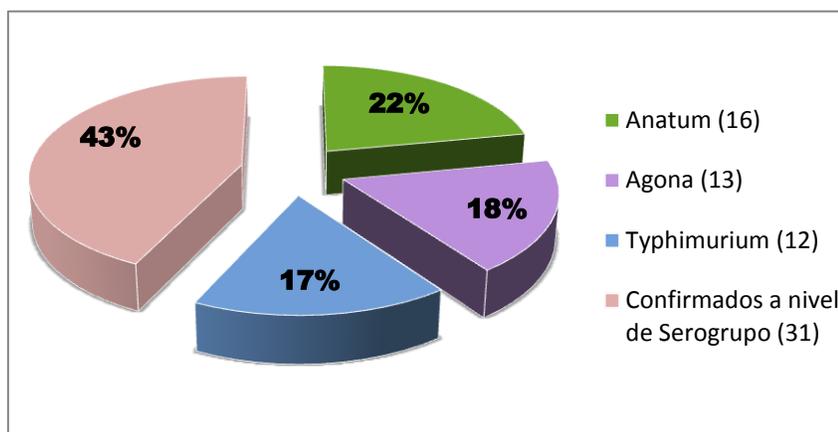


Figura 4. Porcentaje de serotipos de aislados de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio

De los 31 aislados que sólo se encuentran asignados a nivel de serogrupos se tienen seis serogrupos diferentes, el serogrupo B con la mayoría de los aislados con un total de 19, seguido por el serogrupo E1 con 4 aislados, posteriormente los serogrupos C1 y D con 3 aislados cada uno y por último los serogrupos E4 y 35 con 1 aislado cada uno (Fig. 5).

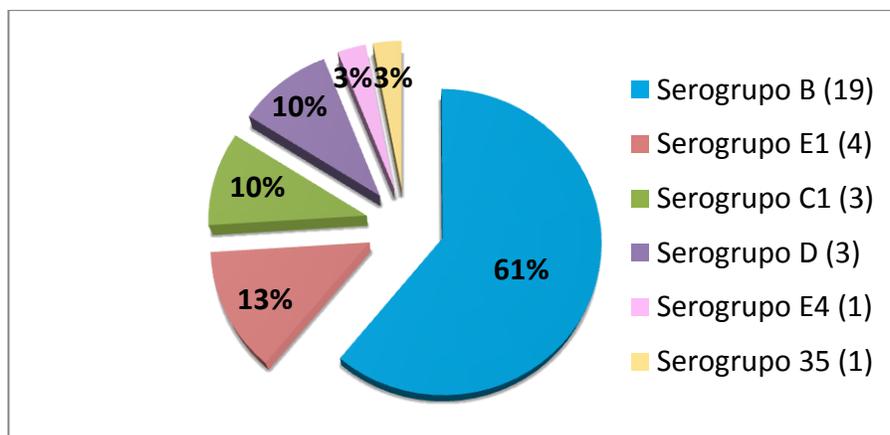


Figura 5. Porcentajes de aislados de *Salmonella enterica* confirmados a nivel de serogrupo utilizados en este estudio

Las cepas se aislaron de diversos productos cárnicos y derivados lácteos (Fig.6).

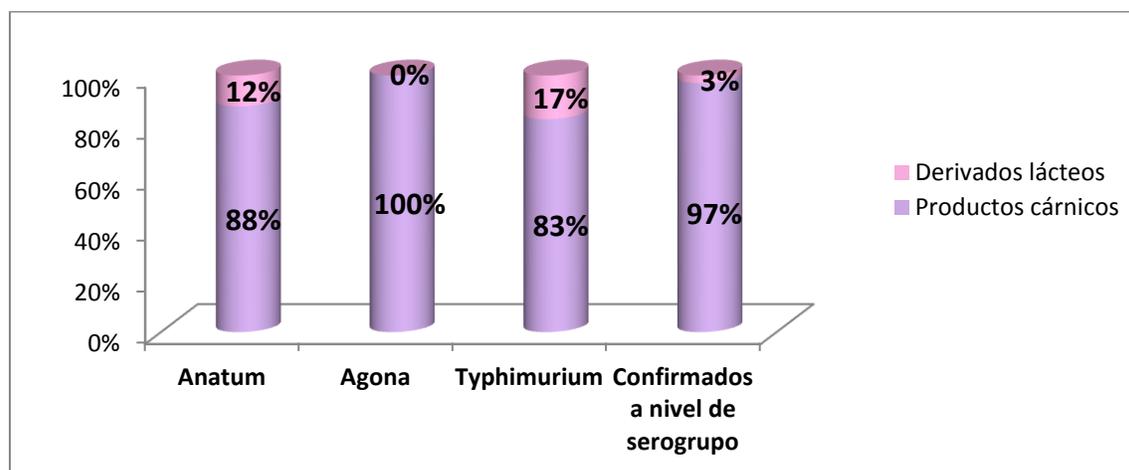


Figura 6. Porcentaje de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de diversos productos cárnicos y derivados lácteos.

7.2. Extracción del ADN de los aislados bacterianos

Las colonias bacterianas crecidas en medio de cultivo LBA durante 8 h a 37°C se cosecharon con ayuda de una espátula estéril y se colocaron en un microtubo de 1.5 ml para agregar 400 μ L de buffer de lisis (Tris-HCl 100mM pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100mM, EDTA 50mM). Las muestras se agitaron vigorosamente en vórtex durante 10 min. A continuación se agregaron 400 μ L de cloroformo agitándose en vórtex durante 5 min. Se centrifugó durante 10 min a 1500 x g y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio cuidando de no arrastrar la fase orgánica. Se extrajo con 1 volumen de fenol-cloroformo, centrifugando durante 5 min a 1500 x g y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. El ADN obtenido se precipitó con 1 volumen de isopropanol frío, incubando 10 min a -20°C y centrifugando durante 10 min a 1500 x g. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó 2 veces con 250 μ L de etanol 70% dejándose secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en el volumen mínimo de agua, aproximadamente 20 μ L. La integridad del ADN obtenido se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, empleando técnicas convencionales (Sambrook y Russell., 2001). El ADN aislado se guardó a -20°C hasta su utilización.

7. 3. Amplificación por PCR de los genes de mantenimiento

Para la optimización de las condiciones de amplificación se llevaron a cabo ensayos de PCR de los siete *loci* empleando el ADN de la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. La reacción de PCR inicial se desarrolló con 0.5 μ M de cada uno de los iniciadores (Tabla 4), 200 μ M de cada uno de los cuatro deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (InVitrogen, USA), 20 mM de Tris-HCl (pH 8.2), 1.5 mM de MgCl₂, 0.5U de *Taq* polimerasa (InVitrogen, USA) y 30 ng de ADN en un volumen total de 30 μ l (Kumar et al., 2008b). Se utilizó el siguiente programa de amplificación en un termociclador Applied Biosystems Gene Amp 2700 (USA): un ciclo a 94 °C durante 10 min seguido de 32 ciclos a 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Se realizó un paso final de extensión a 72 °C durante 5 min (Dione et al., 2011). Estas condiciones iniciales empleadas en la cepa de referencia se fueron modificando para optimizar el ensayo de PCR de cada uno de los 7 *loci* en todos los aislados de estudio. La obtención de una sola banda para cada gen en suficiente cantidad para ser secuenciada en todas las cepas analizadas se logró con las condiciones que se encuentran en la tabla 3 y los programas que a continuación se detallan.

Tabla 3. Condiciones empleadas en los ensayos de PCR para amplificar los genes de mantenimiento en aislados de *Salmonella enterica*.

REACTIVOS	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>
Tris-HCl	20 mM						
Deoxinucleótidos	200 μ M						
Iniciador Directo	0.4 μ M	1.0 μ M	1.0 μ M	0.4 μ M	0.8 μ M	0.4 μ M	0.5 μ M
Iniciador Reverso	0.4 μ M	1.0 μ M	1.0 μ M	0.4 μ M	0.8 μ M	0.4 μ M	0.5 μ M
Cloruro de Magnesio	1.5 mM	2.0 mM	2.0 mM	1.5 mM	2.0 mM	2.0 mM	2.0 mM
Taq polimerasa	0.5 U/ μ L	0.5 U/ μ L	1.0 U/ μ L	0.5 U/ μ L	0.5 U/ μ L	0.5 U/ μ L	1.5 U/ μ L
ADN templado	30 ng	100 ng					

Todas la reacciones se llevaron a un volumen final de 30 μ L.

Las reacciones de amplificación de los genes *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE* y *sucA* se realizaron en un termociclador Applied Biosystems Gene Amp 2700 (USA) con el siguiente programa: un ciclo a 94 °C durante 10 min seguido de 32 ciclos a 94 °C por 1 min, 58 °C por 1

min y 72 °C por 1 min. Se realizó un paso final de extensión a 72 °C durante 5 min (Dione et al., 2011). Las reacciones de amplificación para el gen *thrA* se realizaron en un termociclador Corbert research CG1-96 (USA) con el siguiente programa de amplificación: un ciclo de 94 °C durante 10 min seguido de 32 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 45 seg y 72 °C por 1 min. Se realizó un paso final de extensión a 72 °C durante 5 min. Todos los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001) y las imágenes de los geles fueron capturadas en un fotodocumentador ChemiDOC (BioRad, USA).

Tabla 4. Iniciadores utilizados para la caracterización de aislados de *Salmonella enterica* por Multi Locus Sequence Typing.

Región	Gen	Secuencia de los iniciadores	Tamaño del fragmento (pb)
Aspartocinasa homoserin deshidrogenasa	<i>thrA</i>	F 5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3' R 5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3' R1 5'-GTGCGCATACCGTCGCCGAC-3'	852
Fosforribosil aminoimidazol carboxilasa	<i>purE</i>	F 5'-ATGCTTCCCGCAATAATCC-3' R 5'-TCATAGCGTCCCCGCGGATC-3' R1 5'-CGAGAACGCAAACCTTGCTTC-3'	510
Alfa Cetoglutarato deshidrogenasa	<i>sucA</i>	F 5'-AGCACCGAAGAGAAACGCTG-3' R 5'-GGTTGTTGATAACGATACGTAC-3'	643
Histidinol deshidrogenasa	<i>hisD</i>	F 5'-GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC-3' R 5'-CTGAACGGTCATCCGTTTCTG-3'	894
Corismato sintasa	<i>aroC</i>	F 5'-CCTGGCACCTCGCGTATAC-3' R 5'-CCACACACGGATCGTGCG-3'	826
Uroporfirinogeno III cosintasa	<i>hemD</i>	F 5'-ATGAGTATTCTGATCACCCG-3' F1 5'-GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG-3' R 5'-ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA-3'	666
DNA polimerasa III subunidad beta	<i>dnaN</i>	F 5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3' R 5'-AATTTCTCATTGAGAGGATTGC-3' R1 5'-CCGCGAATTTCTCATTGAG-3'	833

(Stepan RM et al., 2011; http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html)

Para los genes *thrA*, *purE*, *hemD* y *dnaN* en los que indican tres iniciadores, se hizo uso de una sola combinación utilizando de los iniciadores F y R.

7.4. Secuenciación de los productos de PCR

Los productos amplificados fueron secuenciados por MacroGen Corp. (USA) en un secuenciador LifeTech's AB 3730XL. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias depositadas en el GenBank empleando el algoritmo Blastn

La secuencia de cada uno de los aislados y de cada uno de los siete *loci* que componen el esquema para la tipificación de *S. enterica* por MLST fue analizada usando el sitio web de la base de datos para *Salmonella enterica* <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica> las secuencias de los aislados se alinearon y se compararon con las secuencias que ya se encuentran depositadas en dicha base de datos, una vez alineadas las secuencias, la base de datos asignó un número y la combinación de los siete números recibe el nombre de perfil alélico que define a la secuencia tipo.

7.5 Asignación de Secuencias Tipo

Una vez que se obtiene el perfil alélico, es introducido a la base de datos y la combinación de alelos asigna la secuencia tipo y el complejo clonal al que pertenece dicho perfil.

7.6 Análisis filogenético

Se realizó un alineamiento múltiple para todos los aislados utilizados en este estudio y por separado para cada uno de los 7 genes *housekeeping* utilizando una secuencia control para cada gen disponible en la base de datos <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica.html>. Para el alineamiento múltiple se utilizó el programa ClustalX (Thompson et al., 1997) Las secuencias obtenidas del alineamiento múltiple de los aislados de *Salmonella enterica* fueron editadas manualmente en el programa Bioedit versión 3.03 (Hall TA., 1999) para definir el punto de corte de cada uno de los *loci*. Posteriormente las secuencias de los 7 *loci* por aislado fueron concatenadas para realizar un nuevo alineamiento múltiple utilizando el programa ClustalX y la generación de un dendograma se realizó utilizando el programa MEGA versión 5.2 (Tamura et al., 2011). Este mismo paquete se utilizó para evaluar el modelo óptimo de evolución para el cálculo de las distancias genéticas. Las distancias genéticas de los loci concatenados se calcularon mediante $K2 + G + I$ y el patrón de agrupamiento se generó mediante Neighbour-Joining.

Determinación de grupos eBurst

La generación de árboles de mínima expansión y grupos genéticos entre los aislados de estudio se realizó empleando el paquete PhyloViz (Fransico *et al.*, 2012). Dicho software utiliza el algoritmo goeBurst para construir árboles de mínima expansión y agrupa los genotipos (ST) en distintos niveles de variaciones de *loci*. El algoritmo goeBurst constituye una optimización global del algoritmo eBurst (Feil *et al.*, 2004), por lo que en general la misma aproximación es utilizada para la interpretación de resultados con ambos algoritmos. Para la formación de complejos o grupos de ST se utilizó el criterio descrito por Achtman *et al.* (2012), el cual se describe brevemente. Los grupos formados por distintas ST se designan como grupos eBG (acrónimo del inglés *eBurstGroup*), esta designación se considera más apropiada que las de Complejos Clonales o Complejos de ST utilizadas en diversas publicaciones debido a que la primera implica clonalidad de las ST agrupadas, lo cual no es el caso en *S. enterica*, en la que la recombinación entre diferentes líneas genéticas ha sido documentada; por otra parte, el término de Complejos de ST no especifica un algoritmo de agrupamiento en particular. Así, de acuerdo con Feil *et al.* (2004) se designa como un eBG a cualquier grupo de dos o más ST que comparte seis de los siete alelos que definen una ST.

8. RESULTADOS

8. 1. ADN extraído de los aislados utilizados en este estudio.

Se extrajo el ADN de 72 Aislados de *Salmonella enterica* de los serotipos Typhimurium, Anatum, Agona, así como de los aislados tipificados a nivel de serogrupo. El ADN extraído en todos los aislados fue de alto peso molecular (Figura 7).

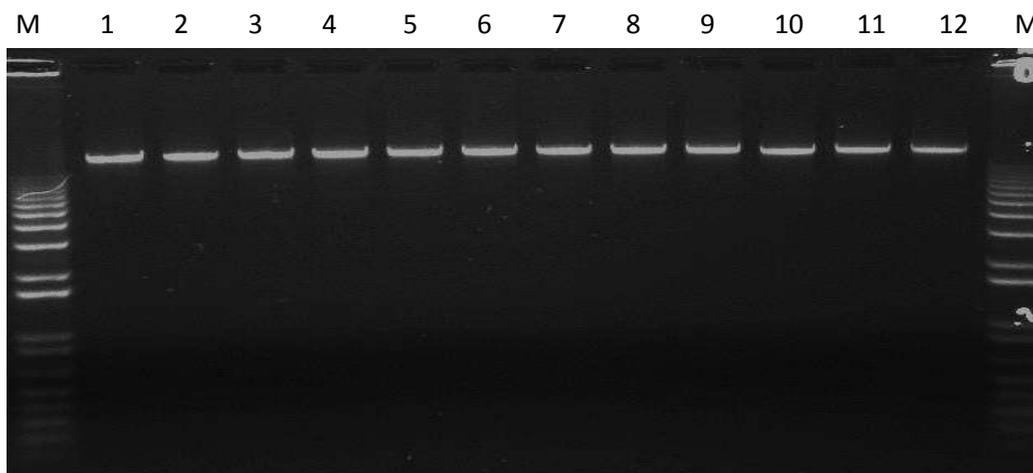


Figura 7. ADN extraído de las cepas de *Salmonella enterica* en este estudio. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles: M, marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (invitrogen, USA); 1-12 ADN obtenido de aislados de *Salmonella enterica*.

8.2. Amplificación por PCR de los genes de mantenimiento

Se amplificaron los siete *loci* con la cepa de referencia *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028 obteniéndose amplicones con el peso molecular esperado para cada uno de los siete *loci* (Figura 8).

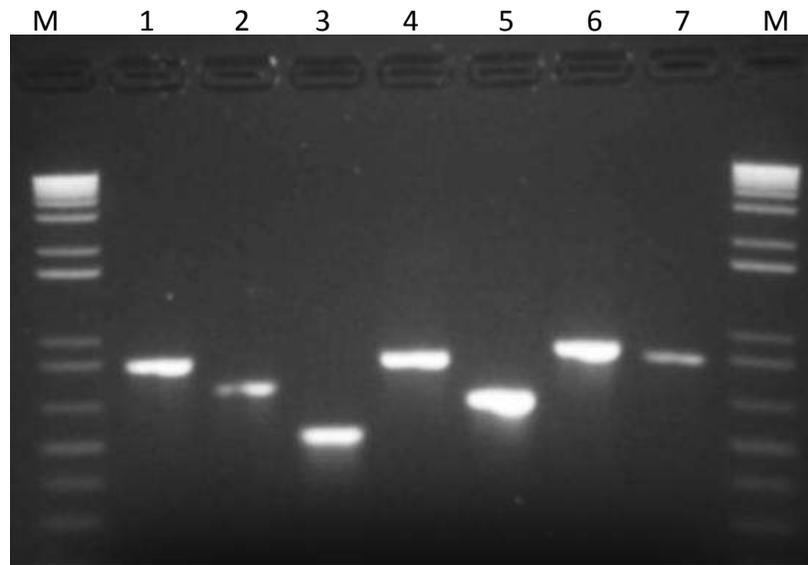


Figura 8. Amplicones de los genes de mantenimiento obtenidos con ADN de la cepa de referencia *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028.

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra los Carriles: M. Marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (invitrogen, USA) 1: *dnaN*, 2: *hemD*, 3: *purE*, 4: *aroC*, 5: *sucA* 6: *hisD* y 7: *thrA*.

Una vez optimizadas las condiciones de amplificación con la cepa de referencia se realizaron las amplificaciones de los 7 *loci* para cada uno de los aislados de estudio. Se obtuvieron los amplicones para cada uno de los 7 genes con el peso molecular esperado (Fig. 9)

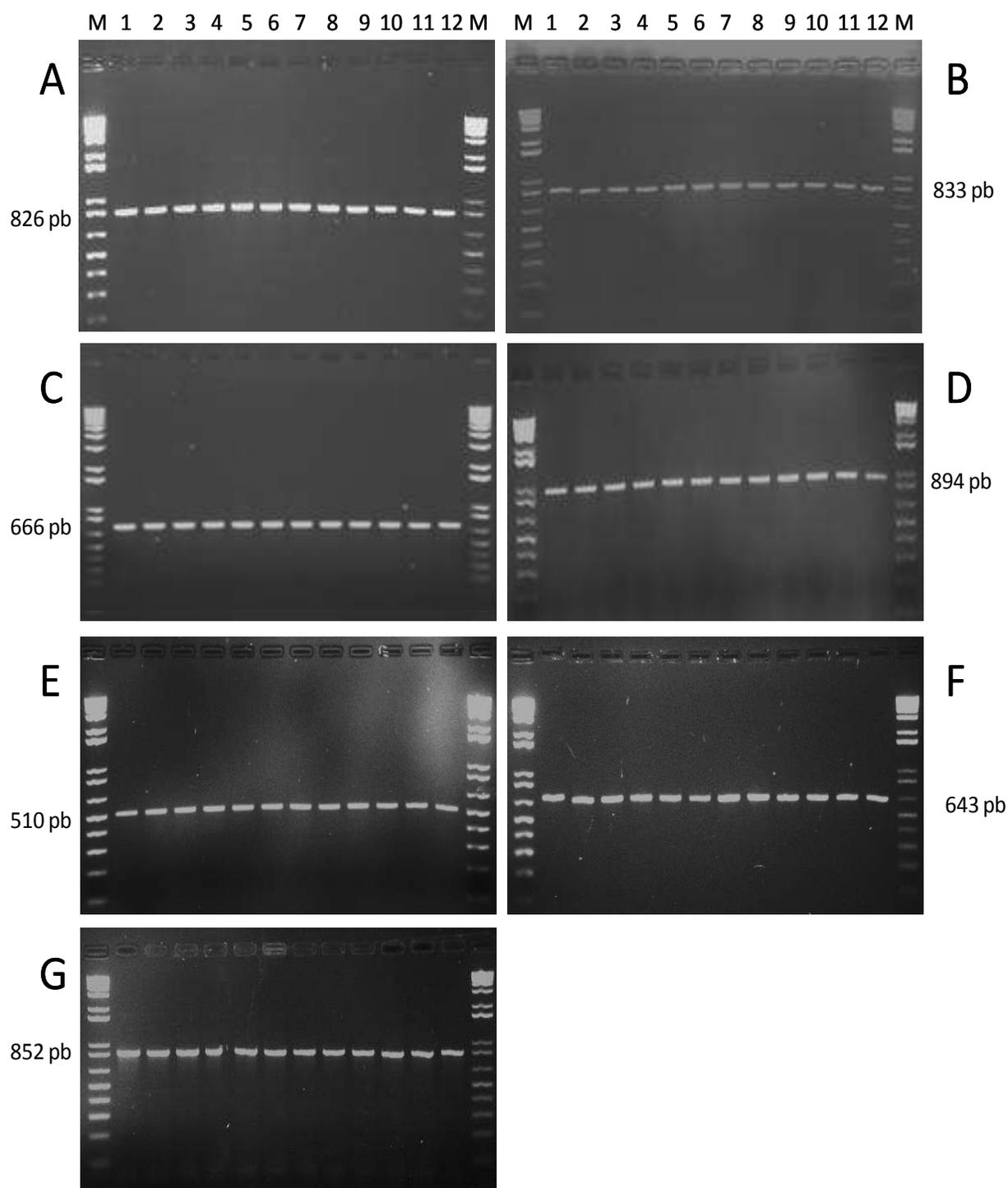


Figura 9. Amplicones de los genes de mantenimiento obtenidos con ADN de los aislados bacterianos
Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra la amplificación de los genes: A) *aroC*, B) *dnaN*, C) *hemD*, D) *hisD*, E) *purE*, F) *sucA* y G) *thrA*. Carriles: M, marcador de peso molecular 1 kb plus ADN ladder (invitrogen, USA); 1-12 amplicones obtenidos con ADN de los aislados 2, 4, 5, 10, 13, 15, 16, 17, 22, 24, 26 y 28.

8.3. Secuenciación de los productos de PCR

Se obtuvieron las secuencias de cada uno de los 7 genes de mantenimiento para todos los aislados de interés. Los electroferogramas presentaron buena calidad resolución, definición y nitidez de picos (Fig. 10)

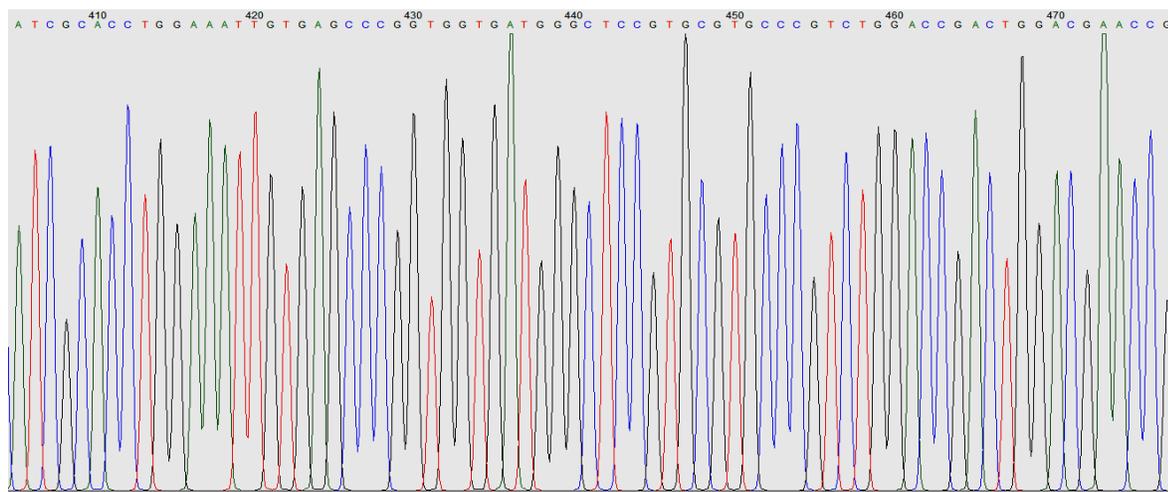


Figura 10. Ejemplos de electroferogramas de las secuencias obtenidas para cada uno de los 7 loci analizados en los aislados de *S. enterica* de interés.

8.4 Análisis BLAST de las secuencias

Cada una de las secuencias fue alineada con secuencias que se encuentran depositadas en el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> para corroborar que la secuencia amplificada correspondiera al gen amplificado en *Salmonella*. De un total de 90% de secuencia analizada se obtuvieron porcentajes de 99% de identidad para cada uno de los aislados analizados.

8.5 Análisis de secuencias en la base de datos del MLST

a) Asignación de perfil alélico en aislados de *Salmonella enterica*.

Se realizó un alineamiento múltiple por separado para cada uno de los 7 genes de mantenimiento para todos los aislados, para ello se hizo uso de las secuencias control publicadas en servidor web de la base de datos del MLST, se realizó el corte de dichas secuencias y se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos, cada una de las secuencias de los aislados de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio fueron alineadas

con las secuencias que se encuentran disponibles en la base de datos a cargo del Instituto de Investigación ambiental (ERI) de la Universidad de Cork Irlanda, en el sitio web: <http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Senterica/>. Esto permitió obtener el perfil alélico y la asignación de la Secuencia Tipo de cada aislado (Tabla 5).

Tabla 5. Perfiles alélicos y ST asignadas por la base de datos para los aislados utilizados en este estudio

	AISLADO	alelo <i>aroC</i>	alelo <i>dnaN</i>	alelo <i>hemD</i>	alelo <i>hisD</i>	alelo <i>purE</i>	alelo <i>sucA</i>	alelo <i>thrA</i>	ST
<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>	4	10	7	12	9	5	9	2	19
	16	10	7	12	9	70	9	2	213
	24	10	7	12	9	70	9	2	213
	28	10	7	12	9	70	9	2	213
	39	10	7	12	9	70	9	2	213
	54	104	100	54	78	104	9	48	292
	69	10	7	12	9	70	9	2	213
	89	10	7	12	9	70	9	2	213
	96	10	7	12	9	70	9	2	213
	115	10	7	12	9	70	9	2	213
	127	10	7	12	9	70	9	2	213
196	10	7	12	9	70	9	2	213	
<i>Salmonella</i> <i>Anatum</i>	2	82	38	26	12	115	78	70	329
	5	10	14	15	31	25	20	33	64
	15	10	14	15	31	25	20	33	64
	17	10	14	15	31	25	20	33	64

Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

	22	10	14	15	31	25	20	33	64
	29	19	20	3	20	5	22	22	40
	43	19	20	3	20	5	22	22	40
	44	10	14	15	31	25	20	33	64
	45	10	14	15	31	25	20	33	64
	53	10	14	15	31	25	20	33	64
	56	10	14	15	31	25	20	33	64
	133	10	14	15	31	25	20	33	64
	139	10	14	15	31	25	20	33	64
	155	19	20	3	20	5	22	22	40
	208	13	11	25	49	88	23	33	ND
	229	10	14	15	31	25	20	33	64
<i>Salmonella Agona</i>	26	3	3	7	4	3	3	7	13
	40	92	125	78	128	138	9	141	463
	62	3	3	7	4	3	3	7	13
	65	3	3	7	4	3	3	7	13
	86	19	20	3	20	5	22	22	40
	90	3	3	7	4	3	3	7	13
	112	3	3	7	4	3	3	7	13
	132	10	7	12	9	70	9	285	ND
	146	3	3	7	4	3	3	7	13
	149	10	14	15	31	25	20	33	64
	156	189	70	68	132	175	9	172	592

Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

	161	3	3	7	4	3	3	7	13
	231	3	3	3	4	3	3	7	13
Salmonella clasificada a nivel de serogrupo	10	19	20	3	20	5	22	22	40
	13	19	20	3	20	5	22	22	40
	32	186	35	78	75	39	182	97	588
	38	140	105	85	93	14	10	3	440
	47	19	20	3	20	5	22	22	40
	48	119	10	17	42	12	13	4	321
	49	7	6	8	8	7	8	13	14
	67	19	20	3	20	5	22	22	40
	68	22	11	25	21	10	23	23	48
	70	92	125	78	128	138	9	141	463
	75	19	20	3	20	5	22	22	40
	97	19	20	3	20	5	22	22	40
	99	119	10	17	42	12	13	4	321
	100	10	60	58	66	6	65	16	155
	113	16	2	45	43	36	39	42	118
	125	19	20	3	20	5	22	22	40
	153	16	2	45	43	36	39	42	118
	157	10	14	15	31	25	20	33	64
160	19	20	3	20	5	22	22	40	
167	13	127	92	113	114	107	4	447	
180	11	10	13	32	10	13	4	65	

Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

193	19	20	3	20	5	22	22	40
200	19	20	3	20	5	22	22	40
201	13	12	17	520	13	16	4	1674
202	13	12	17	520	13	16	4	1674
214	19	20	3	20	5	22	22	40
224	19	20	3	20	5	22	22	40
227	19	20	3	20	5	22	22	40
228	7	6	8	8	7	8	13	14
233	40	36	3	37	29	9	36	72
236	40	36	3	37	29	9	36	72

<http://mlst.ucc.ie/mlst/mlst/dbs/Senterica/>

Clave. ND: Secuencias Tipo no determinadas

Se obtuvieron diferentes números de alelos para cada locus, el locus *hisD* fue el que presentó mayor número de alelos con un total de 20, seguido por el locus *purE* con 19 alelos diferentes. Los loci *dnaN* y *thrA* presentaron 18 y 17 alelos diferentes respectivamente. Para los loci *aroC* y *hemD* se encontraron 16 alelos diferentes y por último, el locus *sucA* presentó el menor número de alelos diferentes, encontrándose 14. En la tabla 6 se muestran los alelos obtenidos para cada uno de los 7 loci para los 72 aislados analizados.

Tabla 6. Número y porcentaje de alelos encontrados para cada locus de los aislados de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio

gen <i>aroC</i>		gen <i>dnaN</i>		gen <i>hemD</i>		gen <i>hisD</i>		gen <i>purE</i>		gen <i>sucA</i>		gen <i>thrA</i>	
Alelos encontrados	Número de aislados y porcentaje	Alelos encontrados	Número de aislados y porcentaje	Alelos encontrados	Número de aislados y porcentaje	Alelos encontrados	Número de aislados y porcentaje	Alelos encontrados	Número de aislados y porcentaje	Alelos encontrados	Número de aislados y porcentaje	Alelos encontrados	Número de aislados y porcentaje
3	8 (11%)	2	2 (3%)	3	20 (28%)	4	8 (11%)	3	8 (11%)	3	8 (11%)	2	11 (15%)
7	2 (3%)	3	8 (11%)	7	7 (10%)	8	2 (3%)	5	18 (25%)	8	2 (3%)	3	1 (1%)
10	26 (36%)	6	2 (3%)	8	2 (3%)	9	12 (17%)	6	1 (1%)	9	18 (25%)	4	6 (8%)
11	1 (1%)	7	12 (17%)	12	12 (17%)	12	1 (1%)	7	2 (3%)	10	1 (1%)	7	8 (11%)
13	4 (6%)	10	3 (4%)	13	1 (1%)	20	17 (24%)	10	2 (3%)	13	3 (4%)	13	2 (3%)
16	2 (3%)	11	2 (3%)	15	13 (18%)	21	1 (1%)	12	2 (3%)	16	2 (3%)	16	1 (1%)
19	17 (24%)	12	2 (3%)	17	4 (6%)	31	13 (18%)	13	2 (3%)	20	13 (18%)	22	17 (24%)
22	1 (1%)	14	13 (18%)	25	2 (3%)	32	1 (1%)	14	1 (1%)	22	17 (24%)	23	1 (1%)
40	2 (3%)	20	17 (24%)	26	1 (1%)	37	2 (3%)	25	13 (18%)	23	2 (3%)	36	2 (3%)
82	1 (1%)	35	1 (1%)	45	2 (3%)	42	2 (3%)	29	2 (3%)	39	2 (3%)	33	14 (20%)
92	2 (3%)	36	2 (3%)	54	1 (1%)	43	2 (3%)	36	2 (3%)	65	1 (1%)	42	2 (3%)
104	1 (1%)	38	1 (1%)	58	1 (1%)	49	1 (1%)	39	1 (1%)	78	1 (1%)	48	1 (1%)
119	2 (3%)	60	1 (1%)	68	1 (1%)	66	1 (1%)	70	11 (15%)	107	1 (1%)	70	1 (1%)
140	1 (1%)	70	1 (1%)	78	3 (4%)	75	1 (1%)	88	1 (1%)	182	1 (1%)	97	1 (1%)
186	1 (1%)	100	1 (1%)	85	1 (1%)	78	1 (1%)	104	1 (1%)			141	2 (3%)
189	1 (1%)	105	1 (1%)	92	1 (1%)	93	1 (1%)	114	1 (1%)			172	1 (1%)
		125	2 (3%)			113	1 (1%)	115	1 (1%)			285	1 (1%)
		127	1 (1%)			128	2 (3%)	138	2 (3%)				
						132	1 (1%)	175	1 (1%)				
						520	2 (3%)						
Total de alelos	16	18		16		20		19		14		17	

b) Asignación de ST por MLST en aislados de *Salmonella enterica*

Al asignar el perfil alélico a cada uno de los aislados e introducir este en la base de datos para MLST de *S. enterica* se encontraron 20 secuencias tipo (ST) diferentes y en el caso de dos de los aislados analizados no se pudo asignar secuencia tipo, lo que sugiere que estos representan nuevas secuencias tipo a nivel mundial. En la tabla 8 se muestran las secuencias tipo encontradas, el número de aislados y porcentaje correspondientes para cada una de las

secuencias tipo. La secuencia tipo encontrada con mayor frecuencia fue la ST-40 con 17 aislados, seguida de la ST-64 con 13 aislados. Las secuencias tipo ST-213 y ST-13, se encontraron en 10 y 8 aislados, respectivamente. En la consulta de los complejos clonales para cada secuencia tipo reportada en la misma base de datos anteriormente mencionada se encontraron 16 complejos clonales o grupos eBURST diferentes (Tabla 7).

Tabla 7. ST encontradas por MLST en los aislados de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio

ST	Número de aislados	Complejo clonal eBURST
13	8 (11%)	54
14	2 (3%)	55
19	1 (1%)	1
40	17 (24%)	57
48	1 (1%)	42
64	13 (18%)	64
65	1 (1%)	12
72	2 (3%)	40
118	2 (3%)	2
155	1 (1%)	NA
213	10 (14%)	1
292	1 (1%)	45
321	2 (3%)	36
329	1 (1%)	72
440	1 (1%)	82
447	1 (1%)	46
463	2 (3%)	83
588	1 (1%)	NA
592	1 (1%)	101
1674	2 (3%)	NA
ND	2 (3%)	NA

Clave ND: No Determinada, NA: No asignado

Al colocar cada secuencia tipo y aislado de estudio en el mapa del estado de Michoacán de acuerdo al lugar de procedencia de cada uno de los aislados analizados, se observa el patrón

de distribución de las ST en la entidad. El municipio de Lázaro Cárdenas posee la mayor diversidad de ST, con un total de 9 ST diferentes, seguido por el municipio de Morelia con 6 ST diferentes y una ST no determinada. En el municipio de Uruapan se encontraron 5 ST diferentes, mientras que para los municipios de Apatzingán y Zamora se encontraron 4 ST diferentes. Mújica y Ciudad Hidalgo poseen 3 ST diferentes cada uno. Los municipios que poseen 2 ST diferentes son: Yurécuaro, La Piedad, Tuxpan y Pátzcuaro. Por último, los municipios en los que se encontró una sola ST fueron: Pastor Ortiz, Zacapu, Ocampo, La Piedad, Angamacutiro, Tacámbaro, Huetamo, Zitácuaro, Charo y Tanhuato. El municipio de Lázaro Cárdenas fue el que mayor diversidad de ST presentó, los serotipos distribuidos en dichas secuencias tipo son: Typhimurium, Agona, Anatum, y los serogrupos B, D, E1 y C1. Para el municipio de Morelia los serotipos distribuidos en las 6 ST encontradas son: Typhimurium, Anatum, Agona, y los serogrupos C1 y E1. En el municipio de Uruapan se encontraron los serotipos Typhimurium, Anatum, y los serogrupos B y 35 distribuidos en las 5 ST encontradas. Para los municipios de Apatzingán y Zamora, cada uno con 4 ST diferentes, se encontraron los serotipos Typhimurium, Anatum, y Agona en ambos casos, mientras que para Zamora se encontró adicionalmente al serogrupo B. Mújica y Ciudad Hidalgo presentaron 3 ST diferentes, encontrándose en el primero al serotipo Agona y los serogrupos B y E4, y los serotipos Typhimurium, Anatum y el serogrupo B, en el caso del segundo. Para los municipios que se encontraron 2 y 1 ST los serotipos distribuidos en estas ST fueron: Typhimurium, Agona, Anatum, y los serogrupos B y E1 (Figura 11).

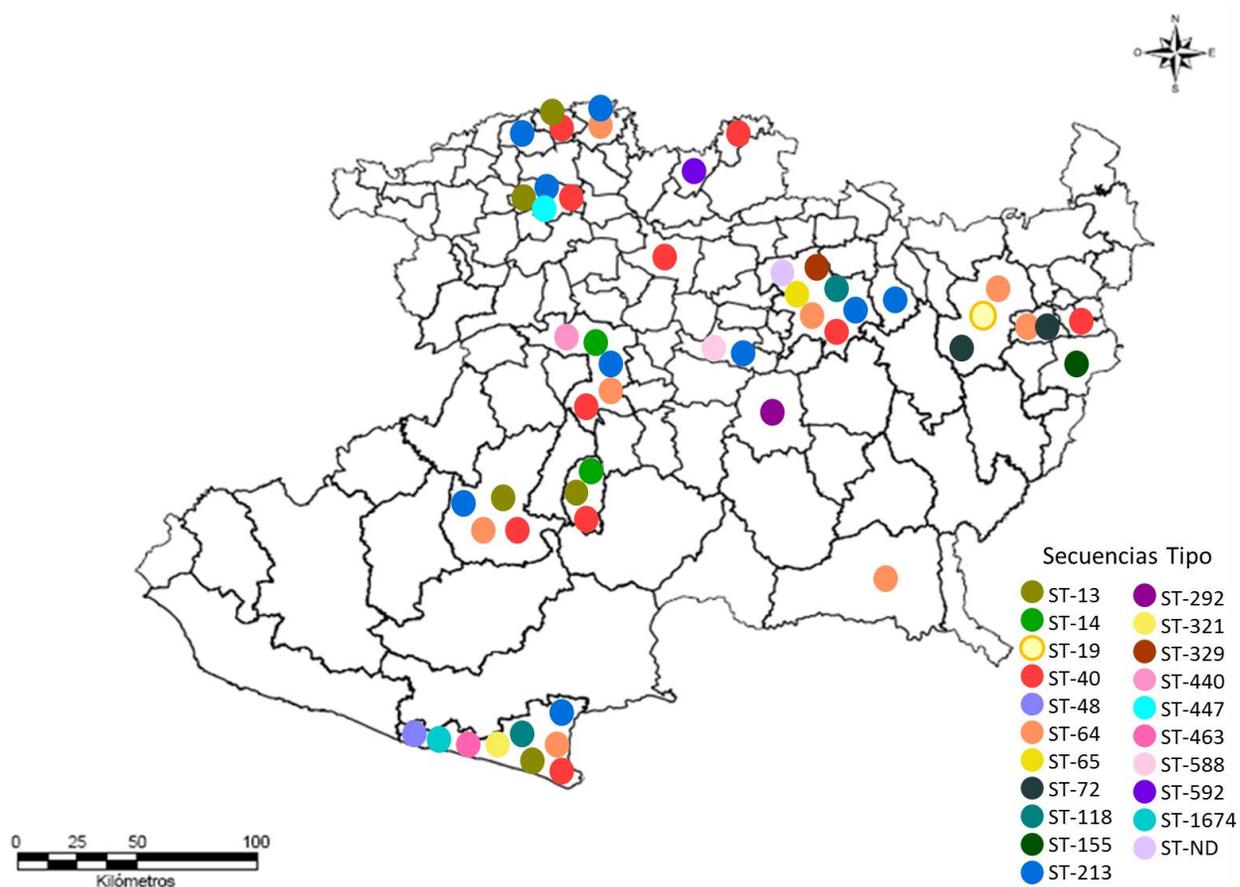


Figura 11. Distribución geográfica en el estado de Michoacán de las ST encontradas por MLST en aislados de *Salmonella enterica*

Se realizó la comparación de la distribución geográfica de las 20 secuencias tipo encontradas en nuestro estudio con las secuencias tipo que se encuentran depositadas en la base de datos (Tabla 8). Podemos observar que de las 20 ST aquí encontradas se reportan en varios países de distintos continentes. Por ejemplo, en Estados Unidos de Norteamérica se han reportado 16 ST de las 20 ST encontradas en nuestro estudio, en Alemania 12, en el Reino Unido 9, en Canadá y Dinamarca 8 y 6 respectivamente. Dos de las ST aquí encontradas (ST-72 y ST-1674) sólo se encuentran reportadas en los Estados Unidos de Norteamérica. Del total de las 13 ST que se encuentran reportadas en la base de datos para México, en este estudio sólo se encontraron 2, que fueron la ST-19 y la ST-213.

Tabla 8. Comparación de la distribución geográfica en el estado de Michoacán y diferentes países de los aislados de *Salmonella enterica* de las ST obtenidas por MLST.

ST	Número de aislados y porcentaje	Municipios	Serotipo reportado por LESP	Países reportados en base de datos MLST <i>Salmonella enterica</i>
13	8 (11%)	Apatzingán, Yurécuaro, Mújica, Lázaro Cárdenas, Zamora,	Agona	Francia, Estados Unidos de Norteamérica, Australia, Canadá, España, Jordania, China, Dinamarca, Reino Unido, Argelia, Alemania, Irlanda, Grecia, Escocia, Perú.
14	2 (3%)	Uruapan, Mújica	Serogrupo 35 y E4	Katar, Estados Unidos de Norteamérica, Jordania, Francia, Alemania, Noruega, Dinamarca, Zimbabue, Escocia, China.
19	1 (1%)	Ciudad Hidalgo	Typhimurium	México, Estados Unidos de Norteamérica, Alemania, Irlanda, Canadá, Reino Unido, Holanda, China, Dinamarca, Portugal, Benin, Sur de África, España, Francia, Japón, Tailandia, República Checa, Katar, Brasil, Noruega, Italia, Taiwán, Corea, Malí, Panamá, Kenia, Mongolia, Bélgica, Australia, Austria, Suecia, Zimbabue, Escocia.
40	17 (24%)	Morelia, Lázaro Cárdenas, Zamora, Apatzingán, Pastor Ortíz, Uruapan, Lázaro Cárdenas, Zacapu, Yurécuaro, Ocampo, Mújica	Anatum, Agona, Serogrupo B, Serogrupo E1	Dinamarca, Estados Unidos de Norteamérica, Portugal, Inglaterra, Francia, Reino Unido, Irlanda, Filipinas, Taiwán.
48	1 (1%)	Lázaro Cárdenas	Serogrupo D	Italia, Alemania, Estados Unidos de Norteamérica, Dinamarca, Austria, Puerto Rico, Portugal, Reino Unido, Guyana Francesa, España, Guadalupe.
64	13 (18%)	La Piedad, Ciudad Hidalgo, Morelia, Apatzingán, Uruapan, Huetamo, Lázaro Cárdenas, Tuxpan	Anatum, Agona, Serogrupo B.	Katar, Canadá, Reino Unido, Estados Unidos de Norteamérica, Zimbabue, Sur de África, Alemania, Senegal, Portugal, Australia, Dinamarca.
65	1 (1%)	Morelia	Serogrupo C1	Estados Unidos de Norteamérica, Alemania, Reino Unido, Escocia.
72	2 (3%)	Tuxpan, Ciudad Hidalgo	Serogrupo B	Estados Unidos de Norteamérica
118	2 (3%)	Lázaro Cárdenas, Morelia	Serogrupo B y Serogrupo E1	Portugal, Estados Unidos de Norteamérica, Alemania, Francia, Suiza, Argelia, Túnez
155	1 (1%)	Zitácuaro	Serotipo E1	Italia, Alemania, Filipinas, Canadá
213	10 (14%)	Morelia, Uruapan, Apatzingán, Lázaro Cárdenas, Charo, Zamora, Tanhuato, La Piedad, Pátzcuaro	Typhimurium	México, Holanda, Irlanda, Reino Unido
292	1 (1%)	Tacámbaro	Typhimurium	Canadá Taiwán, Estados Unidos de Norteamérica, Alemania, Jordania
321	2 (3%)	Lázaro Cárdenas	Serogrupo c1	Benin, Alemania, Reino Unido, Estados Unidos de Norteamérica, Taiwán

Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

329	1 (1%)	Morelia	Anatum	Estados Unidos de Norteamérica, España, Alemania, Tailandia, Chile
440	1 (1%)	Uruapan	Serogrupo B	Australia, Katar, Canadá
447	1 (1%)	Zamora	Serogrupo B	Escocia, Estados Unidos de Norteamérica
463	2 (3%)	Lázaro Cárdenas	Agona, Serogrupo E1	Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Reino Unido
588	1 (1%)	Pátzcuaro	Serogrupo B	Alemania, Holanda
592	1 (1%)	Angamacutiro	Agona	Estados Unidos, Canadá
1674	2 (3%)	Lázaro Cárdenas	Serogrupo D	Estados Unidos de Norteamérica
ND	2 (3%)	Morelia	Agona, Anatum	No se encuentra en la base de datos (Posible ST nueva)

Se realizó la comparación de la relación entre la ST y el serotipo de los aislados analizados con la asignación de ST y serotipo que se encuentran depositados en la base de datos de MLST de *S. enterica* (Tabla 9). Como se puede observar, existen varias secuencias tipo distintas depositadas en la base de datos que son asignadas a cepas de un mismo serotipo, así como aquellas que son exclusivas de un solo serotipo. Al comparar las secuencias tipo de nuestros resultados, encontramos que el serotipo de varios aislados concuerda con el serotipo que se encuentra depositado en la base de datos. Por ejemplo, la ST-13 se ha asignado a cepas de los serotipos Agona, Typhimurium, Enteritidis en la base de datos, aunque la mayoría de las cepas con dicha ST en la base de datos pertenecen al serotipo Agona. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que los 8 aislados del serotipo Agona aquí estudiados presentaron la ST-13.

La ST-19 también está presente en distintos serotipos de la base de datos, aunque mayoritariamente en el serotipo Typhimurium. Nuestros resultados son congruentes con lo reportado en la base de datos para dicha ST, ya que el aislado corresponde al serotipo Typhimurium. En el caso de la ST-64, en este estudio se encontró presente en cepas de los serotipos Anatum, Agona, y Serogrupo B. En la base de datos dicha secuencia tipo también se reporta en distintos serotipos que incluyen a Anatum, Vejle, Rosseleben y Ngor, siendo el serotipo Anatum el más común. Así, los 12 aislados del serotipo Anatum aquí analizados presentan la ST-64, en congruencia con la base de datos. No obstante, en este trabajo también se encontró que cepas del serotipo Agona y del serogrupo B pueden presentar la ST-64 lo cual no aparece en la base de datos. Adicionalmente, la asignación de serotipos para las secuencias

tipo ST-40, ST-292, ST-329, ST-463 y ST-592 de los aislados de este estudio no concuerdan con la base de datos.

Las secuencias tipo encontradas para algunos de los aislados tipificados únicamente a nivel de serogrupo permitieron asignar serotipo que para las secuencias tipo que éstos aislados presentaron existe una asignación única de serotipo, tal fue el caso de los aislados que presentaron las secuencias tipo ST-14, ST-65, ST-72, ST-155, ST-321, ST-440, ST-447, ST-588 y ST-1674. A los aislados que presentaron las secuencias tipo ST-48 y a la ST-118 no se les pudo asignar un serotipo, ya que en la base de datos se reportan 2 o más serotipos diferentes para éstas (Tabla 9). Todos los aislados analizados en este trabajo fueron obtenidos de muestras de productos cárnicos (67 aislados) y derivados lácteos (5 aislados) y en ese sentido resulta interesante analizar de qué tipo de hospedero o ambiente han sido aislados las ST reportadas en la base de datos. La tabla 10 muestra dicha información. Para los aislados analizados, todas las ST se encuentran en todos los productos cárnicos analizados, excepto la ST-19, que fue la única ST que se encontró en queso fresco y no en producto cárnico.

Tabla 9. Comparación de ST obtenidas por MLST de los serotipos encontrados en aislados de *Salmonella enterica* utilizados en este estudio con los serotipos de las ST reportadas en la base de datos.

ST	Serotipo LESP	Serotipo reportado en base de datos MLST	Tipo de Muestra	Hospederos/Ambiente reportados en base de datos MLST
13	Agona	Agona, Typhimurium, Enteritidis	Chorizo, Carne de res, longaniza	Humanos, aves de corral, medio ambiente (ríos), porcinos, ovinos, alimentos (leche), alimentos para animales.
14	Serogrupo 35 y E4	Senftenberg	Carne de res, pollo	Alimentos, humanos, medio ambiente (ríos), aves, reptiles.
19	Typhimurium	Typhimurium, Hato, Hartford, Farsta	Queso fresco	Humanos, bovinos, Ovinos, porcinos, aves, equinos, reptiles, medio ambiente, zarigüeya, conejos.
40	Anatum, Agona, Serogrupo B, Serogrupo E1	Derby	Carne de cerdo, , carne de res, chorizo, queso fresco, longaniza	Bovinos, humanos, alimentos, medio ambiente, porcinos.
48	Serogrupo D	Panama, Houston, koessen, Miami	carne de res	Reptiles, humanos, medio ambiente,

Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de Salmonella enterica obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

64	Anatum, Agona, Serogrupo B.	Anatum, Vejle, Rossleben, Ngor	Queso fresco, carne de res, chorizo	Medio ambiente, humano.
65	Serogrupo C1	Brandenburg	Carne de res	Reptil
72	Serogrupo B	Derby	Carne de cerdo	Aves
118	Serogrupo B y Serogrupo E1	Newport, Muenchen	Carne de res, chorizo	Medio ambiente, humanos, reptiles, bovinos, aves, alimentos, porcinos, equinos.
155	Serotipo E1	London	Longaniza	Humanos, porcino.
213	Typhimurium	Typhimurium	Carne de cerdo, chorizo, carne de res, , queso asadero	Humanos, bovinos, alimentos, aves.
292	Typhimurium	Albany, Oranienburg	Carne de res	Humanos, aves de corral,
321	Serogrupo c1	Muenster	carne de res	Medio ambiente, bovinos, humanos, aves,
329	Anatum	Ohio	Chorizo	Humanos, medio ambiente.
440	Serogrupo B	Adelaide	Carne de res	Reptil, humano, bovino.
447	Serogrupo B	Poona	Chorizo	Humano
463	Agona, Serogrupo E1	Meleagridis	Chorizo, Carne de res	Aves, medio ambiente
588	Serogrupo B	Havana	Chorizo	Planta
592	Agona	Worthington	Carne de res	Aves
1674	Serogrupo D	Javiana	Carne de res	Humano
ND	Agona, Anatum	No aplica	Chorizo de puerco, carne de res	No se encuentra en la base de datos (Posible ST nueva)

<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/GetTableInfo.html>

8.6 Patrón de agrupamiento de las ST

La concatenación de las secuencias de los 7 genes housekeeping con un total de 3336 pb y un total de 20 secuencias tipo diferentes de los 72 aislados fueron agrupados en un dendograma construido por el método de Neighbor-Joining las secuencias tipo se agruparon en seis principales grupos. La distribución de 17 aislados del grupo A corresponden a la ST-40, 12 aislados de este grupo están asignados al serogrupo B, 3 aislados al serotipo Anatum, 1 aislado al serotipo Agona y 1 al serogrupo E1. En el grupo B conformado por 5 aislados se agruparon 3 ST diferentes, la ST -155 con un aislado del Serogrupo E1, la ST-118 con dos aislados asignados a los serogrupos B y E1, y la ST-14 también con 2 aislados confirmados a nivel de serogrupo 35 y E4. El grupo C con un total de 11 aislados contiene a 3 ST diferentes, la ST-13 con 8 aislados se

encuentran serotipificados como Agona, la ST-72 con dos aislados del Serogrupo B, y 1 aislado del serotipo Typhimurium. En el grupo D, los 12 aislados conforman a 2 ST (ST-213 con 10 aislados y la ST-19 con 1 aislado) también se agrupó para este grupo 1 ST no determinada con 1 aislado serotipificado como Agona. 14 aislados fueron agrupados en el grupo E, aislados serotipificados como Anatum están genotipificados por MLST con la ST-64 (11 aislados) dos aislados más con esta misma ST están serotipificados 1 con el serotipo Agona y el otro Serogrupo B, la ST-239 aquí agrupada está conformada por 1 aislado del serotipo Agona. El grupo F contiene 13 aislados y es el que tiene la mayor variedad de ST agrupadas (9) así como variedad de aislados de diferentes serogrupos y serotipos como se muestra en la figura 12.

Caracterización por Multi Locus Sequence Typing de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes de Michoacán

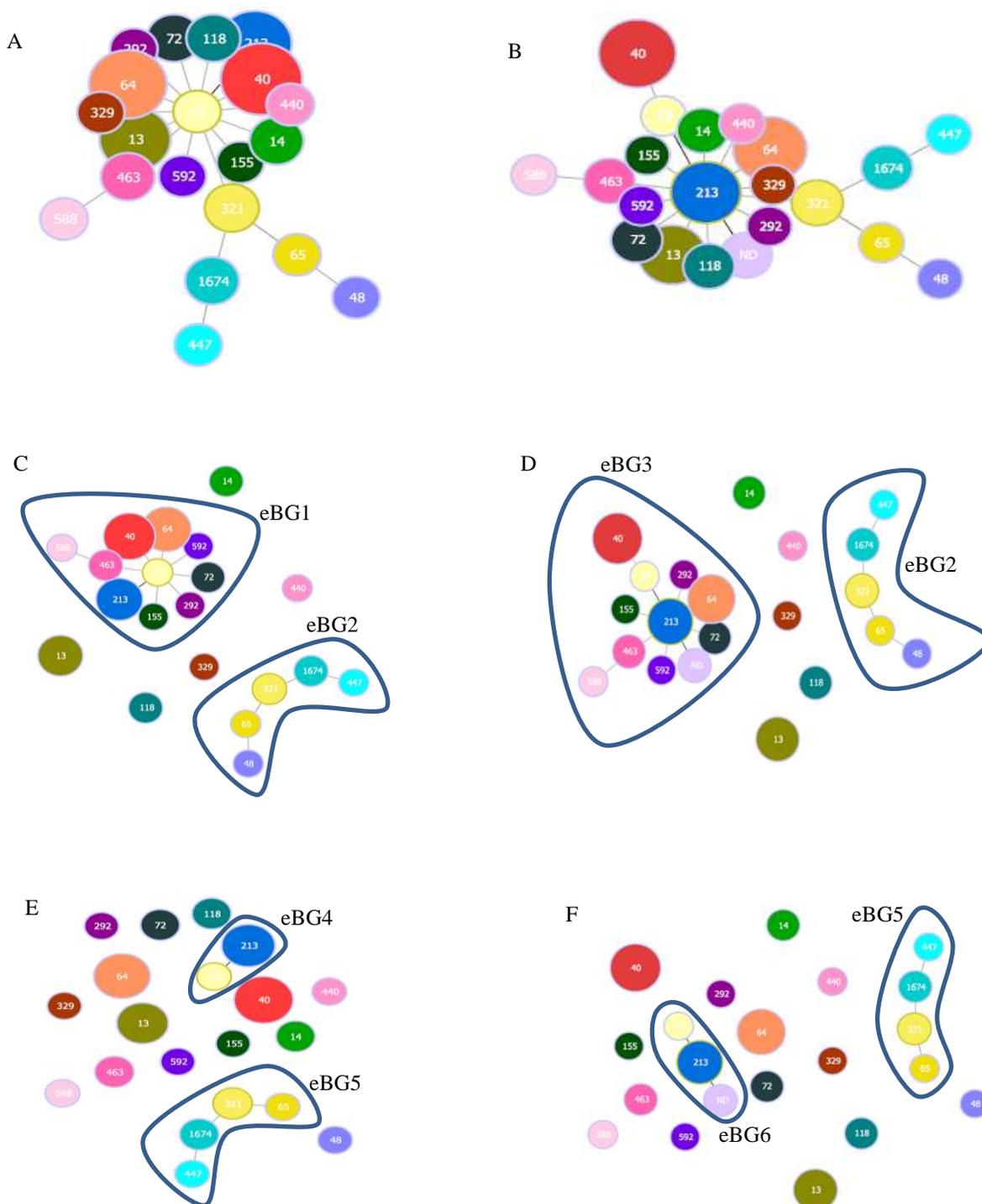


Figura 13. Agrupamientos gBurst de los aislados de *S. enterica* de Michoacán. A-B, Árboles de mínima expansión de todos los aislados; B-C grupos gBurst que difieren en un alelo; D-E grupos gBurst que difieren en dos alelos. A, C, E análisis que no incluye a las secuencias tipo ND; B, D, F, análisis que incluyen a las secuencias tipo ND. C, D eBGs de ST que difieren en un alelo; E, F, eBGs de ST que difieren en dos alelos. C, D análisis de variantes de un solo locus (SLV); E, F, análisis de variantes de dos loci (DLV). Los contornos de los paneles designan grupos de ST

que forman eBGs complejos, el resto de grupos está formado por una sola ST. Cada nodo (círculo) designa una ST diferente indicada por el número dentro de éste. El código de colores para cada ST es igual al de la figura ¿??. El tamaño de cada nodo es proporcional al número de aislados con la misma ST. Las líneas que conectan los nodos no indican distancias genéticas.

Cuando se analiza la formación de grupos eBG que difieren en un solo locus, se forma dos grupos complejos tanto cuando se incluye a las secuencias ND como cuando se excluyen (Figura 13 B). La única diferencia entre ambos casos es la inclusión de dichas secuencias en el eBG más complejo (eBG1 y eBG3). El otro eBG formado en ambos casos incluye a 5 ST distintas (eBG2). El resto son secuencias sin agrupar. Algo similar ocurre cuando se forman eBG con diferencias de 2 loci al incluir y excluir las secuencias tipo ND (eBG4 y eBG6).

En algunas de las ST se agrupan distintos serotipos, mientras que otras están formadas por un solo serotipo (Figura 14). Así, las ST 19, 213 y 292 presentan aislados exclusivamente del serotipo Typhimurium, mientras que la ST13 y 592 están constituidas exclusivamente por miembros del serotipo Agona. Un caso extremo en el presente estudio lo constituye la ST40, la cual está agrupa aislados de los serotipos Agona, Anatum, Serogrupo B y serogrupo E1 (Figura 14). La otra ST que agrupa a más de dos serotipos es la ST64, con aislados de Agona, Anatum y serogrupo B. El resto de ST estás constituidas por aislados de un serogrupo o de dos.

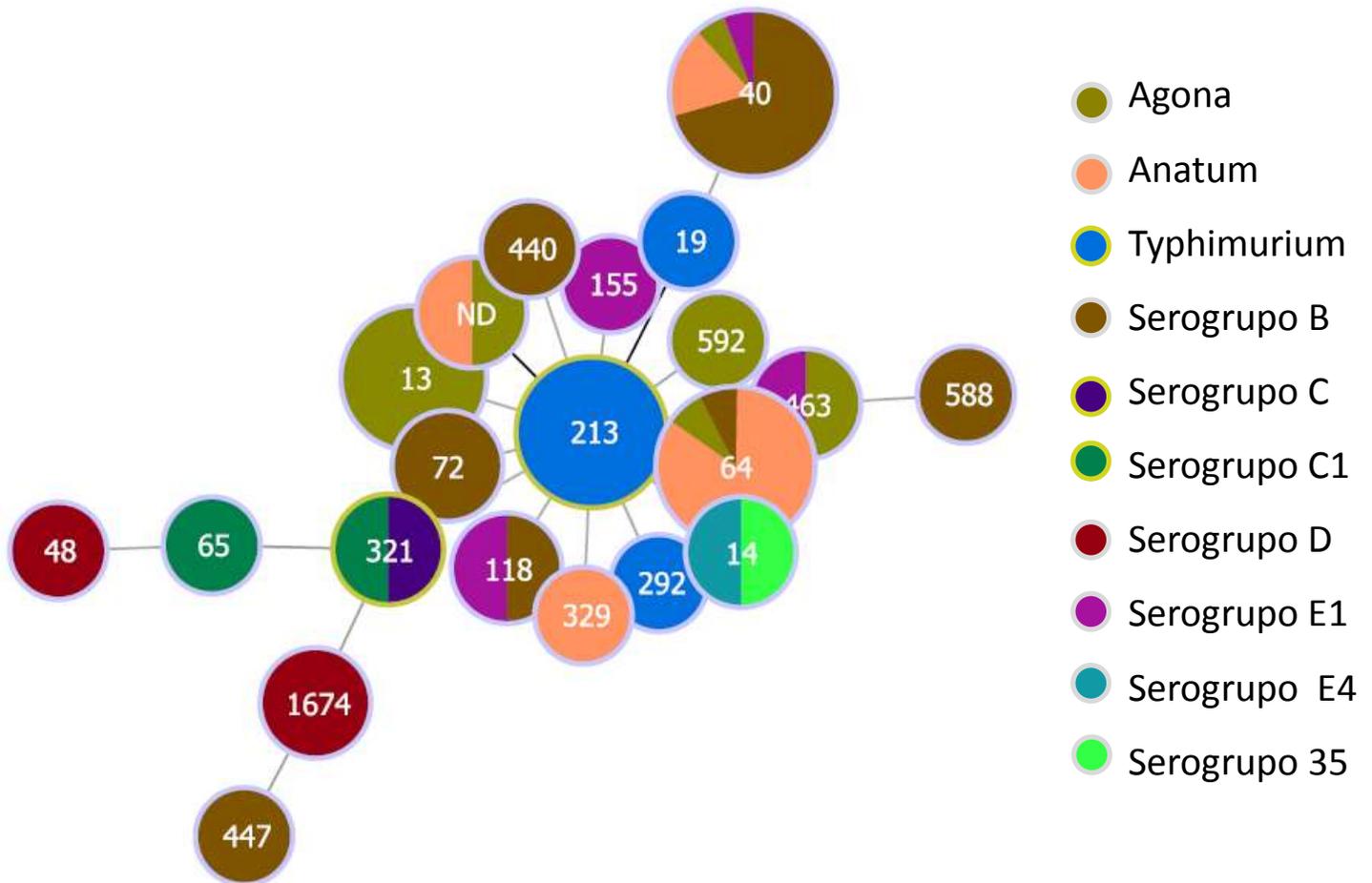


Figura 14. Árbol de mínima expansión que muestra la distribución de serotipos en cada secuencia tipo. Cada nodo (círculo) designa una ST diferente indicada por el número dentro de éste. El tamaño de cada nodo es proporcional al número de aislados con la misma ST. Las líneas que conectan los nodos no indican distancias genéticas.

9. DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron un total de 72 aislados de *Salmonella enterica*. El análisis de secuencias para cada uno de los siete *loci* analizados por MLST arrojó diferentes números de alelos. La diversidad de alelos ha sido previamente reportada en el estudio de Liu et al. (2011), en el que de un total de 121 aislados de *Salmonella enterica* se encontró un mayor número de *alelos* para los *loci hisD* (33), *aroC* (32) y *dnaN* (30), mientras que los *loci* que presentaron menor número de alelos fueron *thrA* (29), *purE* (27), *sucA* (27) y *hemD* (26). En el presente trabajo se encontró mayor diversidad de alelos para los *loci hisD* (20), *purE* (19) y *dnaN* (18), por lo que los resultados aquí obtenidos concuerdan con los resultados obtenidos en el estudio anteriormente mencionado para los *loci hisD* y *dnaN*, pero no en el caso del *locus purE*. El menor número de alelos en este trabajo se encontró para el *locus sucA*, mientras que en el estudio de Liu et al. (2001). reportan al *locus hemD* con la menor diversidad de alelos. Así, el contraste entre nuestros resultados y datos previos de la literatura muestra que en distintas poblaciones de *S. enterica*, la variabilidad de los *loci* analizados puede presentar diferencias.

Se encontraron 20 Secuencias tipo diferentes para todo el conjunto de 72 aislados analizados. La mayoría de éstas ST ya se encuentran registradas en la base de datos, por lo que se realizó la comparación de las ST aquí encontradas con las registradas.

Para nuestro estudio la ST predominante fue la ST-40 con un total de 17 aislados distribuidos entre los Serogrupos B y E1, así como en aislados serotificados como Anatum y Agona. Dicha distribución no concuerda con lo que está depositado en la base de datos, ya que las 175 cepas depositadas para la ST-40, están reportadas con el serotipo Derby, aunque la mayoría de los aislados que conforman a esta ST de este trabajo se encuentran confirmados solo a nivel de serogrupo. La mayoría de los aislados dentro de la ST-40 fueron obtenidos de productos cárnicos y sólo 1 aislado fue obtenido de queso fresco, lo cual concuerda con lo reportado en la base de datos para dicha ST, con aislados provenientes de muestras de bovinos y porcinos, así como de alimentos, aunque la mayoría de registros son principalmente de humanos. Esto es importante ya que muestra que la ST-40 encontrada en los alimentos de Michoacán es un genotipo que puede ocasionar brotes, lo cual resalta la importancia de la

distribución geográfica de esta ST en el Estado de Michoacán ya que se encontró en 10 municipios ubicados en los cuatro puntos cardinales y en el centro del estado. La distribución geográfica mundial que se reporta en la base de datos es para la ST-40 incluye mayoritariamente a países del continente Europeo, pero también en algunas regiones de los Estados Unidos de Norteamérica y Filipinas. De hecho, el reporte más antiguo depositado en la base de datos para la ST-40 es de 1921, para cepa aislada en alimento encontrada en el Reino Unido. Posteriormente se reporta la existencia también en el año de 1986 en Estados Unidos de Norteamérica y más recientemente en los años del 2001 al 2009 en Filipinas, Estados Unidos de Norteamérica, Portugal, Francia, Dinamarca, Taiwán, Inglaterra e Irlanda. En un estudio publicado en el 2013 por Hayward et al. (2013) se menciona que aislados del serotipo Derby y Mbandaka con dicha ST se aíslan con frecuencia en el Reino Unido y Estados Unidos de Norteamérica y ambos serotipos pueden causar fácilmente enfermedad en humanos. Además de que la incidencia en el ganado muestra asociaciones diferentes, en el Reino Unido aproximadamente el 50% y 40% de los casos de *Salmonella* Derby se encuentran en pavos y cerdos, lo que concuerda con nuestros resultados, ya que la mayoría de estos aislados fueron obtenidos de ganado bovino y porcino. En la base de datos aún no se encuentra reportada esta ST para México por lo cual, en este trabajos se estaría reportando la llegada de dicho genotipo para el país, lo que representa un dato epidemiológicamente importante.

Para el caso particular de México, se encuentran reportadas en la base datos 13 ST diferentes (ST-15, ST-19, ST-23, ST-31, ST-112, ST-213, ST-214, ST-302, ST-415, ST-429, ST-431, ST-1097 y ST-1615) distribuidas en varios serotipos de *Salmonella enterica* (Heidelberg, Typhimurium, Oranienburg, Newport, Muenchen, Adelaide, Meleagridis y Azteca). Nosotros encontramos dos ST ya reportadas para México, éstas ST son las ST-19 y ST-213, pertenecientes al serotipo Typhimurium. La base de datos tiene depositadas 42 cepas para la ST-213, la más antigua reportada en el 2000 en Irlanda; En México los reportes son de los años 2002 al 2007, sin embargo en el Reino Unido se reporta en el 2001 y 2003 y en Holanda en el 2009, indicando claramente la dispersión a nivel global de esta cepa en pocos años. La ST-19 es la ST más predominante en la base de datos, con un total de 530 cepas depositadas aisladas en los cinco

continentes de 33 países diferentes, con el reporte más antiguo en el año de 1948 sin especificar país. En los años 1974 y 1975 dicha ST fue aislada en Alemania, en 1978 en Brasil y 1979 en Noruega. Más recientemente, en los años 2000 al 2009, se ha aislado en una gran variedad de países los cuales se encuentran especificados en la tabla 8. Esto comprueba la distribución y alta frecuencia de la ST-19 a nivel mundial en una gran variedad de hospederos animales (bovinos, ovinos, porcinos, aves, equinos, reptiles, conejos), humanos y en muestras procedentes de medio ambiente obtenidas de agua de ríos.

La ST-64 fue la segunda secuencia mayoritariamente encontrada en este estudio (n=13). Esta secuencia tipo se encuentra reportada en países de tres continentes (Europa, África y América) y el reporte más antiguo es del año 1919 para una cepa aislada de aves en los Estados Unidos de Norteamérica. Posteriormente, se encontró en Senegal (1962), Alemania (1966-2001), Zimbabue (1996) y más recientemente en Canadá, Australia, Dinamarca y Sur de África (2001). En el año 2009 se le encontró en el Reino Unido. En cuanto a hospederos, dicha ST se ha encontrado también en humanos, reptiles y en agua de ríos. Existe discrepancia de serotipos que componen esta ST, ya que la base de datos reporta cepas de los serotipos Anatum, Vejle, Rossleben y Ngor, siendo mayoritarios aislados del serotipo Anatum. En nuestro estudio los aislados de esta ST están serotipificados como Anatum (n=11), Agona (n=1) y Serogrupo B (n=1) por lo que la mayoría de nuestros resultados concuerdan con lo reportado. Más adelante se discutirán las razones por las cuales una ST puede estar constituida de distintos serotipos.

La tercera ST mayoritaria fue la ST-13, y en ésta los resultados de nuestro estudio concuerdan con lo que reporta la base de datos, ya que todos los aislados pertenecen al serotipo Agona y han sido obtenidos de productos cárnicos. Esta ST se ha encontrado en varios hospederos que incluyen humanos, aves, porcinos y ovinos. También se ha encontrado contaminando alimentos como la leche, y alimento animal. En cuanto a distribución geográfica, esta ST se encuentra ampliamente distribuida en varios países del continente Europeo, aislándose desde el año de 1969 hasta el 2009. También se ha reportado en China (2007) y en Estados Unidos (2006).

El resto de ST encontradas en este estudio (ST-14, ST-48, ST-65, ST-72, ST-118, ST-155, ST-292, ST-321, ST-329, ST-440, ST-447, ST-447, ST-643, ST-588, ST-592 y ST-1674) se han reportado principalmente en el continente Europeo, aunque también se han encontrado en países del continente Americano (Estados Unidos, Canadá y Chile) Los genotipos se han encontrado desde el año 1931 hasta el 2009.

Un aspecto importante del presente trabajo es el hecho de que se pudieron asignar serotipos a aislados que solo se encontraban confirmados a nivel de serogrupo. Dichos aislados fueron los que asignados a las ST-14, ST-65, ST-72, ST-155, ST-321, ST-440, ST-447, ST-463, ST-588 y ST-1674 ya que en la base de datos dichas ST están conformadas por un solo serotipo. Las secuencias tipo asignadas a dos o más serotipos fueron las ST-48, ST-118 y ST-292. El aislado de la ST-48 del serogrupo D en este estudio no se pudo asignar serotipo, ya que la base de datos reporta un total de 24 cepas de 4 serotipos diferentes (Panama, Houston, Koessen y Miami), aunque la mayoría se encuentra reportada con el serotipo Panama. Para el caso de la ST-118, de un total de 85 ST reportadas en la base de datos 84 cepas son del serotipo Newport y sólo 1 cepa del serotipo Muenchen. Los dos aislados de nuestro estudio están clasificados con el serogrupo B y E1, por lo que muy probablemente puedan asignarse al serotipo Newport. Aislados de las ST-292 y ST-329 que se encuentran serotificados en nuestro estudio con los serotipos Typhimurium y Anatum no concuerdan con lo reportado en la base de datos (serotipos Albany, Oranienburg y Ohio).

De las 20 ST encontradas en nuestro estudio, sólo dos se encuentran reportadas para México, las otras 18 ST restantes se han encontrado en varias partes del mundo pero no estaban reportadas para el país. Esto es importante porque permite ir formando una base de datos que puede ayudar a evaluar la dinámica de genotipos en el estado, identificando ST que permanecen por periodos prolongados en algunas regiones del estado y registrando nuevas ST con características epidemiológicas de interés, como virulencia y patrones de resistencia a antibióticos. Por otra parte, la base de datos con las ST aisladas de todo el mundo, constituye un sistema muy valioso para evaluar los cambios en los patrones de dispersión de genotipos a nivel global.

Antes de discutir los resultados del análisis de MLST para la formación de grupos eBG, es importante resaltar el nivel de interpretación que nos permite este tipo de estudio. De acuerdo con Achtman et al. (2012), los clusters que se forman cuando se analizan las ST de *S. enterica* mediante el análisis geoBurst contienen diferentes aislados que radian de un nodo central; este fenómeno se interpreta comúnmente como la formación de linajes monofiléticos de ST que han evolucionado de un nodo fundador (Turner y Feil, 2007). Achtman et al. (2012) evitan utilizar interpretaciones de historias evolutivas dentro de eBGs, incluyendo la identificación de ST fundadores, hasta que se realicen estudios genómicos de aislados históricamente representativos, por lo que para ellos la asignación de números a cada eBG es arbitraria y no informativa en cualquier otro sentido. De hecho, se ha documentado que aunque el algoritmo eBurst provee de un escenario robusto de la estructura poblacional, este no funciona adecuadamente para describir poblaciones con altos niveles de recombinación (Turner et al., 2007); por lo que los grupos eBurst deben de ser considerados como una hipótesis sobre los grupos ancestrales y los patrones de descendencia entre ST relacionadas, lo cual debe de ser corroborado con información adicional (Turner et al., 2007; Feil et al., 2004). Es en este contexto general en el que se enmarca la siguiente discusión de nuestros resultados.

Tanto los árboles de mínima expansión como los grupos eBG formados con las ST de los aislados de *S. enterica* aquí estudiados, sugieren que la ST19 puede ser la fundadora original de la población estudiada para Michoacán. De manera interesante, cuando al análisis se agregan las secuencias tipo ND, la ST19 es reemplazada por la ST213 como nodo central del árbol de mínima expansión. Previamente Wiesner et al (2009) han reportado a la ST213 como exclusiva de México, y sus datos sugieren esta ha ido desplazando paulatinamente a la ST19 como el genotipo mayoritario contaminando productos cárnicos y asociado a infecciones en el estado de Michoacán en particular y México en general. Así, los resultados aquí obtenidos refuerzan dicha hipótesis, y parecen indicar que la ST213 es la principal generadora de nuevas ST en el estado, que a la vez constituyen nuevas variantes serológicas. Es factible que un análisis genómico permita corroborar las hipótesis planteadas en ese sentido, permitiendo comprobar las relaciones entre las ST19, ST213 y las ND.

Uno de los resultados encontrados en el presente trabajo es el agrupamiento de distintos serotipos dentro de una misma ST, así como la dispersión de aislados del mismo serotipo en distintas ST. En nuestro estudio, los aislados del serotipo Typhimurium se distribuyeron en las ST 19, 213 y 292. Esta dispersión del serotipo Typhimurium en distintas ST se ha documentado previamente. Así, Torpdahl et al. (2007) reportaron la distribución de 10 aislados del serotipo Typhimurium en 4 ST distintas. El análisis de 9 cepas del serotipo Typhimurium obtenidas de aves silvestres en Inglaterra mostró que esta población está compuesta de dos ST, la ST568 y la ST19, de las cuales la más abundante es la primera (Hughes *et al.*, 2010). La ST568 es escasa en aislamientos humanos en el área, con solo tres casos reportados de infección. Los autores concluyen que dicho genotipo presenta adaptaciones específicas de hospedero que la hacen más virulenta, ocasionando una alta tasa de mortalidad en las aves silvestres. En el análisis de 62 aislados de distintos serotipos obtenidos de niños con infecciones invasivas en Gambia, los aislados del serotipo Typhimurium presentaron las ST 19 (n=4) y 34 (n=1). Los aislados del serotipo Agona también se encontraron dispersos en 5 ST tipo distintas, para este serotipo la dispersión en distintas ST también ha sido previamente reportada (Sukhnanand *et al.*, 2005).

La distribución de aislados del mismo serotipo en distintas ST ha sido ampliamente documentada no solo para los casos encontrados en el presente trabajo, sino para una amplia variedad de serotipos. Dicho fenómeno ha sido discutido recientemente por Achtman et al. (2012) y comentada previamente en este trabajo. El análisis mediante MLST forma eBG que son grupos naturales estrechamente relacionados, mientras que los genes que codifican para proteínas con epítopes antigénicos, como los utilizados en el proceso de serotipificación pueden ser adquiridos mediante transferencia horizontal y recombinación homóloga entre aislados de linajes genéticos no relacionados. Esto provoca que serotipos genéticamente relacionados como el Heidelberg y el Typhimurium posean distintos alelos del gen *fliC* (un factor de serotipificación), mientras que aislados de serotipos genéticamente distintos pueden presentar alelos prácticamente idénticos (Smith *et al.*, 1990).

La mayoría de los aislados analizados (n=31) en el presente trabajo presentaron fórmulas antigénicas incompletas, por lo que no podían ser asignados a serotipos específicos. El análisis de este tipo de aislados muestra la capacidad de tipificación del MLST, ya que puede

relacionar a dichos aislados con otros de serotipos específicos, permitiendo la comparación con otros aislados de la misma región o comparaciones a nivel global. Los aislados estudiados de los serogrupos B y E1 muestran una estrecha relación con los aislados del serotipo Typhimurium. Diversos estudios han reportado la tipificación de aislados con serotipos no definidos y su relación el serotipo Typhimurium. Así, el análisis de 190 aislados del serogrupo 4,5,12:i:– (n = 90) y del serotipo Typhimurium (n =100) mostró que estos se distribuían en seis ST distintas compartiendo ambos grupos la ST6, y encontrándose también la ST51 para el primero (Soyer *et al.*, 2009). En un estudio en el que se analizaron aislados provenientes de muestras humanas y de bovino, los aislados del serogrupo 4,5,12:i:– analizados presentaron la misma secuencia tipo que los del serotipo Typhimurium (Hoelzer *et al.*, 2010), la cual fue la ST251 que es la predominante para dicho serotipo en la base de datos.

El serotipo Typhimurium posee la fórmula antigénica [1],4,[5],12:i:1,2, en dicha fórmula los corchetes representan antígenos que pueden o no estar presentes en la designación del serotipo (Achtman *et al.*, 2012). La presencia de distintas variantes serológicas compartiendo el mismo eBG con aislados del serotipo Typhimurium indica que dichas variantes (que han perdido antígenos y se denominan de acuerdo a sus características como monomórficas, no-móviles, rugosas) representan mutaciones o eventos de recombinación que afectan la expresión del lipopolisacárido (LPS) o los antígenos flagelares *fliC* (fase 1) y *fliB* (fase 2) (Achtman *et al.*, 2012). En ese sentido, se ha documentado que los aislados del serogrupo 4,5,12:i:– presentan una deleción genómica en la que se eliminaron los genes *fljA* y *fljB*, relacionados con los antígenos de fase 2 de flagelo, los cuales si están presentes en los aislados del serotipo Typhimurium (Soyer *et al.*, 2009). Se encontraron dos tipos diferentes de deleciones en las regiones que abarcaban dichos genes. Este puede ser el caso de los aislados aquí estudiados que se relacionan estrechamente con el serotipo Typhimurium por lo que, a futuro, sería interesante realizar análisis que muestren el tipo de cambio genético ocurrido en los aislados de este trabajo que poseen fórmulas antigénicas incompletas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcaine SD, Soyer Y, Warnick LD, Su WL, Sukhnanand S, Richards J, Fortes ED, McDonough P, Root TP, Dumas NB, Gröhn Y, Wiedmann M. 2006. Multilocus Sequence Typing supports the hypothesis that cow- and human-associated *Salmonella* isolates represent distinct and overlapping populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 7575–7585.

Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S, the *S. enterica* MLST study group. 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *Plos Pathogens*. 8:1-19.

Adiri RS, Gophna U and Ron EZ. 2003. Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiology letters Elsevier*. 222: 199-203

Benenson AS and Chin J. 1995. Control of communicable diseases manual. American Public Health Association. Washington, DC. Burr MD, Josephson KL, and Pepper IL. 1998. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Letters in Applied Microbiology*. 27: 24-30.

Bergey DH and Hotl JG. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9a Edición. pp 186-187.

Birtles A, Hardy K, Gray SJ, Handford S, Kaczmarek EB, Edwards-Jones V and Fox AJ. 2005. Multilocus sequence typing of *Neisseria meningitidis* directly from clinical samples and application of the method to the investigation of meningococcal disease case clusters. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 6007-6014

Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J and Bartkus JM. 2007. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis pulsed field gel electrophoresis and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 536-543.

Cimons M. 2000. Rapid food-borne pathogen ID system is making a difference ASM News. 66: 617-619.

Cohen JI, Bartlett JA, and Corey GR. 1987. Extra-intestinal manifestations of *Salmonella* infections. *Medicine (Baltimore)*. 66: 349-388.

Darwin KH, and Miller VL. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinical Microbiological Reviews*. 12: 405-428

Dione MM, Ikumapayi UN, Saha D, Mohammed NI, Geerts S, Leven M, Adegbola RA and Antonio M. 2011. Clonal differences between non-typhoidal *Salmonella* (NTS) recovered from children and animals living in close contact in the Gambia. *Neglected tropical diseases* 5: 1-7.

Domínguez MA, Coll P, Coque T, Vazquez J, Vila J. 2005. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. En: Cantón R, Cercenado Editores. *Procedimientos en microbiología clínica SEIMC*.

Dunne EM, Ong EK, Moser RJ, Siba PM, Phuanukoonnon S, Greenhill AR, Robins-Browne RM, Mulholland EK and Satzke C. 2011. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* by use of mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 3756-3760.

Fakhr MK, Nolan LK, and Logue CM. 2005. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 2215-2219.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, and Spratt BG. 2004. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*. 186: 1518-1530.

Foley SL, White DG, McDermott PF, Walker RD, Rhodes B, Fedorka-Cray PJ, Simjee S, and Zhao S. 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *J. Clin. Microbiol.* 44:3569–3577.

Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M and Carrico JA. 2012PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics*. 13:87. doi:10.1186/1471-2105-13-87.

Gil R, Silva FJ, Peretó J and Moya A. 2004. Determination of the core a minimal bacterial gene set. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 60: 518-537

Goering RV. 2010. Pulsed fieldgel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infected Genet Evol*. 10: 866-875.

Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública México*. 42: 490-495.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford University Press*. 41: 95-98.

Hawley, L., Ruebush, M. 2004. *Microbiology and Immunology*. 67-69.

Hayward MR, Jansen VAA, Woodward MJ. 2013. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka, two prevalent serovars associated with different livestock species in the UK. *BMC genomics*. 14:365

Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DMA, Jensen AB, Wegener HC, AArestrup FM. 2011. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne pathogens and disease* 8: 887-900.

Hoelzer K, Soyer Y, Rodriguez-Rivera LD, Cummings KJ, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Root TP, Dumas NB, Warnick LD, Gröhn YT, Wiedmann M, Baker KNK, Besser TE, Hancock DD, and Davis MA. 2010. The prevalence of multidrug resistance is higher among bovine than human *Salmonella enterica* serotype Newport, Typhimurium, and 4,5,12:i:-

isolates in the United States but differs by serotype and geographic region. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(17):5947–5959.

Hudhes LA, Wigley P, Bennett M, Chantrey J and Williams N. 2010. Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from wild birds in northern England suggests host-adapted strain. *Letters in Applied Microbiology*. 51: 477-479

Hunter PL and Gaston AM. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. 26: 2465-2466.

Ikumapayi UN, Antonio M, Sonne-Hansen J, Biney E, Enwere G, Okoko B, Oluwalana C, Vaughan A, Zaman SMA, Greenwood BM, Cutts FT and Adegbola RA. 2007. Molecular epidemiology of community-acquired invasive non-typhoidal *Salmonella* among children aged 2-29 months in rural Gambia and discovery of a new serovar, *Salmonella enterica* Dingiri. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 1479-1484

Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G and Achtman M. 2002. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50, 000 years old. *Infect. Genet. Evol.* 2: 39-45.

Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris Jr JG, and Sulakvelidze A. 2002. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1626-1635.

Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. 2009. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis.* 15(3):388-396.

Kumar R, Surendran PK, Thampuran N. 2008a. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. *Letters in Applied Microbiology*. 46: 221-226

Lamers RP, Stinnett JW, Muthukrishnan G, Parkinson CL and Cole AM. 2011. Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates. Plos one. 6: 16426-16426

Lee JH, Han KH, Choi SY, Lucas MES, Mondlane C, Ansaruzzaman M, Nair GB, Sack DA, Seidlein LV, Clemens JD, Song Manki, and Chun J. 2006. Multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates from Mozambique that harbour the classical CTX prophage. Journal of Medical Microbiology. 55: 165-170.

Liebana E, Guuns D, Garcia-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley, and Davies RH. 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. Journal of Clinical Microbiology. 39: 3609-3616.

Liebana E, Garcia-Migura L, Guard-Petter J, McDowell SWJ, Rankin S, Opitz HM, Clifton-Hadley FA, and Davies RH. 2002. *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29, and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. Journal of Applied Microbiology. 92: 196-209.

Liu, F., Barrangou R, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Knabel SJ, and Dudley Edward G. 2011. Novel virulence gene and CRISPR multilocus sequence typing scheme for subtyping the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 1946–1956.

Liu BW, Liu B, Zhu XN, Shui YJ Xian SM. 2011. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing. Food Microbiology Elsevier. 1-8

Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Morrison DA, Boulnois GJ and Claverys JP. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Research. 20: 3479-3483

Murakami K, Horikawa K, and Otsuki K. 1999. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* from human outbreaks by pulse field gel electrophoresis. Journal of Veterinary Medicine Science. 61: 439-442.

Nielsen LN, Sheppard SK, McCarthy ND, Maiden MCJ, Ingmer H and Krogfelt KA. 2009. MLST clustering of *Campylobacter jejuni* isolates from patients with gastroenteritis, reactive arthritis and Guillain-Barré syndrome. *Journal of Applied Microbiology*. 108: 591-599

Noda T, Murakami K, Asai T, Etoh Y, Ishihara T, Kuroki T, Horikawa K and Fujimoto S. 2011. Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* strains in Japan between 1973 and 2004. *Acta Veterinaria scandinavica*. 53: 1-6.

Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E and Vaca S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 6:17.

Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW, and Gheeling LL. 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. 152: 907-909.

Protocols used for MLST of *Salmonella enterica*. MLST Databases at Environmental Research Institute, University College Cork. Disponible en URL en <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica.html>

Regalado-Pineda ID, 2011. Aislamiento y Caracterización Bioquímica y Genética de *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* en productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán, México. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Ruiz Ausina V, Moreno Guillen S. 2005. Epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas en Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editorial médica panamericana. Madrid España. 71-83.

Ross IL, and Heuzenroeder MW. 2005. Discrimination within phenotypically closely related definitive types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the multiple amplification of phage locus typing technique. *J. Clin. Microbiol.* 43:1604–1611.

Smith NH, Beltran P, Selander RK (1990) Recombination of *Salmonella* Phase 1 flagellin genes generates new serovars. *J Bacteriol* 172: 2209–2216.

Sambrook, J and Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring, USA. Sharples GJ and Lloyd RG. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*. 18: 6503-6508

Soyer Y, Switt AM, Davis MA, Maurer J, McDonough PL, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Root T, Warnick LD, Gröhn YT, and Wiedmann M. 2009. *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:–, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(11):3546–3556.

Srivastana S and Misha N. 2009. Genetic markers a cutting edge technology in herbal drug research. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 1: 1-18

Stepan RM, Sherwood JS, Petermann SR and Logue CM. 2011. Molecular and comparative analysis of *Salmonella enterica* Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. *BioMed Central Microbiology*. 11:1-9

Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC and Higgins CF. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*. 37: 1015-1026

Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su WL, Hof J, Craver MPJ, McDonough P, Boor KJ, and Wiedmann M. 2005. DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 43: 3688–3698.

Tamura K, Peterson D, Paterson N, Stecher G, Nei Masatoshi and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-3739.

Tankouo-Sandjong, B., et al. 2007. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *J. Microbiol. Methods*. 69:23–36.

Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, and Euzéby JP. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 521-524.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*. 25: 4876-4882.

Torpdahl M, Skova MN, Sandvang D, Baggesen DL. 2007. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *Journal of Microbiological Methods*. 63: 173– 184.

Turner KM, Feil EJ. 2007. The secret life of the multilocus sequence type. *Int J Antimicrob Agents*. 29: 129–135.

Turner KME, Hanage WP, Fraser C, Connor TR and Spratt BG. 2007. Assessing the reliability of eBURST using simulated populations with known ancestry. *BMC Microbiology*. 7:30 doi:10.1186/1471-2180-7-30

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. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Voogt N, Wannet WJ, Nagelkerke NJ, and Henken AM. 2002. Differences between national reference laboratories of the European community in their ability to serotype *Salmonella* species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 21: 204-208.

Wang Y, Zhao A, Zhu R, Lan R, Jin D, Cui Z, Wang Y, Li Z, Wang Y, Xu J and Ye C. 2012. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China. *BioMed Central Microbiology*. 12:119

WHO. 2002. Foodborne diseases, emerging. Geneva, World Health Organization. Fact Sheet N°124.

WHO. 2008. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva, World Health Organization.

Wiesner M, Zaidi MB, Calva E, Fernandez-Mora M, Calva JJ, and 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: 1-15

Winokur PL. 2003. Molecular epidemiological for *Salmonella* strain discrimination. Frontiers in Bioscience. 8: 14-24.

Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-García MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott J, Zhao S, McDermott P, and Tollefson L. 2008. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. Emerging Infectious Diseases. 14: 429-4353.

Ziemer CJ and Steadham SR. 2003. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. Letters in Applied Microbiology. 37: 463-469.