



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN



“RELACIÓN CLONAL DE CEPAS DE *SALMONELLA*
ANATUM AISLADAS EN PRODUCTOS VEGETALES”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

WALDO MORENO DANIEL

ASESOR:

Q.A. VICTOR MANUEL LOPEZ HERRERA

CO-ASESOR:

M. EN C. BEATRIZ LUCIA GONZÁLEZ MALDONADO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Índice de Tablas	3
Índice de Figuras	4
Lista de abreviaturas.....	5
Introducción	7
Inocuidad en los alimentos	9
Enfermedades transmitidas por alimentos	9
Caracterización Bioquímica de <i>Salmonella</i>	11
Epidemiología de <i>Salmonella</i>	13
Patogenia de <i>Salmonella</i>	13
Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	14
Manifestaciones clínicas	15
Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes	16
Electroforesis en Gel de Campos Pulsados.....	18
Sistemas actuales de electroforesis de campos pulsantes	22
Componentes básicos de un sistema de PFGE	24
Variables que afectan a la resolución del PFGE	25
Enzimas de restricción.....	28
Origen de las enzimas de restricción	28
Nomenclatura de las enzimas de restricción	29
Clasificación de enzimas de restricción	29
Tipos de corte producidos por las enzimas de restricción	30
Factores que afectan la actividad de las enzimas de restricción.....	32
Análisis de Clusters.....	32
Justificación	34
Objetivo General.....	36

Objetivos Particulares	36
Hipótesis	36
Metodología.....	37
Aislamiento e identificación de cepas de <i>Salmonella</i>	37
Recuperación y corroboración de cepas	37
Protocolo de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados	38
Elaboración de Plugs	38
Lisis celular y lavado de plugs.....	40
Restricción del ADN	41
Preparación del gel de agarosa para la corrida electroforética.....	44
Condiciones de la electroforesis	47
Tinción del gel de PFGE y obtención de imagen	47
Resultados.....	48
Análisis de Resultados	53
Conclusiones.....	57
Apéndice 1: Preparación de medios de cultivo.....	58
Apéndice 2: Preparación de soluciones para PFGE.	62
Apéndice 3: Técnica de PFGE por el CHEF Mapper de Bio Rad.....	65
Bibliografía.....	73

Índice de Tablas

Tabla 1. Volumen de reactivos empleados en la pre-restricción enzimática para 10 plugs.....	pág. 43
Tabla 2. Volumen de reactivos empleados en la restricción enzimática para 10 plugs.....	pág. 44
Tabla 3. Condiciones óptimas de electroforesis específicas para <i>Salmonella</i>	pág.47
Tabla 4. Caracterización fenotípica de las 65 cepas de <i>Salmonella enterica</i> serotipo <i>anatum</i> en distintos medios selectivos y diferenciales, así como en uno de enriquecimiento.....	pág. 49
Tabla 5. Condiciones electroforéticas empleadas para <i>Salmonella enterica</i> serotipo <i>Anatum</i>	pág.50
Tabla 6. Componentes del agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD).....	pág.58
Tabla 7. Componentes del agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS).....	pág.59
Tabla 8. Componentes del agar Enterico Hektoen (EH).....	pág.60
Tabla 9. Componentes del agar Soya Trypticasa.....	pág.61
Tabla 10. Volumen de TBE a agregar de acuerdo a su presentación comercial para llegar a la concentración final de 0.5X.....	pág.64
Tabla 11. Volumen de reactivos empleados en la pre-restricción enzimática de acuerdo a la metodología de Pulsenet.....	pág.68
Tabla 12. Volumen de reactivos empleados en la pre-restricción enzimática de acuerdo a la metodología de PulseNet.....	pág.68

Índice de Figuras

Figura. 1. Esquema de la disposición de electrodos con respecto al gel en los sistemas más comúnmente empleados.....	pág.23
Figura 2. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF.....	pág.23
Figura 3 Esquema de los componentes básicos de la PFGE.....	pág.25
Figura 4. Ejemplo del corte de la enzima <i>EcoRI</i> en una secuencia palindrome.....	pág.30
Figura 5. Corte cohesivo hecho por la enzima <i>BamHI</i>	pág.31
Figura 6. Cortes romos hecho por la enzima <i>SspI</i>	pág.31
Figura 7. Isoesquizimeros generados por las enzimas <i>Asp 718</i> y <i>KpnI</i>	pág.31
Figura 8. Representación gráfica de un dendograma.....	pág.34
Figura 9. Elaboración de bloques de agarosa.....	pág.39
Figura 10. Mini bloque de Agarosa.....	pág.40
Figura 11. Lisis celular y lavados en bloques de agarosa.....	pág.41
Figura 12. Restricción enzimática con <i>XbaI</i>	pág.43
Figura 13. Alineación de la base y el molde para la elaboración del gel de agarosa.....	pág.45
Figura 14. Preparación del gel de agarosa para la corrida electroforética.....	pág.46
Figura 15. Tinción del gel y captura de imagen.....	pág.51
Figura 16. Dendograma de cepas de <i>Salmonella entérica</i>	pág.52

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
µl/µm	Micro litro, micro metro
A	Adenina
ATP	Adenosin tri fosfato
BAM	Manual bacteriológico analítico
BSA	Albumina de suero bovino
C	Citosina
CHEF	Electroforesis de campos eléctricos homogéneos en un contorno fijo
CNRPyC	Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes
D-	Dextrógiro
DNA/ADN	Ácido desoxirribonucleico
E.E.U.U.	Estados unidos de américa
EC	Evaluación de la conformidad
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EH	Entérico Hektoen
ETA	Enfermedad de transmisión alimentaria
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FIGE	Electroforesis de inversión de campos
G	Guanina
g	Gramos
H ₂ O	Agua
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
IMNC	Instituto mexicano de normalización y certificación
Kb	Kilo base
L	Litro
L-	Levógiro
LDDOP	Laboratorio de diagnóstico para la detección de organismo patógenos
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
Mb	Megabase
mg	Miligramos
Mg ²⁺	Magnesio

Min	Minutos
mL	Mililitros
MW	Mega vatios
nm	Nanómetros
NMX	Norma mexicana
OFAGE	Electroforesis de campos ortogonales alternantes
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados
pH	Potencial de hidrógeno
RGE	Electroforesis rotatoria
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RM	Rojo de metilo
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SENASICA	Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
Sp. /spp.	Especie
SS	<i>Salmonella Shigella</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de shigatoxina
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAFE	Electroforesis de campos alternantes transversales
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TSA	Agar soya tripticasa
U	Unidad de actividad enzimática
V	Voltio
VP	Vogues-Proskauer
XLD	Xilosa-Lisina-Desoxicolato

Introducción

El presente trabajo se realizó con el objetivo de conocer, profundizar, demostrar y comunicar la utilidad de la técnica de electroforesis en gel de campos pulsantes, como técnica de tipificación molecular y epidemiológica principalmente en bacterias, esto se llevó a cabo analizando cepas de la bacteria *Sallmonella* específicamente del serotipo Anatum aisladas de distintas fuentes vegetales de origen primario (directamente del campo) de toda la república mexicana, identificadas genótipicamente con PCR de tiempo real, confirmándolas fenotípicamente por medio de agares selectivos y diferenciales así como con pruebas bioquímicas secundarias con ayuda del equipo Vitek, esto, con la finalidad de determinar el grado de clonalidad de este género y así realizar un mapeo genético en forma dendograma que nos indique la relación clonal entre estas cepas, en otras palabras, se realizó con el objetivo de determinar los principales grupos de *Sallmonella* Anatum que se encuentran a lo largo de la República a manera de concientizar y dar la importancia de PFGE que se considera anticuada pero que son de gran utilidad.

Ya que a pesar de existir técnicas más recientes y automatizadas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes, el análisis del ADN por secuenciación: *multilocus sequence typing* (MLST), loci de repetición en tándem de número variable (VNTR), Secuenciación del genoma completo (WGS), son técnicas que requieren de una infraestructura especial donde se asegure la esterilidad del área de trabajo.

En cambio, al realizar la técnica de PFGE se trabaja directamente con las bacterias lo que permite obtener un menor índice de contaminación debido a la forma en que se realiza su lisis, además la metodología de esta técnica permite aplicar directamente las capacidades y habilidades del Licenciado en Bioquímica Diagnóstica obtenidas a lo largo de la carrera, desde las buenas prácticas de laboratorio hasta el correcto uso de materiales y equipos de laboratorio.

Esta técnica permite analizar simultáneamente múltiples muestras de un posible brote, generando bandas que son comparadas entre sí, esto que nos permite analizar a simple vista las similitudes o diferencias que lleguen a presentar entre dichas

cepas, produciendo así una huella única en poco tiempo de análisis identificando todo el genoma y no una región específica como lo hacen las técnicas moleculares mencionadas anteriormente.

A su vez esta técnica es considerada por muchos como artesanal, debido a que el resultado final muestra la capacidad del analista durante las distintas etapas de la metodología y hasta la del revelado del gel electroforético se puede analizar y detectar en qué punto existió una desviación, es por esto que es una buena técnica de tipificación molecular, que es fácil de analizar, con un tiempo relativamente corto de análisis, lo cual permite resolver posibles disputas internacionales debido a los brotes generados por contaminación de bacterias en alimentos, además de generar una biblioteca genética de las distintas cepas endémicas y así dar seguimiento a las mutaciones que puedan llegar a presentar.

Por último, existe poca información actualizada sobre esta técnica y con este trabajo se pretende retomar los puntos clave, tanto teóricos como prácticos, recopilando así información útil y resumida, que permita ser de ayuda a personas que estén interesadas en retomarla como método de tipificación en distintas áreas, llegando incluso a ser mejorada y retomada como un gold standard en la epidemiología nacional.

Inocuidad en los alimentos

En la actualidad, la seguridad alimentaria tiene que ver con la producción suficiente de alimentos de óptima calidad y además está relacionada con el desarrollo económico y social de la población, lo cual incluye, la disponibilidad y acceso de los alimentos con calidad fitosanitaria y nutrimental. (Jaramillo, 2011). Todas las personas tienen derecho a que los alimentos que consumen sean inocuos. Es decir, que no contengan agentes físicos, químicos o biológicos en niveles que pongan en peligro su salud (González, 2013).

La inocuidad de los alimentos es un atributo fundamental de la calidad, este se genera desde la producción primaria, es decir, en la finca, y se transfiere a otras fases de la cadena alimentaria como el procesamiento, el empaque, el transporte, la comercialización y aún la preparación del producto y su consumo.

La inocuidad en dichas cadenas agroalimentarias, se considera una responsabilidad conjunta del gobierno, la industria y los consumidores, el gobierno cumple la función de eje de esta relación al crear las condiciones ambientales y el marco normativo necesarios para regular las actividades de la industria alimentaria en el pleno interés de productores y consumidores (Ministerio de salud, 2013).

Enfermedades transmitidas por alimentos

Cuando ciertas bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedades contaminan los alimentos, éstos pueden causar enfermedades. A este tipo de enfermedades se les conoce como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas (PAHO, 2015).

Entre los factores que contribuyen a los posibles riesgos de los alimentos, se incluyen las prácticas agrícolas y ganaderas inadecuadas, la falta de higiene en todas las fases de la cadena alimentaria, la ausencia de controles preventivos en las operaciones de elaboración y preparación de los alimentos, la utilización

inadecuada de productos químicos y la contaminación de materias primas y del agua (Tafúr, 2009).

Un brote de ETA se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad, que luego es confirmado por el laboratorio. Las ETA pueden manifestarse a través de:

A) Infecciones transmitidas por alimentos: son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos.

Por ejemplo:

- Salmonelosis
- Hepatitis viral tipo A
- Toxoplasmosis.

B) Intoxicaciones causadas por alimentos: ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después que el microorganismo es eliminado. Algunas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como en el caso de ciertos hongos y animales como el pez globo. Ejemplos: botulismo, intoxicación estafilocócica o por toxinas producidas por hongos (PAHO, 2015).

Para que ocurra una ETA, el patógeno o su(s) toxina(s) debe(n) estar presente(s) en el alimento. Sin embargo, la sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad ocurrirá. En la mayoría de los casos de ETA:

- El patógeno debe estar presente en cantidad suficiente como para causar una infección o para producir toxinas.
- El alimento debe ser capaz de sustentar el crecimiento de los patógenos, es decir, debe presentar características intrínsecas que favorezcan el desarrollo del agente.

- El alimento debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante tiempo suficiente como para que el organismo patógeno se multiplique y/o produzca toxina. Otras condiciones extrínsecas deben prevalecer para que esta multiplicación y/o producción de toxina sea favorecida.
- Debe ingerirse una cantidad (porción) suficiente del alimento conteniendo el agente, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada (Rojas, 2005).

Entre los patógenos transmitidos por los alimentos, *Salmonella enterica* es uno de los agentes más relevantes debido a su impacto en la salud pública y la sanidad animal, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En este sentido, *Salmonella* es el agente etiológico bacteriano más frecuente en los brotes transmitidos por alimentos (Barreto, 2016).

El género *Salmonella* recibe su nombre en honor al microbiólogo americano Daniel Elmer Salmon (1850-1914) junto con Theobald Smith (1859-1934) fueron quienes descubrieron el microorganismo designado como *Salmonella* en 1885, aislándolos de cerdos con cólera (Stanchi, 2007).

Caracterización Bioquímica de *Salmonella*

Los microorganismos para crecer requieren de polimerización de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos; estos elementos deben encontrarse preformados en el medio donde se encuentra el microorganismo o deben ser sintetizados por la propia célula. Para realizar el metabolismo se requiere además la maquinaria biosintética para transformar los sustratos en materiales básicos o compuestos utilizables para la célula, y la energía para realizarlas reacciones químicas (Escobar, 2004).

Hasta la fecha se han identificado más de 2500 serotipos o serovares diferentes agrupados en dos especies, *Salmonella bongori* y *Samonella enterica*. Si bien todos los serotipos pueden causar la enfermedad en el ser humano, unos pocos son específicos de algunos huéspedes y pueden alojarse solo en una o en unas pocas especies animales, por ejemplo, *Salmonella enterica* serotipo Dublin en vacunos, y

Salmonella enterica serotipo Choleraesuis en porcinos. Cuando esos serotipos particulares provocan la enfermedad en las personas suelen ser invasivos y pueden ser mortales

Sin embargo, la mayoría de los serotipos se encuentran en una gran diversidad de huéspedes. Por lo general, esos serotipos causan gastroenteritis, que suele ser un trastorno sin complicaciones y no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. A ese grupo pertenecen *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitida de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo (OMS, 2018).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5,0 μm , generalmente móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos y no esporulados. No fermentan la lactosa (excepto *Salmonella enterica* sub especie *arizonae* y *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae*), fermentan glucosa con producción de gas (excepto *Salmonella typhi*); no producen indol; no degradan urea; decarboxilan lisina y ornitina, (RENAPRA, 2015) Vogues, Proskauer (VP) negativo, rojo de metilo (RM) y citrato de Simmons positivo, producen ácido sulfhídrico (H_2S). Entre otras características bioquímicas se encuentran la reducción de nitratos a nitritos, no desaminan la fenilalanina y son tetraciónato reductasa (Jawetz, 2005). También fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xiolosa y D-dulcitol (Terragno, 2003).

Toleran altas concentraciones de sales biliares y su crecimiento no resulta inhibido por la presencia de colorantes como el azul de metileno, la eosina, la fucsina ácida, el cristal violeta o el verde brillante, esta resistencia se emplea para el diseño de medios de cultivos selectivos, como el agar entérico Hektoen (EH), el agar verde brillante o el agar eosina-azul de metileno (EMB). Las altas concentraciones de sales biliares, así como los distintos colorantes adicionados a estos medios van a inhibir la flora acompañante permitiendo el crecimiento selectivo. La morfología de

las colonias de *Salmonella* en estos medios, al no fermentar la lactosa y producir H₂S, se utilizará como carácter diferencial de género (Martínez, 2007).

Las salmonelas se multiplican bien en medios ordinarios, las colonias post incubación por 18 a 24 horas a 32°C son de 2 a 3 mm de diámetro salvo algunos serotipos que producen colonias pequeñas; con algunas excepciones no presentan cápsula (Smith, 1952).

Los criterios para la identificación bioquímica de *Salmonella spp.* son relativamente estándar, sin embargo, puede haber variaciones en los medios de cultivo y algunas pruebas bioquímicas, por lo cual como alternativa se están introduciendo cada vez más los métodos moleculares que permiten un diagnóstico más rápido y pueden ser más simples de realizar, pero tienen como desventaja que son de costo elevado (Terragno, 2003).

Epidemiología de *Salmonella*

Salmonella se transmite por la ruta fecal-oral, ya sea directamente, o bien indirectamente, a través de los alimentos. Es capaz de sobrevivir la acidez del estómago y la alta osmolaridad del intestino delgado, induce su internalización por las células epiteliales intestinales del íleon y resiste la fagocitosis mediada por las células dendríticas y macrófagos, logrando colonizar el tejido linfóide subyacente y los ganglios linfáticos mesentéricos (Barreto, 2016).

Patogenia de *Salmonella*

Para *Salmonella spp.* se conocen varios factores de virulencia, uno de ellos es la producción de al menos tres toxinas: las enterotoxinas que son sustancias liberadas al intestino y que ocasionan síntomas gastrointestinales como cólico y diarrea, las endotoxinas se hacen parte de la membrana externa de la bacteria y cuya actividad biológica está asociada con los lipopolisacáridos (LPS) y por último, las citotoxinas que están asociadas con la superficie celular, las cuales inhiben la síntesis proteica en la célula hospedera y pueden estar implicadas en la adherencia de las células

epiteliales constituyendo esta última un segundo factor de virulencia de *Salmonella* spp. (Whitt, 2002).

Cuando la persona ingiere *Salmonella* el desarrollo de la enfermedad va a depender fundamentalmente de la cantidad de microorganismos ingeridos (inóculo), de su virulencia y de factores dependientes del huésped. Una vez superada la barrera gástrica las salmonelas pasan al intestino delgado, donde encuentran un medio más idóneo, más aún si hay una alteración de la flora intestinal normal por el uso previo de antibioterapia (Jurado, 2015).

La *Salmonella* se adhiere a receptores específicos de las vellosidades intestinales, atraviesan la mucosa, alcanzan los vasos linfáticos de las placas de Peyer donde se multiplican, pasando a la sangre donde son atrapadas por fagocitos y macrófagos del sistema fagocítico mononuclear, acumulándose en los órganos ricos en él como son hígado, el bazo y la médula ósea. Finalmente vuelven a pasar al intestino y a la vesícula biliar. Las placas de Peyer se muestran tumefactas pudiéndose ulcerar la mucosa intestinal pasada la primera semana y originar una hemorragia o la perforación, las dos complicaciones más graves del cuadro (Jurado, 2015).

Islas de patogenicidad de *Salmonella*

El genoma de las bacterias entéricas se encuentra sometido a una intensa presión selectiva debido a factores que incluyen la competencia con la microbiota normal, la adquisición de nutrientes en el organismo y en el ambiente, y la interacción con la respuesta inmune del hospedero. Esto se traduce en la presencia de genes y bloques de genes que tienen una constitución diferente respecto del resto del cromosoma, y que participan mejorando la adaptación o modificando la patogenicidad de las bacterias. En general, estos segmentos se conocen como islas genómicas, pero cuando codifican funciones de virulencia se les denomina islas de patogenicidad. Estas islas de patogenicidad constituyen importantes elementos en la evolución de bacterias patógenas dado que, en un simple paso, un organismo o bacteria benigna puede transformarse en un patógeno (Barreto, 2016).

Una característica esencial de la patogenicidad de Salmonella es su habilidad de engañar a la célula hospedera en una interacción bioquímica denominada de dos vías o conversación cruzada, lo cual conduce a la respuesta tanto de la bacteria como de la célula hospedera. Salmonella responde a la presencia de la célula hospedera por activación de un sistema especializado de secreción de proteínas llamado Tipo III o dependiente de contacto (Galán, 2001).

Este sistema permite a ciertos bacilos Gram negativos secretar e inyectar proteínas de patogenicidad en el citosol de la célula hospedera eucariótica, las proteínas inyectadas frecuentemente re ensamblan factores eucarióticos con funcionamiento de señales de transducción y son capaces de interferir con vías de señalización de la célula hospedera (Sánchez, 2003).

En el caso de Salmonella, la redirección de señales celulares de transducción resulta en la reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera, estableciendo nichos subcelulares para colonización bacteriana y facilitando una estrategia patogénica altamente adaptada de líneas de comunicación con la defensa del hospedero (Bliska, 1993).

Los dos sistemas de secreción tipo III de Salmonella son codificados en dos distintos grupos de genes llamados islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI1 y SPI 2), los cuales parecen jugar dos papeles diferentes durante la patogénesis, SPI 1 es requerida para la penetración inicial a la mucosa intestinal y SPI 2 necesaria para los estados subsecuentes de infección sistémica (Bliska, 1993).

Manifestaciones clínicas

Tras un periodo de incubación de 6-48 horas desde la ingesta de alimentos o agua contaminados, aparece la diarrea que va desde varias deposiciones blandas y sin sangre a diarreas fulminantes y sanguinolentas. Se puede acompañar de fiebre de 38-39°C en las primeras 48-72 horas, náuseas, vómitos, dolor abdominal tipo cólico, escalofríos, cefalea, mialgias y otros síntomas sistémicos. El cuadro, en general, se autolimita en menos de 10 días (Jurado, 2010).

Las manifestaciones clínicas de las salmonelosis se presentan básicamente bajo tres modalidades las denominadas fiebres entéricas, entre las cuales la más común es la fiebre tifoidea producida por la *S. typhi*, las gastroenteritis producidas por varias subespecies y la forma septicémica, caracterizada por la bacteremia asociada a lesiones focales (Saravia, 2008).

En México, la salmonelosis ocupa uno de los principales lugares dentro de las causas de gastroenteritis. La Secretaría de Salud de México reportó en 2017 un acumulado de 92,013 casos confirmados de salmonelosis en todo el país, siendo el mayor número de casos en los meses de mayo a septiembre (DGE, 2017).

Todos los países necesitan contar con programas de control de alimentos para garantizar que los suministros nacionales sean inocuos, de buena calidad y estén disponibles en cantidades adecuadas y precios asequibles, para asegurar que todos los grupos de la población puedan gozar de un estado de salud y nutrición aceptable. El control de alimentos incluye todas las actividades e iniciativas nacionales que se emprenden de conformidad con un procedimiento integrado, en el que participan el gobierno y todos los segmentos y sectores de la industria alimentaria (FAO, 2002).

Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) protege los recursos agrícolas, acuícolas y pecuarios de plagas y enfermedades de importancia cuarentenaria. También regula y promueve la aplicación y certificación de los sistemas de reducción de riesgos de contaminación de los alimentos y su calidad agroalimentaria, para facilitar el comercio nacional e internacional de bienes de origen vegetal y animal. (SENASICA 2020)

La inocuidad alimentaria en México es vigilada por la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuicola y Pesquera a través del Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes (CNRPyC) del SENASICA, a través del Programa Nacional de Monitoreo de Residuos Tóxicos y Contaminantes, el cual fue creado debido a la necesidad del Gobierno Federal de garantizar y mejorar la

calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos de origen agrícola de México. El principal objetivo de dicho programa es coadyuvar en el mejoramiento de inocuidad y calidad sanitaria de los alimentos de origen agropecuario, acuícola y pesquero de México; mediante la aplicación efectiva de Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación, contando con la colaboración de Dependencias Federales, Estatales, productores, industriales y agentes comerciales de la cadena productiva (SENASICA, 2013).

El CNRPYC cuenta con distintos laboratorios, entre ellos es el Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP) el cual apoya los programas de vigilancia y monitoreo de vegetales, de consumo nacional (incluyendo los de importación), como los designados al mercado de exportación.

Este importante laboratorio de investigación está a cargo del SENASICA el cual es un órgano administrativo desconcentrado de la antes Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y hoy Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER); su labor consiste en la aplicación de técnicas con base en los métodos publicados por la Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos) FDA de los Estados Unidos, esto con la finalidad de evitar que los alimentos contengan microorganismos patógenos que dañen la agricultura del país, que a su vez afectarían la salud pública y la economía de los productores (SENASICA, 2012).

Adicionalmente, es también tarea del CNRPYC establecer las metodologías analíticas que van a ser la referencia de los laboratorios particulares, que llevan a cabo análisis de este tipo, por lo que se mantiene de manera permanente a la vanguardia técnica y tecnológica, asimismo, cuenta con un sistema de gestión de calidad para demostrar su competencia técnica y la confiabilidad de los resultados que emite.

De este modo, cuenta con la certificación de todos sus procesos dentro del esquema de la norma NMX-CC-9001-IMNC-2008 que establece los “Requisitos de los sistemas de gestión de la calidad”, así como con la acreditación del cumplimiento de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006, que establece los “Requisitos generales

para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”, por lo que este centro se desempeña de manera permanente dentro de estos dos esquemas de gestión de calidad. La participación en ensayos de aptitud y la obtención de resultados satisfactorios, demuestran la calidad analítica del CNRPyC (SENASICA, 2013).

El LDDOP, se enfoca principalmente en la detección de 5 patógenos los cuales son 4 Gram negativos: *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* y el grupo STEC que es conformado por 6 serotipos de *Escherichia coli* y un patógeno Gram positivo; *Listeria monocytogenes*.

Por otra parte, a partir del proyecto de colaboración entre Laboratorios de la FDA y SENASICA (E.E.U.U.- México), se generó una mayor comunicación y entendimiento técnico entre ambas agencias, permitiendo la adecuación de las instalaciones y equipamiento de vanguardia del LDDOP (SENASICA, 2012). Un ejemplo de esto fue la implementación y capacitación en la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE).

Electroforesis en Gel de Campos Pulsados.

La tipificación de microorganismos es el establecimiento de nuevas subcategorías dentro de una misma especie, útil en estudios de epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas ya que permite determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es de gran importancia cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multi resistentes, pues permite determinar el número de clones circulantes, identificar las fuentes de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión (Cockerill, 2004).

Los métodos empleados para la tipificación se clasifican en dos grupos, fenotípicos y genotípicos. Los fenotípicos están fundamentados en determinar las características fisiológicas y bioquímicas expresadas por los microorganismos por ejemplo la biotipificación, tipificación por antibiogramas (sensibilidad/resistencia a

los antimicrobianos), serotipificación (reacción antígeno-anticuerpo) y fagotipificación (sensibilidad a bacteriófagos) (Dijkshoorn, 2001).

Estos métodos tienen problemas de reproducibilidad asociados a la variabilidad de la expresión genética y problemas de tipificabilidad debido que una proporción alta de microorganismos no pueden ser caracterizados (Williams, 1999).

Los métodos genotípicos basados en el análisis del ADN de microorganismos tienen las ventajas de tener alto grado de tipificabilidad, buena reproducibilidad, capacidad óptima de discriminación y pueden aplicarse a microorganismos que no pueden ser cultivados con facilidad (Garaizar, 2006).

Estas técnicas moleculares han jugado un importante papel en la tipificación de microorganismos patógenos, y en la vigilancia y control epidemiológico de enfermedades que afectan tanto al hombre como a los animales. Dentro de las más utilizadas se encuentran las basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa combinada con restricción enzimática, electroforesis convencional en gel de agarosa, la hibridación de las moléculas con sondas específicas, la secuenciación completa o parcial del genoma y los microarreglos. Estos métodos a pesar de ser rápidos y reproducibles involucran múltiples pasos, son costosos, requieren experiencia previa y, además, en un único experimento, sólo pueden analizarse regiones pequeñas del genoma (Oliver, 1999).

Es de destacar que, a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza (Morales, 2006). Una de las técnicas más utilizadas para caracterizar el genoma de los microorganismos, es la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE). Esta se consideraba el “estándar de oro” de los métodos de tipificación molecular. Los patrones de bandas que se obtienen después de la electroforesis, de muestras de ADN procedentes de un microorganismo, caracterizan inequívocamente su dotación genética y son altamente reproducibles y discriminatorios (Oliver, 1999).

La electroforesis es uno de los métodos analíticos más empleados en los laboratorios de investigación para determinar la cantidad de nucleótidos que contienen las moléculas de ADN. Esta cantidad se denomina talla o tamaño, se expresa en pares de bases y es proporcional a la longitud de la molécula (un segmento de 10 nucleótidos mide 3,4 nm de longitud) (Freifelder, 1981). Dichas moléculas, en disolución acuosa y a pH neutro, se cargan negativamente debido a la ionización de sus grupos fosfatos, de manera que la aplicación de un campo eléctrico externo, provoca que las moléculas migren hacia el electrodo positivo (ánodo) (Nochumson, 1985). Esta migración ocurre en dependencia del tamaño (peso molecular), la carga neta y la forma hidrodinámica (estructura tridimensional) de las moléculas (Morales, 2006).

Para una especie bacteriana concreta, podemos encontrar enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana en cuestión. El uso de este tipo de enzimas permite la macrorestricción del ADN de la bacteria y la división en pocos fragmentos (entre 10 y 30). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 kb, y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, en las que se aplica un campo eléctrico constante o estático, sino que requieren técnicas en las que la orientación del campo eléctrico es variable periódicamente, como en la PFGE (Domínguez, 2005).

La combinación de estas dos técnicas, macrorrestricción del ADN y separación de los fragmentos por PFGE, se ha aplicado con mucha frecuencia en estudios epidemiológicos en bacteriología. Se obtienen así, patrones de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas (Domínguez, 2005).

En este método, el ADN viaja a través de un gel de agarosa concentrado, bajo la influencia de dos campos eléctricos. Los dos ángulos de los campos eléctricos se encuentran cerca a la perpendicularidad, no son uniformes en la intensidad de campo y cambian de manera alterna (pulsos). En general se supone que en

concentraciones altas de agarosa y con tensiones elevadas, las moléculas grandes de ADN deben ser elongadas a lo largo de la dirección del campo eléctrico con el fin de penetrar a través de los poros del gel. Cuanto más grande sea la molécula de ADN, mayor será el tiempo para encontrar la nueva orientación y la retención en el gel (Cardozo, 2015).

Durante los años 70, se observó que, bajo la acción de un campo eléctrico, las moléculas de ADN se reorientaban y se desplegaban avanzando en dirección al polo positivo. Cuando el campo eléctrico cesaba, las moléculas de ADN se relajaban recuperando su estado inicial. La aplicación de un segundo campo eléctrico, con una orientación distinta del primero, obligaba al ADN a cambiar su conformación y reorientarse de nuevo para poder avanzar en la dirección del segundo campo eléctrico.

El tiempo requerido para esta reorientación depende de la longitud de la molécula, esto es de su peso molecular. Tras el cambio de orientación del campo eléctrico, las moléculas grandes tardan más tiempo en alinearse y poder comenzar el avance a través del gel de lo que tardan las moléculas de ADN más pequeñas. Mientras los campos eléctricos que se alternen tengan la misma intensidad y voltaje, la migración final del ADN se recogerá en forma de línea recta, aunque el patrón final de separación de los fragmentos revelará la suma de todos los avances cortos en “zig-zag” que el ADN ha realizado (Domínguez, 2005).

Este principio fue el que llevó a Schwartz y Cantor en 1984 a la descripción de las técnicas de PFGE y su utilidad en la separación de moléculas grandes de ADN, del orden de varios cientos de kb. (Domínguez 2005). De manera general, la PFGE es una técnica que permite la separación de fragmentos de ADN de alto peso molecular 10 Kb a 10 Mb; (Nassonova, 2008) y tiene varias utilidades en el rastreo e investigación de los brotes de origen alimentario, también como la detección temprana de estos por el aumento de la incidencia de alguno de los subtipos usualmente implicados en brotes (Swaminathan, 2001).

Sistemas actuales de electroforesis de campos pulsantes

Se han descrito diferentes variaciones en la técnica que han conducido al concepto de configuraciones o sistemas de PFGE, que se caracterizan por poseer cámaras en las cuales se colocan los electrodos en ordenamientos diferentes. Estos sistemas se basan en el mismo fundamento físico de alternar la orientación del campo eléctrico, pero difieren entre sí en el ángulo que forman las líneas de fuerza de los campos eléctricos y en la homogeneidad de estos.

Entre las variantes de la PFGE se encuentran (Ver figura 1):

- La electroforesis en gel con gradientes de campos pulsantes, *Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis* (PFGE) (Schwartz, 1984).
- La de campos ortogonales alternantes (*Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis* (OFAGE), (Carle, 1984).
- La electroforesis rotatoria (*Rotating Gel Electrophoresis* (RGE), (Southern, 1987).
- La de inversión de campos (*Field Inversion Gel Electrophoresis* (FIGE), (Carle, 1984).

Entre las configuraciones más empleadas en la actualidad están (ver figura 1):

- La electroforesis de campos eléctricos homogéneos en un contorno fijo (*Contour Clamped Homogeneous Electric Field* (CHEF) (Chu, 1986).
- La electroforesis de campos alternantes transversales (*Transversal Alternating Field Electrophoresis* (TAFE) (Santamaría, 2015).

En el TAFE, se obtienen trayectos rectos de migración utilizando dos campos eléctricos no homogéneos que cruzan transversalmente el plano del gel y que garantizan líneas isopotenciales a lo ancho del mismo, mientras que, en el CHEF, se aplican campos eléctricos homogéneos, distribuyendo el voltaje alrededor de un contorno de electrodos dispuestos hexagonalmente (Santamaría, 2015).

De todos los sistemas desarrollados, el más extendido ha sido el CHEF. Sus mayores ventajas son la facilidad de manejo y la capacidad de separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos, que hacen mucho más fácil la

comparación entre ellos. Este sistema dispone de veinticuatro electrodos dispuestos periféricamente y fijos a un contorno hexagonal. (ver Figura 2) (Domínguez, 2005)

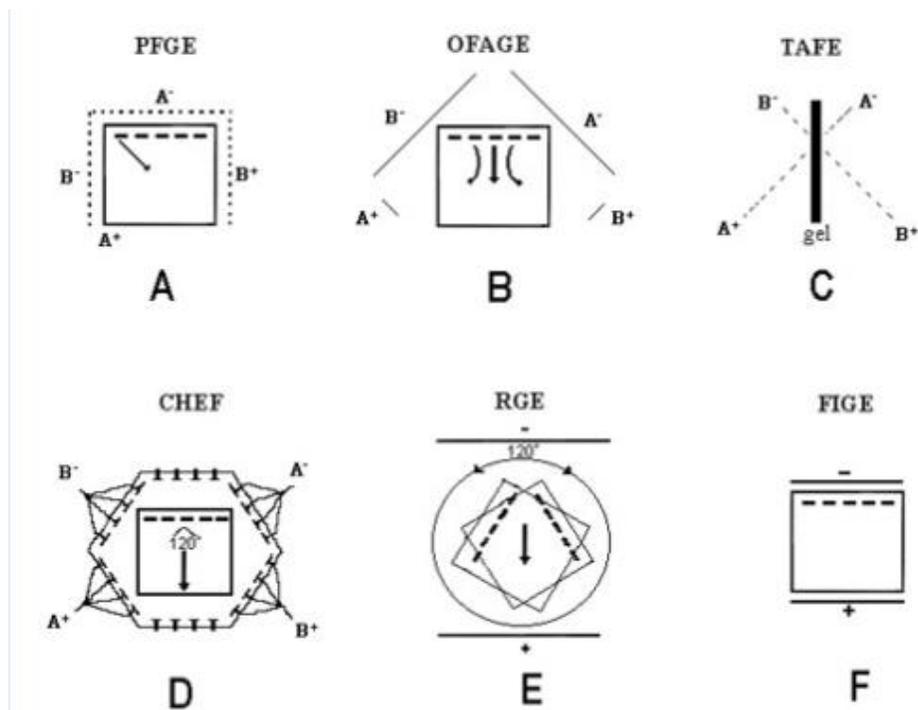


Figura 1. Esquema de la disposición de electrodos con respecto al gel en los sistemas más comúnmente empleados. A) PFGE, B) OFAGE, C) TAFE, D) CHEF, E) RGE en la variante de rotación del gel, F) FIGE. A⁺ A⁻, B⁺ B⁻ son los electrodos que generan los campos eléctricos pulsantes (Santamaría 2015).

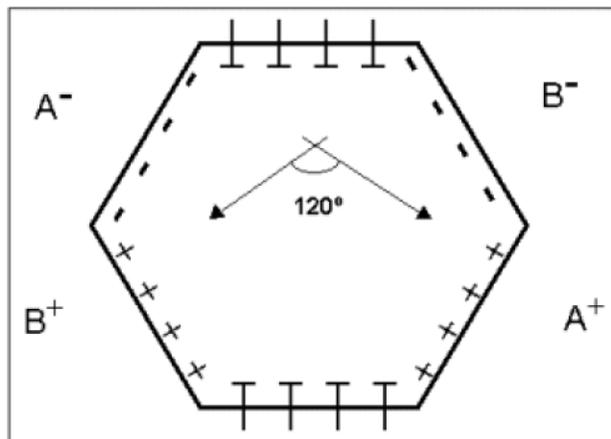


Figura 2. Esquema de la distribución de electrodos en el sistema CHEF de electroforesis en campo pulsante. El ángulo señalado (120°) es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B (Cardozo, 2015.)

El voltaje generado por la fuente de electroforesis o generador de corriente se divide entre los electrodos, de manera que se crea un gradiente constante a lo largo de

todo el gel. El ángulo de reorientación debe ser superior a 90° , habitualmente se trabaja con ángulos de 120° aunque existen modelos del sistema en el mercado que permiten modificar este parámetro. Por ángulo de reorientación, se entiende el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan y que refleja los grados de reorientación de una molécula de ADN para poder avanzar en la dirección de los campos eléctricos que se apliquen al gel (Domínguez, 2005).

Componentes básicos de un sistema de PFGE

- a) *Unidad de control de pulsos-generador de corriente.* Normalmente, en la misma unidad se reúnen la fuente de electroforesis (generador de 350 V) y el dispositivo que controla los 24 electrodos y la duración de la alternancia de los pulsos eléctricos (ver figura 3). (Domínguez, 2005).
- b) *Cubeta de electroforesis.* Es una cubeta acrílica en la que se encuentran los 24 electrodos distribuidos en forma hexagonal y en cuyo centro se coloca el gel de agarosa, sumergido en el tampón de electroforesis correspondiente. La recirculación del tampón de electroforesis es esencial por dos motivos:
 - 1) Para refrigerar y mantener una temperatura constante en la cubeta y en toda la superficie del gel
 - 2) Para mantener la capacidad de tampón de la solución, alterada por el proceso de electrolisis. Por tanto, desde la cubeta hay un tubo de salida del tampón hacia una unidad de refrigeración y desde ésta un tubo que conecta de nuevo con la cubeta. La recirculación se lleva a cabo con una bomba (ver figura 3) (Domínguez, 2005).
- c) *Bomba de recirculación del tampón.* Aspira el tampón de electroforesis de la cubeta, lo empuja a través de la unidad de refrigeración y lo devuelve a la cubeta. Es preferible que sea de flujo regulable, recomendándose de 0,5-1 litro/min (ver figura 3) (Domínguez, 2005).
- d) *Unidad de refrigeración.* Suele ser un aparato de refrigeración portátil. El tampón de PFGE circula a través de un único tubo de aluminio que se encuentra en contacto con la solución de refrigeración. La refrigeración del

tampón de electroforesis permite mantener constante la temperatura de la cubeta (generalmente se recomienda 14°C), utilizar voltajes superiores y por tanto electroforesis más rápidas (ver figura 3) (Domínguez, 2005).

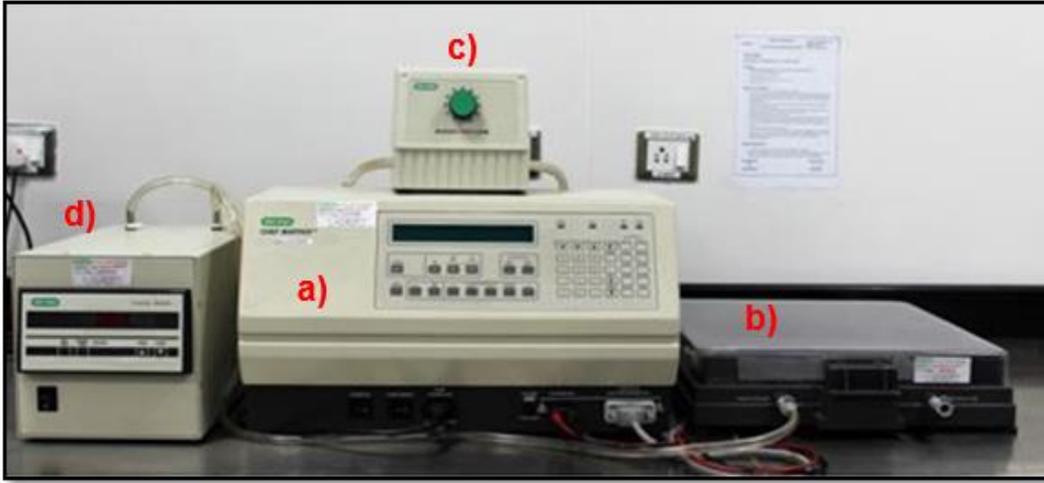


Figura 3 Esquema de los componentes básicos de la PFGE a) Unidad de control de pulsos-generador de corriente; b) Cubeta de electroforesis; c) Bomba de recirculación del tampón; d) Unidad de refrigeración.

Variables que afectan a la resolución del PFGE

Los resultados de las técnicas de PFGE son muy sensibles a variaciones en prácticamente todos los parámetros electroforéticos. Las condiciones para obtener la mejor resolución por PFGE están, por supuesto, en función del rango de tamaño de las moléculas a separar y de la enzima de restricción seleccionado, pero también intervienen variables técnicas como la duración y alternancia de los pulsos eléctricos, el voltaje, la temperatura de la cubeta, el tiempo de electroforesis, el tampón utilizado o el ángulo de reorientación (Domínguez, 2005).

Pulsos: duración y alternancia. Los sistemas de PFGE consiguen separar fragmentos grandes de ADN al inducir la reorientación de las moléculas mediante cambios periódicos en el campo eléctrico. La duración de los campos eléctricos que se alternan determina el tamaño del ADN que puede separarse. Los pulsos pueden durar fracciones de segundo, para separar moléculas de pocas kb, o puede durar algo más de una hora para separar moléculas mayores de 5 Mb, cada molécula se desplaza por efecto del campo, alcanzando rápidamente una velocidad constante

al equilibrarse la fuerza impulsora (fuerza del campo eléctrico) con la resistencia al avance (fuerza de fricción o rozamiento) impuesta por el medio en el que se desplaza.

Puesto que nos estamos refiriendo a la aplicación de PFGE en la tipificación bacteriana, el rango de peso molecular que interesa separar suele oscilar entre 20 kb y 600-800 kb, lo cual se consigue con tiempos que oscilan entre los 0,5 segundos y los 50-60 segundos. En general, cuanto mayor es la molécula de ADN, mayor tiempo de reorientación se requiere; las moléculas pequeñas, que pueden reorientarse con rapidez invierten gran parte del tiempo del intervalo de pulso en avanzar a lo largo del gel (Birre, 1993).

Voltaje. El gradiente de voltaje es la diferencia entre el potencial eléctrico de los electrodos, este valor representa la fuerza que conduce el ADN a través del gel. Por tanto, el gradiente de voltaje debe expresarse en unidades de voltaje por distancia. El tamaño del gel utilizado no modifica este parámetro, siempre que la distancia entre los electrodos o el voltaje aplicado no varíe. El uso de distintos voltajes afecta no sólo la distancia de migración sino también el rango de tamaños que pueden separarse. Así, para obtener una resolución comparable en geles procesados a diferentes voltajes, debe modificarse no sólo el tiempo de electroforesis, sino los intervalos de pulsos para compensar las diferencias en la migración de ADN. Utilizar un voltaje inferior requiere intervalos de pulso más largos para obtener resultados similares. A voltajes bajos, las moléculas de ADN requieren más tiempo para reorientarse y avanzar tras la alternancia del pulso eléctrico (Shwartz, 1984).

Temperatura de electroforesis. Como se ha mencionado previamente, la recirculación del tampón de electroforesis y el mantenimiento de una temperatura constante son condiciones indispensables para obtener resultados reproducibles. Temperaturas entre 12°C y 15°C son las más habituales. A medida que la temperatura aumenta, el ADN avanza más rápido, pero disminuye la resolución de las bandas en el gel. Temperaturas más bajas, entre 8 y 10°C, pueden ser recomendables para microorganismos cuyo ADN se degrada con facilidad (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* o *Clostridium difficile*), de este modo se

obtienen patrones con bandas mejor definidas, para compensar el enlentecimiento de la electroforesis deben, entonces, modificarse otros parámetros como voltaje, duración de la electroforesis, etc. (Gautom, 1997).

Tiempo de electroforesis. Debe intentarse mantener el tiempo mínimo de electroforesis necesario para obtener una resolución adecuada. En electroforesis largas la presencia de nucleasas residuales puede contribuir a la degradación del ADN, además, las bandas pierden definición en la zona más distal del gel. Para mejorar la resolución de una PFGE, deben intentar ajustarse otras variables, como el intervalo de los pulsos, aumentar el tiempo de electroforesis sólo aumentará el espacio entre las bandas que ya se hubiera separado, no ayudará a separar bandas que migran conjuntamente al inicio del gel (Shwartz, 1984).

Amortiguador de pH de electroforesis. Actualmente se dispone de distintos buffers para electroforesis de ADN de doble hebra. Los más usados son el buffer TAE (Tris, ácido acético y EDTA) y el TBE (Tris Borato-EDTA). La ventaja de usar TAE es que es menos costoso y a diferencia del TBE permite que las moléculas de ADN migren 10% más rápido. El TBE por su parte es un buffer muy eficiente y no se sobrecalienta fácilmente a grandes voltajes. Por esta razón, este buffer es usado para la resolución de grandes fragmentos de ADN en matrices poco concentradas (Yabar, 2003).

Ángulo de reorientación. Como se ha mencionado, por ángulo de reorientación, se entiende el ángulo que forman los vectores correspondientes a los dos campos eléctricos que se alternan. Para obtener una resolución adecuada por PFGE se requieren ángulos de reorientación de más de 90°. El estándar, cuando el sistema de PFGE tiene este parámetro fijo, es de 120°. En la actualidad existen modelos que permiten modificar este ángulo, disminuyéndolo, lo cual es útil para separar moléculas de ADN de gran tamaño (> 2Mb) (Birren, 1993).

Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son una herramienta primordial para la ejecución de diversos ensayos útiles en investigación clínica, desde la determinación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism, RFLP*), así como en la construcción de vectores con ADN recombinante y clonación de secuencias de ADN provenientes de humano, virus, bacterias y demás microorganismos de interés para la generación de conocimiento o para su aplicación en el área de la medicina (Salazar, 2013).

Las enzimas de restricción son endonucleasas (cortan secuencias internas del ADN). Catalizan el rompimiento de los enlaces de fosfato dentro de las hebras del ADN. Las enzimas requieren iones divalentes como el calcio y el magnesio para su activación y generan un fosfato 5 prima (5') y un grupo hidroxilo 3 prima (3') en el punto de corte. Una característica distintiva de las enzimas de restricción es que sólo cortan dentro de una secuencia específica de bases (Robles, 2015). Estas endonucleasas se denominan enzimas de restricción debido a que restringen la permanencia de un ADN exógeno en la célula bacteriana que produce dicha enzima (Salazar, 2013).

Origen de las enzimas de restricción

En 1960, Stewart Linny y Werner Arber aislaron, en *E. coli*, enzimas que metilaban moléculas de ADN y que además cortaban un enlace fosfodiéster del ADN no metilado. Más tarde, en 1970, se caracterizó la primera nucleasa de restricción por Daniel Nathans Hamilton Smith, aislada de *Haemophilus influenzae*, denominada Hind I. En la actualidad, se sabe que todas las especies de bacterias sintetizan uno o más tipos de endonucleasas capaces de hacer cortes en secuencias específicas de nucleótidos de una doble cadena de ADN exógeno; generalmente, este ADN “extraño” es el proveniente de los bacteriófagos, virus con capacidad de infectar a dichas bacterias (Salazar, 2013).

El descubrimiento de enzimas de restricción abrió una nueva era de genética molecular. Las enzimas de restricción cortan el ADN de una forma específica y

reproducibles. Esto, a su vez, facilitó la clonación molecular, la creación de mapas genéticos y la secuenciación de la estructura genética. Estos procedimientos hicieron posible el proyecto del Genoma Humano (Robles, 2015).

Nomenclatura de las enzimas de restricción

Por acuerdo internacional, la nomenclatura de las enzimas de restricción se asigna según su origen bacteriano y se define basándose en las siguientes reglas:

1. Tres letras en cursiva que corresponden al nombre científico de la bacteria de donde fue extraída (p. ej., *Escherichia coli* (*Eco*); *Haemophilus influenzae* (*Hin*), etc.). La primera letra, en mayúscula, corresponde al género; las otras dos, a la especie.
2. La cepa o estirpe, si la hubiese (p. ej., *EcoR*, aislada de la cepa “RY13” de *E. coli*).
3. Los números romanos se utilizan para distinguir si hay más de una endonucleasa aislada de esa misma especie (p. ej., *EcoRI*, *EcoRV*) (Zavala, 2005).

Clasificación de enzimas de restricción

Existen, en general, 3 sistemas de enzimas de restricción:

- ❖ Tipo I: reconocen una secuencia específica de nucleótidos y hacen un corte a una distancia aproximada de 1000 pb del sitio de corte; además tienen la función de metilar su propio genoma. Estas enzimas necesitan adenosin trifosfato (ATP) para moverse a lo largo de la molécula de ADN desde el lugar de reconocimiento hasta el sitio de corte (Salazar, 2013).
- ❖ Tipo II: Son enzimas que reconocen secuencias específicas y hacen el corte de la doble cadena de ADN en el mismo sitio de reconocimiento. Estas enzimas sólo tienen actividad de restricción no de metilación y son las utilizadas en ingeniería genética, ya que cortan el ADN en secuencias específicas reconocidas. Requieren Mg^{2+} como cofactor y no necesitan de ATP. Las secuencias de reconocimiento de estas enzimas son palíndromas,

es decir, son secuencias que se leen igual en las dos cadenas de ADN (ver Figura 3) (Salazar 2013).

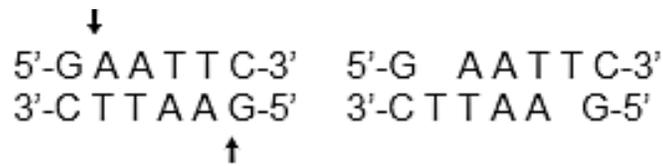


Figura 4. Ejemplo del corte de la enzima *EcoRI* en una secuencia palíndromo (Zavala, 2005).

- ❖ Tipo III: Estas enzimas reconocen una secuencia específica y cortan el ADN de doble cadena fuera de la secuencia diana (aproximadamente de 25 a 27 pares de bases corriente abajo del sitio de reconocimiento). Tienen, al igual de las de tipo I, actividad de metilasa y requieren de ATP para desplazarse a lo largo de la molécula de ADN (Salazar, 2013).

Tipos de corte producidos por las enzimas de restricción

Los cortes que realizan las enzimas de restricción sobre la cadena de ADN pueden generar dos estructuras o formas: cohesivas o romas. Los cortes cohesivos, también llamados pegajosos, se generan porque la enzima corta en cada cadena de ADN entre nucleótidos localizados en posiciones diferentes respecto al eje de simetría de la secuencia de diana. Estos cortes generan extremos monocatenarios en un segmento de 3 a 5 bases de longitud, por lo que en esta fracción la falta de cadena complementaria facilita su interacción con otro fragmento en monocadena con secuencia complementaria (ver Figura 5) (Robles 2015).

Los extremos romos se generan porque la enzima corta en ambas cadenas de ADN sobre un mismo eje, por lo que dichos extremos son de doble cadena, y la unión entre fragmentos de ADN con extremos romos es más inespecífica, ya que no depende de la complementariedad de regiones monocadena. Los fragmentos de ADN obtenidos de este modo pueden unirse por otras enzimas llamadas ligasas (ver Figura 6) (Robles 2015).

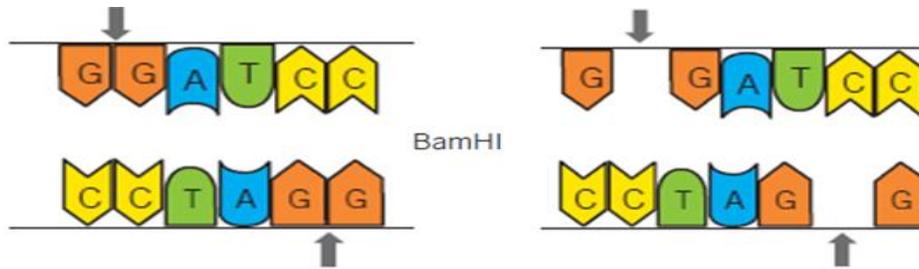


Figura 5. Corte cohesivo hecho por la enzima *BamHI* en la cual se puede apreciar cómo es escindida la secuencia específica, generando extremos complementarios lo que facilita su posterior unión con un gasto de energía mínimo (Salazar, 2013).

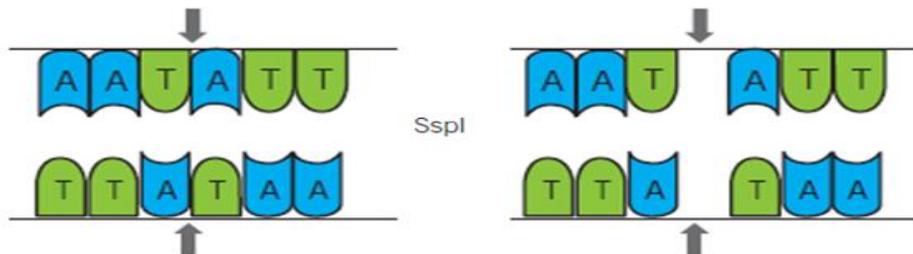


Figura 6. Cortes romos hecho por la enzima *SspI* en una secuencia específica generando dos extremos no complementarios y gastando energía para lograr la unión con esta u otra cadena de ADN (Salazar, 2013)

Se denomina isoesquizómeros a las enzimas de restricción obtenidas de diferente especie bacteriana pero que reconocen la misma secuencia diana de ADN y cortan entre diferentes nucleótidos de dicha secuencia (por ejemplo, *Asp718* y *KpnI*). Ambas reconocen la secuencia 5'GGTAC3' pero *Asp718* corta el enlace entre Guanina y Guanina mientras *KpnI* corta entre los nucleótidos Adenina y Citosina (ver Figura 7) (Robles 2015).

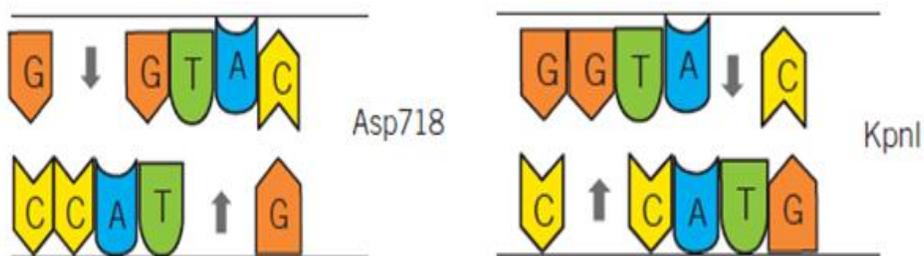


Figura 7. Isoesquizómeros generados por las enzimas *Asp 718* y *KpnI* en donde se muestra la misma secuencia, pero con cortes en distintos nucleótidos generando extremos cohesivos distintos (Salazar, 2013).

Factores que afectan la actividad de las enzimas de restricción

Entre los factores que más afectan la actividad de las enzimas de restricción se encuentran:

- La pureza biológica del ADN. Contaminación de la muestra con otros ADN, lo que impide el buen funcionamiento de las enzimas.
- Los contaminantes como detergentes y estabilizadores como el dodecil sulfato de sodio (SDS) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) respectivamente, ya que las concentraciones elevadas de sales y detergentes inhiben la actividad enzimática.
- Modificaciones en el pH y temperatura de incubación. Variaciones leves en estos parámetros inhiben enormemente la actividad de las enzimas.
- El grado de metilación del ADN, ya que algunas enzimas son inhibidas por metilación en ciertas secuencias (Zavala 2005).

Análisis de Clusters

Una de las actividades más primitivas, comunes y básicas del hombre consiste en clasificar objetos en categorías. Clasificación o identificación es el proceso o acto de asignar un nuevo objeto u observación en su lugar correspondiente dentro de un conjunto de categorías establecido. Los atributos esenciales de cada categoría son conocidos, aunque haya algunas incertidumbres a la hora de asignar alguna observación dada. Las técnicas numéricas para obtener clasificaciones se originaron en las ciencias naturales como la Biología y la Zoología, en un esfuerzo por librar a la Taxonomía de su subjetivismo tradicional y proporcionar clasificaciones (Wayne 2006).

Una vez revelados los geles y obtenidas las bandas de ADN se realiza el análisis para poder agruparlos de acuerdo con el nivel de similitud que estas cepas presenten.

El análisis clúster o también conocido como análisis de conglomerados, es el nombre genérico de una amplia variedad de procedimientos que pueden ser usados

para crear una clasificación. Más concretamente, un método clúster es un procedimiento estadístico multivalente que comienza con un conjunto de datos conteniendo información sobre una muestra de entidades e intenta reorganizarlas en grupos relativamente homogéneos a los que llamaremos clúster. Cada clúster se describe como la clase o clado a la que sus miembros pertenecen (Walpole 2009).

En Análisis Clúster poca o ninguna información es conocida sobre la estructura de las categorías, lo cual lo diferencia de los métodos multivalentes de asignación y discriminación. El objetivo es ordenar las observaciones en grupos tales que el grado de asociación natural es alto entre los miembros del mismo grupo y bajo entre miembros de grupos diferentes (Blair 2008).

Aunque poco o nada se conoce sobre la estructura de las categorías *a priori*, se tiene con frecuencia algunas nociones sobre características deseables e inaceptables a la hora de establecer un determinado esquema de clasificación. En términos operacionales, el analista es informado suficientemente sobre el problema, de tal forma que puede distinguir entre buenas y malas estructuras de categorías cuando se encuentra con ellas (Blair 2008).

A grandes rasgos se distinguen dos grandes categorías de métodos clúster: métodos jerárquicos y métodos no jerárquicos. Los llamados métodos jerárquicos tienen por objetivo agrupar clúster para formar uno nuevo o bien separar alguno ya existente para dar origen a otros dos, de tal forma que, si sucesivamente se va efectuando este proceso de aglomeración o división, se minimice alguna distancia o bien se maximice alguna medida de similitud (Walpole 2009).

Los métodos jerárquicos permiten la construcción de un árbol de clasificación, que recibe el nombre de dendrograma (ver figura 8), en el cual se puede seguir de forma gráfica el procedimiento de unión seguido, mostrando que grupos se van uniendo, en qué nivel concreto lo hacen, así como el valor de la medida de asociación entre los grupos cuando estos se agrupan. (Wayne 2006)

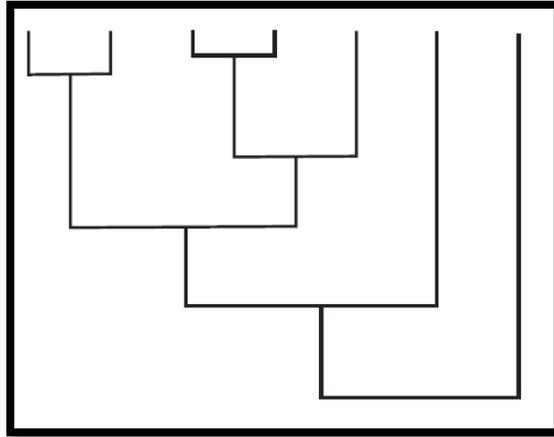


Figura 8. Representación gráfica de un dendograma, cuya función es visualizar con facilidad los clúster o grupos que comparten alguna medida de similitud de acuerdo con cierta característica, este se construye a partir del análisis de datos por medio de los métodos jerárquicos (Blair 2008).

Justificación

En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella*. Con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero.

La falta de un sistema de vigilancia con comunicación entre epidemiólogos y clínicos, así como de infraestructura necesaria, impide que países como el nuestro pueda identificar los principales genotipos de *Salmonella* en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que cada una de estas cepas genera en la salud de la población. Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*.

Los sistemas de tipificación molecular constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. Estos sistemas comprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. A la vez, deben ser técnicas capaces de diferenciar aislamientos no relacionados, con independencia de su pertenencia a la misma especie microbiológica o taxón.

Con anterioridad estos estudios se basaban en las características fenotípicas de los microorganismos (propiedades antigénicas, metabólicas o de resistencia antibiótica). Sin embargo, muchos de estos sistemas fenotípicos son limitados para establecer diferencias o similitudes concluyentes entre microorganismos.

De este modo, se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común.

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Esta información es muy útil, sobre todo cuando se producen brotes epidémicos causados por cepas multi resistentes, porque permite determinar el número de clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio y los vehículos de transmisión. Además, permite evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación de clones.

Lo anterior, resaltando el uso y practicidad de la PFGE como sistema de tipificación molecular comparado con otros, entendiéndolo en todo momento el fundamento de cada paso para alentar a quienes lean este trabajo a retomar esta técnica e impulsar el uso y actualización de los componentes para así poderlo implementar en contingencias sanitarias, brotes epidemiológicos o disputas internacionales.

Objetivo General

Analizar los perfiles cromosómicos de cepas de *Salmonella* entérica subsp entérica serovar Anatum aisladas previamente de muestras vegetales procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP) obtenidos mediante la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados, para identificar probables relaciones clonales entre dichas cepas.

Objetivos Particulares

- Describir la utilidad de la electroforesis en gel de campos pulsados en la identificación del genotipo bacteriano, entendiendo el fundamento de cada paso en la metodología correspondiente para comprobar la importancia de esta técnica como método de tipificación epidemiológica.
- Demostrar la importancia de la tipificación molecular de microorganismos patógenos, mediante el análisis epidemiológico de cepas endémicas de *Salmonella entérica subespecie entérica derivar* Anatum, para generar más conciencia sobre la importancia de la inocuidad en los alimentos.

Hipótesis

La caracterización genética con base a los perfiles de restricción mediante la técnica de PFGE de un grupo de cepas de *Salmonella entérica subespecie entérica derivar* Anatum aisladas en diferentes tipos de muestras vegetales provenientes de distintos estados del país, permitirá establecer si existe relación genética (clonal) entre ellas, con lo cual se evidenciaría la importancia de la tipificación molecular en este microorganismo patógeno para su posterior vigilancia epidemiológica en posteriores brotes.

Metodología

Aislamiento e identificación de cepas de *Salmonella*

Se trabajó con 70 cepas de *Salmonella* aisladas a lo largo de la existencia del Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos esto gracias a que en el Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes existen programas nacionales a los cuales los productores envían una muestra vegetal de sus productos agrícolas para su análisis, con el fin de comprobar y posteriormente garantizar que sus productos se encuentran inocuos, son aptos para el consumo humano y pueden incluso exportarse.

Cabe destacar que para el protocolo de PFGE se empleó la cepa de *Salmonella* Braenderup como marcador de peso molecular, debido al número óptimo y distribución de las bandas que se obtiene tras la restricción enzimática.

Las muestras fueron analizadas en primera instancia por biología molecular, esto por medio de PCR en tiempo real, cuando una muestra amplificó, lo caracterizaron bioquímicamente de acuerdo con el Bacteriological Analytical Manual (BAM) de la FDA con el fin de llegar hasta la especie de este y corroborar que coincida con el resultado emitido por el subárea de biología molecular.

Una vez caracterizado y plenamente identificado el microorganismo patógeno, se almacenó en el cepario.

Recuperación y corroboración de cepas

Una vez facilitadas las 70 cepas de *Salmonella* por el área del cepario, fueron recuperadas o sembradas por la técnica de dilución americana, en cuatro agares, tres de estos; agar Entérico Hektoen (EH), *Salmonella* y *Shigella* (SS) y Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), utilizados para confirmar bioquímica y fenotípicamente que se trataban de *Salmonella* las cepas con las que se están trabajando y el agar Soya Trypticaseína (TSA), fue utilizado únicamente para el enriquecimiento, con el fin de trabajar con colonias jóvenes y viables.

Protocolo de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados

Elaboración de Plugs

Una vez obtenido el crecimiento adecuado en las placas con agar TSA, se procedió a tomar con el asa bacteriológica una cantidad generosa de colonias, posteriormente se resuspenden en 2 mL de una solución amortiguadora (buffer) de suspensión celular y la concentración fue medida con ayuda de una celda de vidrio desinfectada en un espectrofotómetro, tratando de mantener un rango de absorbancia de entre 0.9 y 1 midiendo a una longitud de onda de 610 nm, estas condiciones se homologan para las diferentes cepas en todas la lecturas.

Es conveniente estandarizar el inóculo mediante espectrofotometría de acuerdo con lo anterior, ya que ésta será una medida indirecta de la concentración de ADN que se obtendrá durante el procedimiento.

Esto debido a que el haz de luz incide directamente sobre las células procariotas, en caso de sobrepasar el rango de absorbancia, se tendría que diluir en más solución amortiguadora (buffer) de suspensión celular, ya que concentraciones altas de bacterias nos daría una alta concentración de ADN lo que dificultaría la migración y tendremos como resultado bandas más grandes y por consecuencia se obtendría una baja resolución.

Por otra parte si se encuentra por debajo del rango, se trabajaría con menor cantidad de bacterias lo que genera una menor cantidad de ADN que a su vez, se vería reflejado nuevamente en las bandas obtenidas ya que se verían difusas y de igual manera, se obtendría una baja resolución entre las bandas, dificultando así el análisis.

Posteriormente, se transfirieron 400 μ L a un microtubo con tapa correctamente identificado con el número de cepa, este proceso se realizó por duplicado debido a que un microtubo se resguardó con el fin de mantener una copia de la suspensión por si en algún momento se requería repetir la técnica con ciertas cepas.

A cada tubo con los 400 μ L de la suspensión bacteriana se le añadieron 20 μ L de proteinasa K y posteriormente se añadieron 400 μ L de agarosa completamente fundida, se mezclaron con ayuda de la pipeta y se vertió el contenido en los moldes previamente alistados y rotulados con el número de cada cepa, en este paso se

llenaron 2 moldes hasta el tope, sin burbujas de por medio y sin que estos se junten por la parte superior con la cepa contigua, a la mezcla completamente solidificada de suspensión bacteriana, proteinasa K y agarosa, se le conoce como “plug”. (Ver figura 9)

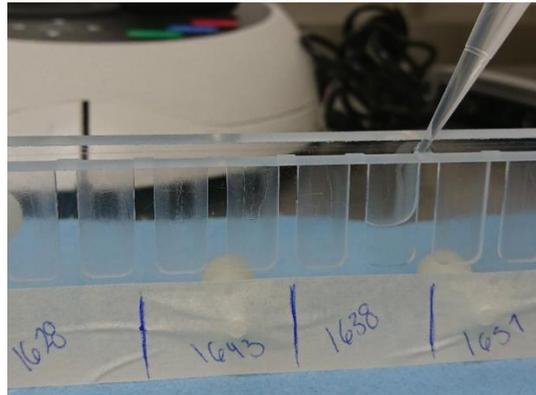


Figura 9. Base de acrílico que funge como molde para la elaboración de los plugs a partir de la mezcla de agarosa, proteinasa K y suspensión bacteriana, está debidamente identificada, se trabaja con dos plugs por cepa en caso de que exista algún inconveniente.

A partir de este momento, el resto del procesamiento se realizó utilizando el mini bloque completo (plug). El objetivo de este paso fue aislar el ADN cromosómico íntegro, sin fracturas y, a la vez, en las mejores condiciones de pureza para que las enzimas de restricción puedan cortar correctamente, evitando restricciones incompletas. La agarosa en la que se encuentran embebidas las células permitió fluir a las soluciones de lisis o restricción en las que vamos a sumergir el plug, y a la vez va a proteger las moléculas de ADN de la rotura mecánica y de la degradación nucleolítica.

Cabe mencionar que un Plug adecuado y correctamente hecho debe contar con cierta turbidez, sin presentar grietas ocasionadas a la mala elaboración de la agarosa o de la deshidratación del plug y que se conserve estable cuando se manipule (ver figura 10).



Figura 10. Mini bloque de agarosa (plug) ideal, compuesto de agarosa, proteinasa k y la suspensión bacteriana estandarizada (CDC 2016).

Lisis celular y lavado de plugs

Una vez solidificada la mezcla de agarosa con suspensión bacteriana y proteinasa k (plugs) se retiraron con ayuda de una espátula y se colocaron en un tubo cónico de 50 mL, utilizando un tubo por cepa, en donde posteriormente se añadieron 5 mL de una solución de lisis celular y 25 μ L de proteinasa K procurando que los plugs se encuentren sumergidos. Estos tubos perfectamente cerrados se introdujeron en una incubadora con agitación en donde se lisaron por 2 horas a una temperatura de $54^{\circ}\text{C} \pm 1$ con una agitación de entre 170 y 180 rpm.

La obtención de ADN cromosomal intacto y de muy alto peso molecular debe realizarse lisando células que están previamente inmovilizadas en plug de bajo punto de fusión. De esta forma se evitan las roturas de las hebras de ADN que se producirían en una solución líquida. Las células fueron entonces sometidas a un tratamiento para provocar su lisis y la liberación del ADN, que quedó embebido en el plug, cargándose éste directamente en el gel (Fierro, 2010)

El primer paso en la extracción es la homogeneización del tejido y la lisis celular en un amortiguador (buffer) de lisis, que contiene sales como el EDTA que secuestra cationes divalentes y, por tanto, inactiva las ADNasas, un detergente capaz de romper las membranas celular y nuclear liberando los ácidos nucleicos, y proteinasa K, que libera el ADN de las histonas con las que se encuentra empaquetado e hidroliza proteínas celulares (Salazar, 2013).

Cuando transcurre el tiempo de lisis celular, a los tubos cónicos se les retiró su tapa convencional y se les colocó un tapón cribado (Screened Plug Cap, SPC) la cual es una especie de filtro o coladera, que permite escurrir el contenido y dejar intactos

los plugs, esta tapa fue de mucha utilidad debido a que después de la lisis celular, se realizó un total de 6 lavados. (Ver figura 11)

Con ayuda de la tapa SCP, se retiró la solución de lisis celular y en su lugar se agregaron 15 mL de agua destilada estéril atemperada a $54^{\circ}\text{C} \pm 1$ y los tubos cónicos se regresaron a la incubadora con agitación donde se realizó un lavado por 15 minutos y una agitación de entre 170 y 180 rpm, este proceso se repitió una vez más con agua y 4 veces adicionales con amortiguador (buffer) Tris-EDTA (TE). Por último, se almacenaron con una cantidad de 10 a 15 mL de dicho amortiguador en refrigeración.

El objetivo de los lavados con TE es arrastrar fuera del bloque de agarosa restos celulares procedentes de la lisis, así como eliminar componentes que puedan inhibir la restricción posterior (proteinasas K o detergente), este amortiguador está compuesto por Tris el cual es un amortiguador de pH común y EDTA, una molécula que como ya hemos visto, quelata los cationes divalentes, su propósito es solubilizar el ADN mientras se protege de la degradación (UASLP, 2008).



Figura 11. Ejemplo del proceso de lisis celular y posteriormente los lavados, todo se lleva a cabo en tubos cónicos provistos de tapas con cribado (color verde) y tapas comunes (turquesa) respectivamente, estos se incuban en una placa con termo agitación (54°C a 175 rpm) y se mantienen estables con ayuda de una gradilla.

Restricción del ADN

Terminada la parte de la lisis celular y posteriormente los lavados, se continuó con la restricción enzimática del material genético previamente extraído, la selección de una enzima de restricción adecuada para PFGE, se basa en que ésta debe generar

pocos fragmentos de ADN y además sean de gran tamaño, debe tenerse en cuenta que ello depende de la longitud y de la secuencia del lugar de restricción del enzima. En general, las enzimas con un lugar de restricción rico en guanina y citosina, son adecuadas para tratar el ADN bacteriano de especies con genoma rico en adenina y timina y, a la inversa, enzimas que reconocen secuencias de adenina y timina, son adecuados para digerir ADN rico en Guanina y Citosina (Cardozo, 2015).

Para este caso al utilizar la enzima *XbaI* tenemos que su secuencia de reconocimiento es la siguiente:

5' TCTAGA

3' AGATCT

Teniendo en cuenta que es una enzima de restricción tipo II las secuencias de reconocimiento de estas enzimas son palindrómicas, es decir, son secuencias que se leen igual en las dos cadenas de ADN por lo que al realizar el corte se genera el siguiente producto de corte:

5'---T CTAGA---3'

3'---AGATC T---5'

Antes de continuar, tenemos que destacar que para este paso se trabajó únicamente con un fragmento del plug por lo que, en primera instancia con ayuda de una espátula, se sacó un plug por cepa y se colocó en un molde de acrílico, el cual ya tenía la medida del ancho del plug y el grosor requerido a utilizar (Ver figura 12 pág.45).

Posteriormente se realizó un corte limpio y en un solo movimiento con ayuda de una navaja nueva y estéril, ya que si se troza de otra manera, al momento de revelar el gel, se notarán bandas con muescas, bandas rotas, bandas barridas o bien, bandas sin la calidad requerida para su posterior análisis, (con burbujas, difusas, barridas, saturadas etc.) Como siguiente paso, se colocó el trozo del plug a utilizar en un micro tubo con tapa nuevo, estéril, correctamente rotulado y el resto del plug se devolvió al tubo cónico con el amortiguador TE y se almacenó en refrigeración, Se debe recordar que cada gel contiene 10 carriles de los cuales 3 son designados a la cepa estándar que es *Salmonella* Braenderup por lo que únicamente se

requieren de 7 cepas por gel, así que al final se deben tener 10 microtubos con tapa con la cepa control en la posición 1, 5 y 10 esto para evitar cualquier confusión.



Figura 12. Microtubo con tapa que contiene la parte del plug previamente “recortado” con las medidas requeridas para la restricción enzimática y su posterior corrida electroforética, dicho trozo debe permanecer intacto (sin burbujas, cortes irregulares, y de consistencia firme).

Para realizar la restricción enzimática, es necesario que los pequeños trozos de plug sean sensibilizados con una matriz similar a la de restricción es por eso que primero fueron sometidos a una pre-restricción, en donde se les añadieron 200 μL de master mix (ver tabla 1). El amortiguador de restricción provee el ambiente (iones y pH) que necesita la enzima para trabajar en condiciones óptimas, una vez que el amortiguador fue embebido en los poros de la agarosa, facilitó más adelante la restricción, por otra parte, el agua grado biología molecular solo provee el volumen adecuado para que el trozo de plug quede totalmente cubierto por la mezcla y así no se deshidrate provocando que pierda su estructura.

Tabla 1. Volumen de reactivos empleados en la pre-restricción enzimática para 10 plugs

Master mix de pre restricción enzimática	
Agua grado biología molecular	1800 μL
Buffer de restricción H	200 μL
Volumen total	2000 μL

Una vez agregados los 200 μL a cada microtubo, se aseguró de que los trozos de plug se encontraron embebidos en esta mezcla, se incubaron en un termo bloque a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 10 minutos.

Pasado el tiempo de incubación, con ayuda de una pipeta, se retiró la mezcla de pre-restricción, teniendo especial cuidado de no perforar los bloques de agarosa ya que como se mencionó, al momento de revelar el gel, estos desperfectos podrían afectar la corrida.

Una vez retirada la mezcla de pre-restricción, se añadieron 200 μl de la master mix de restricción y nuevamente se incubó en el termo bloque a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 2 horas (ver tabla 2). Para esta mezcla el agua grado biología molecular y el amortiguador de restricción cumplen la misma función que en la mezcla de pre-restricción, la albúmina de suero bovino (BSA) funge como “protector” ya que mantiene a las enzimas estables durante la reacción, minimiza su inactivación debido a inhibidores como proteínas y a su vez evita que se adhieran a los tubos de reacción, por último se añadió la enzima XbaI la cual es encargada de generar los cortes específicos y cohesivos en el ADN que, posteriormente, migrarán en el gel de agarosa de acuerdo con su peso molecular, tamaño y carga.

Tabla 2. *Volumen de reactivos empleados en la restricción enzimática para 10 plugs*

Master Mix de Restricción enzimática	
Agua grado biología molecular	1730 μL
Buffer de restricción H	200 μL
Albumina de Suero Bovino BSA	20 μL
Enzima XbaI	50 μL
Volumen Total	2000 μL

Preparación del gel de agarosa para la corrida electroforética

Mientras transcurrió el tiempo de restricción se pudo avanzar en la metodología y se pesó 1 g de SeaKem gold agarosa en un frasco limpio, estéril y con tapa, en el cual después se vertieron 100 mL de amortiguador TBE 0.5x para disolver la agarosa, una vez disuelta, se calentó con ayuda de un microondas hasta que fue fundida en su totalidad, se debe esperar a alcanzar una temperatura que permita mantener la agarosa disuelta y al mismo tiempo que no sea una temperatura alta

ya que esto deteriora la cámara electroforética con el tiempo, por otra parte se vierten 2.4 L del buffer TBE 0.5X en la cámara de electroforesis, enseguida se encendió la bomba y el refrigerante, llevando el buffer a un temperatura de 14°C con una recirculación constante.

La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN, esta concentración de agarosa dependerá siempre del tamaño del ácido nucleico que se desea analizar. Esto es importante, debido a que permitirá una mejor resolución de las muestras si el porcentaje de concentración es el adecuado. Usualmente los porcentajes de concentración van desde el 0.2% hasta un 6%, dependiendo del número de pares de bases (pb). A mayor concentración del gel, los poros serán más pequeños por lo que se podrán apreciar aquellos fragmentos con un número pb menor y viceversa (Fierro, 2010).

Por otra parte, se tomó una base y se alineó con ayuda de un nivel, además se limpió el molde para la elaboración del gel, así como el peine a utilizar con ayuda de etanol y toallas de papel para tareas delicadas, verificando de apretar bien los tornillos al tope y sin exagerar, cuando el tiempo de restricción pasó, se retiró con ayuda de una micropipeta, el resto de la mezcla de restricción (Ver figura 13).

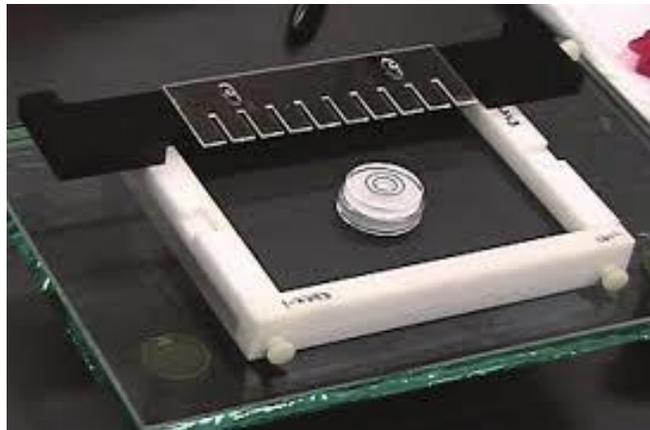


Figura 13. Alineación de la base y el molde para el gel de agarosa con ayuda de un nivel de burbuja para el posterior vaciado de la agarosa

Con ayuda de una espátula limpia, se retiraron los pequeños trozos de plug y se colocaron en la parte frontal de cada diente del peine, teniendo en cuenta que los

dientes 1, 5 y 10 fueron ocupados por la cepa de *Salmonella* Breaenderup para fungir como marcador de peso molecular, cabe mencionar que no se utiliza un marcador de peso molecular convencional ya que los rangos que abarcan no son nada parecidos a los obtenidos durante la digestión enzimática, por otra parte, los tiempos de corrida son mucho más largos, así como el voltaje empleado es más intenso, lo que dejaría a dicho tipo de marcador obsoleto, sin embargo, se utiliza la cepa de *Salmonella* Breaenderup H 9812 debido a que se genera un número y distribución de bandas óptimo, además funge como control interno ya que toda la metodología utilizada en las muestras es usada también para este marcador y así se normaliza la variabilidad de migración que ocurre en el gel.

Una vez que se colocaron las diez cepas en la parte frontal de cada diente del peine, este se colocó en la posición que normalmente ocupa en la cámara electroforética y con ayuda nuevamente de la espátula, se ayudó a que los plugs toquen el fondo de la cámara, así como de colocarlos de una manera más centrada a cada diente del peine, después, con ayuda de una micropipeta se les añadió una gota de agarosa completamente fundida para que estos se fijen de manera correcta y no se muevan al añadir el resto de agarosa (Ver figura 14).

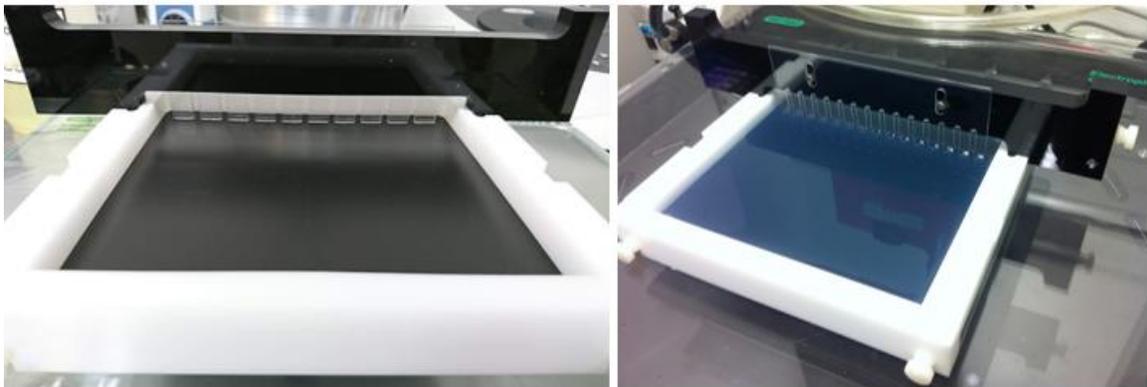


Figura 14. Elaboración de gel de agarosa para su posterior corrida electroforética, se observa la base correctamente montada (en una base estable y nivelada) se observa el peine con los 10 dientes en donde se colocan los trozos de plug previamente sometidos a la restricción enzimática, cabe mencionar que los dientes 1,5 y 10 corresponderán a la cepa control y los 2,3,4,6,7,8 y 9 a las cepas que se analizan.

Posteriormente cuando transcurrieron alrededor de 2 minutos, el resto de la agarosa fue vertida por una esquina inferior de la cámara para que de este modo no se muevan de manera brusca los trozos de plugs previamente fijados. Los primeros

segundos después de esta operación son cruciales ya que pueden llegar a formarse burbujas que interfieran en la correcta solidificación del gel por lo que se pueden retirar con ayuda de una punta de micropipeta o con una espátula.

Cuando el gel se encontró totalmente sólido, se le retiró el peine, en un solo movimiento y teniendo cuidado de no mover demasiado la base, posteriormente, se retiraron los tornillos que sujetan la base y el gel es extraído con mucha delicadeza, limpiando o retirando los excesos de agarosa que se presenten fuera de su forma natural, ya que estos pueden obstruir el flujo del TBE en la cámara electroforética, una vez que se tiene el listo el gel, fue colocado en el marco designado en la cámara electroforética, apagando previamente la bomba y el refrigerante por cuestiones de comodidad.

Condiciones de la electroforesis

Para llevar a cabo la correcta programación del equipo de electroforesis de campos pulsados, se utilizó el equipo CHEF Mapper de la marca Bio-Rad (ver tabla 3); presionando el botón de auto algoritmo, y una vez programadas las condiciones de electroforesis se iniciará presionando el botón de “Start run”.

Tabla 3. Condiciones óptimas de electroforesis específicas para *Salmonella*

Condiciones de electroforesis	
(Switch) Corriente inicial	2.16 segundos
(Switch) Corriente final	63.8 segundos
Tiempo de la corrida	18 a 19 horas
Volts	30 kb - bajo MW 700 kb - alto MW
Temperatura	14° C

Tinción del gel de PFGE y obtención de imagen

Al día siguiente, cuando la corrida electroforética ha finalizado, se apagó el equipo, incluyendo bomba y refrigerante, se extrajo el gel con ambas manos, se escurrió unos segundos para evitar un exceso de buffer de TBE 0.5X, se colocó en un

recipiente adecuado y se le añadió una solución de 200 mL de agua destilada y 20 µL de bromuro de etidio. El proceso de coloración de ADN se basa en la propiedad del bromuro de etidio para intercalarse entre las bases del ADN y posteriormente fluorescer frente a la exposición con rayos ultravioleta. Su sensibilidad es de aproximadamente 30 pg de ADN por banda, dependiendo del grosor de la matriz en el que se esté visualizando (Yabar, 2003).

Dicho recipiente se colocó sobre un agitador de bandeja y se dejó teñir por una hora. Cuando el tiempo de tinción ha transcurrido, la solución de bromuro de etidio se retiró y se dispuso en un recipiente adecuado para su posterior resguardo e inactivación, a continuación, se añadieron 200 mL de agua y se lava el gel con las mismas condiciones que se tiñó.

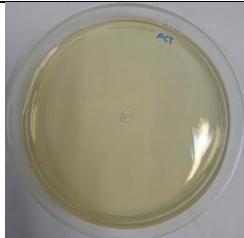
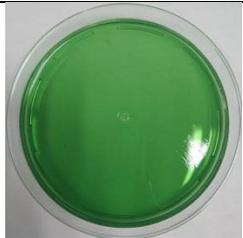
Con ayuda del fotodocumentador, se reveló el gel y se obtuvo la imagen de interés, por lo que como primer paso se abrió la charola y se limpió con etanol y toallas para tareas delicadas, posteriormente se colocó el gel en una posición central y se cerró la charola, el análisis bioinformático se llevó a cabo a través del software BioNumerics, este se programó de manera adecuada para obtener la imagen de interés, de acuerdo al tipo de tinción que se empleó.

Resultados

Para la realización de este estudio se caracterizaron fenotípica y genotípicamente cepas de *Salmonella entérica* serotipo Anatum aisladas de productos vegetales provenientes de distintos estados de la república esto en el análisis para la detección de organismos patógenos realizado en el LDDOP.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para las distintas etapas clave del proceso de este trabajo descrito previamente en el punto 11 de la metodología, como primer paso se comenzó con el sembrado y cultivo de las cepas resguardadas en el cepario, esto con la finalidad de “reactivar” y hacer viables las cepas trabajando con colonias jóvenes (Agar TSA) así como de confirmar fenotípicamente por medio de agares selectivos y diferenciales (XLD, Enterico Hektoen y *Salmonella-Shigella*) que efectivamente se trataban de cepas de *Salmonella*

Tabla 4. Caracterización fenotípica de las 65 cepas de *Salmonella entérica* serotipo Anatum en distintos medios selectivos y diferenciales, así como en uno de enriquecimiento.

	TSA	XLD	Entérico Hektoen	<i>Sallmonela-Shigella</i>
Medio sin inocular				
Medio inoculado				
Descripción de crecimiento	<p>Crecimiento de colonias traslucidas pequeñas este medio de cultivo permite el adecuado enriquecimiento de <i>Salmonella</i> debido a que su principal fuente de carbono es la peptona y no carbohidratos, por último, al no contener agentes inhibidores, selectivos o diferenciales, permite el uso de las colonias adecuadamente desarrolladas y sin interferencias para su posterior análisis.</p> <p>Todos presentaron colonias incoloras con centros de color negro características de crecimiento de la especie de <i>Salmonella</i> esto es debido a que los medios inhiben el crecimiento de los microorganismos Gram (+) al incluir Desoxicolato de sodio presente en del medio XLD y Sales biliares en los medios Entérico Hektoen y <i>Salmonella-Shigella</i>, por otra parte son incoloras debido a que <i>Salmonella</i> no fermenta ningún carbohidrato presente en estos medios por lo que su fuente de carbono es obtenida a través de las proteínas y aminoácidos azufrados, al descarbolixarlos y en presencia del Tiosulfato sódico, se obtiene H₂S que al reaccionar con el citrato férrico se obtiene como producto un precipitado negro insoluble el cual es el sulfato ferroso,</p>			

Una vez transcurrieron entre 18 y 24 hrs, las cepas se hicieron viables después de su resguardo en el cepario, se realizó el proceso de formación de Plugs (Agarosa+suspensión bacteriana+Proteinasa K) por duplicado para cada cepa, con una fracción de Plug para cada cepa se realizaron la pre-restricción y restricción enzimática con la enzima XbaI.

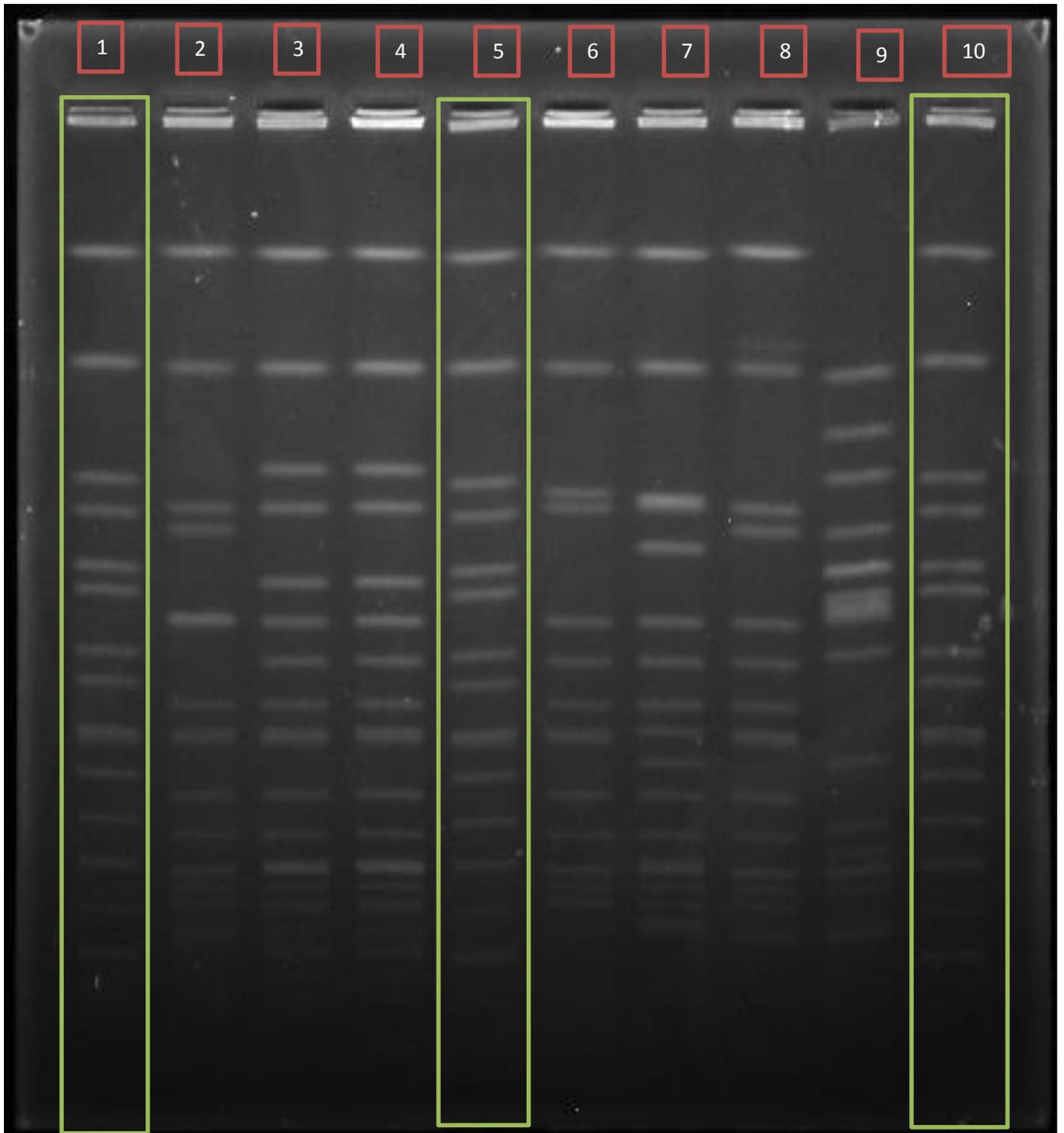
Posterior a la restricción enzimática, dichas fracciones de Plug fueron sometidas a electroforesis de campos pulsantes con las condiciones óptimas para esta especie en específico (ver Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones electroforéticas empleadas para *Salmonella enterica* serotipo *Anatum*

(Switch) corriente inicial	2.16 segundos
(Switch) corriente final	63.8 segundos
Tiempo	18 a 19 horas
Volts	Gradiente de 6 V/cm con un ángulo de 120°
Temperatura	14°C

Cuando el tiempo de electroforesis concluye, el gel se retira con cuidado de la cámara y se tiñe con Bromuro de etidio, lo cual ayudará al foto documentador a revelar las bandas generadas tras la restricción y separadas tras la electroforesis, dicho foto documentador se configura (ver metodología) y se captura la corrida de todo el gel teniendo para cada carril una cepa diferente a excepción de los carriles 1, 5 y 10 en los cuales se coloca la cepa que funge como cepa control confirmando que la metodología empleada fue realizada correctamente y al mismo tiempo funge como un “marcador de peso molecular” que nos da como referencia un numero de bandas específico (ver Figura 15).

Los resultados fueron analizados con el programa Fingerprinting II, que compara los patrones electroforéticos de los aislamientos y calcula el coeficiente de similitud de Dice (SD), para generar dendrogramas que asocian los patrones según sus relaciones genéticas por medio del método no ponderado de agrupamiento que utiliza promedios aritméticos (*Unweighted pair group method using arithmetic averages, UPGMA*).



□ Control interno/cepa control

Figura 15. Tinción y captura de imagen del gel de agarosa después de la corrida electroforética a las condiciones de la tabla 5, se observan las distintas bandas de ADN integro, generadas por la restricción enzimática, así como la migración que se obtuvo a partir del peso molecular y tamaño de los distintos cortes, carriles 1,5 y 10 corresponden a la cepa control (*Salmonella* Braenderup).

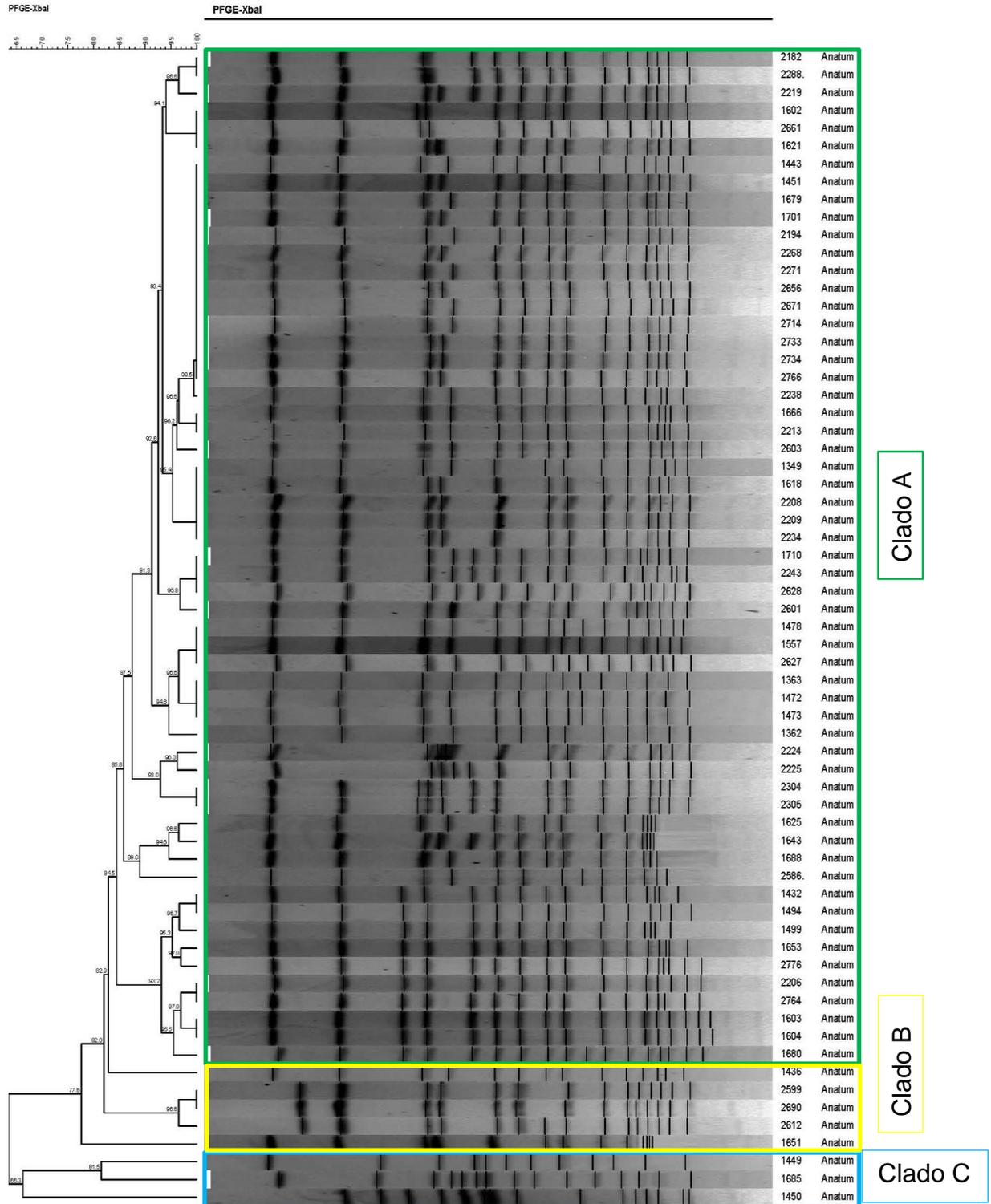


Figura 16. Perfiles cromosómicos de 65 cepas de *Salmonella enterica subespecie enterica derivar* Anatum obtenidos con la enzima *XbaI*. Se muestra el dendograma construido con el programa Fingerprinting II (Bio-Rad) utilizando algoritmos de coeficiente de similitud de DICE y el programa de agrupamiento UPGMA de 65 cepas aisladas de productos vegetales provenientes de distintos estados de la república se aprecia claramente la agrupación de los perfiles obtenidos de cada cepa en tres clados.

Análisis de Resultados

El primer paso en el análisis de los resultados es la normalización de los geles. Existen numerosos factores que influyen en el proceso electroforético (protocolo de trabajo, carga del gel, condiciones de electroforesis, instrumentación, etc.) que pueden dar lugar a que dos bandas del mismo tamaño tengan una posición en el gel ligeramente diferente. La normalización consiste en asignar a estas bandas el mismo peso (posición) a pesar de las diferencias generadas por el proceso analítico (Domínguez, 2015).

Una vez normalizados los geles, para el cálculo de la similitud entre un par de cepas pueden utilizarse diversos coeficientes. El utilizado en este estudio es el coeficiente de similitud de Dice que se basa en la posición de las bandas (como el coeficiente de Jaccard o el de Pearson). Cuando se ha definido la totalidad de bandas presentes, se determina su presencia o ausencia en cada una de las dos cepas y el coeficiente de similitud se calcula con la siguiente fórmula:

$$SD = \frac{2n_{AB}}{2n_{AB} + a + b}$$

n_{AB} = número de bandas presentes en las dos cepas

a = Número de bandas presentes en la cepa A pero no en la cepa B

b = número de bandas presentes en la cepa B pero no en la cepa A

Los patrones de bandas de PFGE, fueron clasificados de acuerdo con los criterios de Tenover; esta técnica se aplica para comparar la similitud genética de una serie de aislados, en general, cuando dos microorganismos difieran en más de tres bandas se le asignarán “genotipos” propios expresados mediante un número; si la diferencia estriba en tres o menos bandas, se considerarán “subtipos” de un precursor común (Firacative, 2006).

Para generar el dendograma, se utiliza el método de UPGMA, el cual calcula los pesos moleculares de las bandas de cada canal del gel a partir del marcador interno que es la cepa de *Salmonella* Braenderup, asimismo compara los patrones de bandas de las distintas cepas en función de estos pesos moleculares. Para la comparación de patrones analiza el grado de divergencia existente entre cada dos

patrones mediante el coeficiente de similitud de Dice, que dan lugar a una matriz de similitud que se representa gráficamente en un dendograma (Figura 13).

Una vez construido el dendograma con los patrones de restricción de las 65 cepas aisladas muestra que se obtuvieron tres agrupaciones o clados (A, B y C), en donde el clado A está compuesto por 57 cepas, el clado B por 5 cepas y el clado C está conformado únicamente por 3 cepas.

Las cepas del clado A comparten entre sí un perfil cromosómico de 14 a 17 bandas; con un porcentaje de similitud entre ellas de 84.5% a 96.6 % la diferencia está entre una a dos bandas en los perfiles cromosómicos de las cepas, que de acuerdo con los criterios de Tenover indican que son cepas genéticamente relacionadas.

Esto es debido a que un único cambio genético, en el más desfavorable de los casos (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción: creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), en este caso las cepas presentes en el clado A pueden considerarse genéticamente relacionadas (unas subtipos de las otras o todas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

Asimismo, las cepas del clado B, comparten un perfil cromosómico de 13 a 15 bandas entre sí; con un porcentaje de similitud entre ellas de 77.6% a 82.9% la diferencia nuevamente está entre una a dos bandas en dichos perfiles, lo que nos indica según Tenover es que en general, cuando dos o más microorganismos difieran en tres bandas o menos se consideran subtipos de un precursor común.

Esto es debido al cambio de secuencia de nucleótidos del cromosoma, resultando de un suceso genético único como una mutación puntual en la secuencia de nucleótidos que reconoce la enzima de restricción y, por lo tanto, se modifique el número de cortes en el cromosoma, o bien por inserciones de fragmentos de ADN o deleciones de base en la secuencia de ADN

Por último, se encuentra el clado más pequeño de todos, el cual es el clado C y consta de únicamente 3 cepas, entre ellas comparten un perfil cromosómico de 12 a 15 bandas entre sí; con un porcentaje de similitud de 66.3%.

Nuevamente la diferencia radica entre una hasta a tres bandas, lo que nos da indicio según Tenover se debe a un cambio genético debido a una mutación espontánea que afecta a un sitio de restricción, creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno existente.

Cabe resaltar que dentro de los clados A y B se encuentran cepas genéticamente idénticas o clones representadas en el dendograma con una línea vertical abarcando los carriles de cada cepa teniendo así clones de las cepas 2182-2288; 1602-1621; 1443-2766; 1666-2213; 1349-2234; 1710-2628; 1478-2627; 1363-1473; 2304-2305; 1432-1494; 2206-2764; 1603-1604; esto exclusivamente en el clado A, mientras que para el clado B solo las cepas 2599-2690 son idénticas genéticamente.

Realizando un análisis más general sobre el dendograma se puede observar que el mayor número de bandas en una cepa es de 17 y el mínimo es de 12 por lo que se obtienen aislados en su mayoría genéticamente relacionados según los criterios de Tenover, dando como resultado tres grandes ramas o clados que pertenecen a la tipificación molecular de *Salmonella enterica* de serotipo Anatum

De igual forma cabe mencionar que un factor crucial en la metodología de PFGE es el tiempo ya que los microorganismos se encuentran en constante adaptación, debido a la presión ejercida por el medio ambiente que trae como consecuencia la variabilidad genética.

En este estudio se tipificaron cepas aisladas en distintos años que van desde el 2015 al 2018 por lo que es normal que se incrementen o disminuyan números de bandas debido a mutaciones como deleciones o inserciones de nucleótidos que pueden afectar la secuencia de restricción aumentándolos o disminuyéndolos, sin embargo, se debe resaltar el hecho de que los resultados al final muestran que estas cepas están relacionadas genéticamente resultando en muchos casos clones y subtipos de un precursor común y que solo se generaron 3 genotipos representados por los clados anteriormente mencionados.

Por último, se obtienen también casos en donde la diferencia de patrones de bandas es mayor a tres pero menor a seis por lo que de acuerdo a los criterios de Tenover indican que entre estas cepas existe una posible relación (1449 clado C – 1604

clado A) haciendo énfasis al tiempo de aislamiento entre una cepa y otra, pero dando como resultado final una relación entre todas las cepas analizadas ya que estas cepas provienen de diversas regiones de México.

La transferencia horizontal de genes por medio de la transformación, transducción, conjugación, y la reducción de genes representan dos mecanismos que contribuyen a la evolución de los genomas en procariontes además juegan un papel importante en el desarrollo de nuevas especies, subespecies y patotipos, esto se puede visualizar en los resultados obtenidos en este estudio.

Conclusiones

Se logró obtener y analizar los perfiles cromosómicos de cepas de *Salmonella enterica* serotipo Anatum aisladas de distintas muestras vegetales, por medio de la técnica de tipificación molecular de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) con lo que se identificó la relación clonal entre éstas, demostrando que en su mayoría se encuentran relacionadas genéticamente de acuerdo con los criterios de Tenover ya que solo difieren de 2 a 3 patrones en las bandas obtenidas.

Por otra parte, al comparar las cepas más distantes con respecto al patrón y número de bandas, según Tenover éstas se encuentran posiblemente relacionadas entre ellas lo que nos sigue indicando que se encuentran ligadas todas estas cepas pero que existe una variabilidad genética a causa de distintos factores. Asimismo, se diferenciaron 3 clados o agrupaciones en las 65 cepas analizadas, conformado por el clado A con 57 cepas, el clado B con 5 cepas y por último el clado C con 3 cepas, todos ellos relacionados entre sí y con pequeñas diferencias como se mencionó, por lo que se concluye que en México el género de *Salmonella* Anatum está representado con 3 perfiles genómicos principalmente.

Esta técnica logró demostrar que, a pesar de tener identificada fenotípicamente a una bacteria, existen variaciones genéticas que dan pie al cambio en el genoma de estas, dándoles resistencia a antimicrobianos, expresión de toxinas o adaptación en su metabolismo y que al mismo tiempo pueden ser de utilidad para resolver controversias con otros países debido al posible inicio de un brote epidemiológico generado, en este caso, con alimentos hechos con productos agrícolas generados en México.

Por último, se destaca la importancia de la inocuidad alimentaria y el trabajo en equipo que deben realizar el gobierno y la población, ya que los aislamientos se dieron a partir de la producción primaria (directamente del campo) por lo que se hace énfasis en la correcta desinfección de los alimentos antes de ser ingeridos así como de la constante vigilancia epidemiológica.

Apéndice 1: Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo para el aislamiento y conservación de las cepas de *Salmonella* se realizaron de acuerdo con lo descrito por el proveedor

- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)

Tabla 6. Componentes del agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)

Composición:	
Xilosa	3,5 g.
L-Lisina	5 g.
Lactosa	7,5 g.
Sacarosa	7,5 g.
Cloruro sódico	5 g.
Extracto de levadura	3 g.
Rojo Fenol	0,08 g.
Desoxicolato de sodio	2,5 g.
Tiosulfato sódico	6,8 g.
Citrato férrico de amonio	0,8 g.
Agar	13,5 g
pH	7,4 ± 0,2

*Formula por litro de agua purificada

Fundamento: es un medio selectivo y de diferenciación. Contiene extracto de levadura como fuente de nutrientes y vitaminas. Utiliza el desoxicolato de sodio como agente selectivo y, por consiguiente, inhibe los microorganismos gram positivos. La xilosa se incorpora en el medio dado que la fermentan prácticamente todos los entéricos, excepto *Shigella*, y esta propiedad hace posible la diferenciación de dicha especie. La lisina se incluye para permitir la diferenciación del grupo *Salmonella* de los organismos no patógenos, dado que, sin lisina, *Salmonella* fermentaría rápidamente la xilosa y no se distinguiría de las especies no patógenas. Cuando la *Salmonella* agota el suministro de xilosa, la lisina es atacada por la enzima lisina descarboxilasa, lo que genera un cambio a un pH alcalino que imita la reacción de *Shigella*. Para evitar el cambio similar en los organismos coliformes positivos a la lisina, se añaden lactosa y sacarosa para producir ácido en exceso. Para aumentar la capacidad de diferenciación de la fórmula, se incluye un sistema indicador de H₂S, formado por tiosulfato sódico y citrato férrico amónico, para la visualización del ácido sulfhídrico producido, lo que origina la formación de colonias con centros de color negro. Los organismos no patógenos no productores de H₂S no

descarboxilan la lisina; por tanto, la reacción ácida producida por dichos organismos evita el oscurecimiento de las colonias, lo que sucede sólo con pH alcalino o neutro.

Proveedor: BD Bioxon®

- a) Suspender 55 g. del polvo en un litro de agua purificada; calentar hasta que hierva por un minuto para poder disolver completamente el polvo.
- b) Enfriar el medio a 45-50°C y vacíe en las placas hasta la marca establecida.
- c) Dejar solidificar por 10 minutos y almacenar a 4°C.

- Agar *Salmonella Shigella* (SS)

Tabla 7. Componentes del agar *Salmonella-Shigella*(SS)

Composición:	
Extracto de carne bovina	5 g.
Digerido pancreático de caseína	2,5 g.
Digerido péptico de tejido animal	2,5 g.
Lactosa	10 g.
Sales biliares	8,5 g.
Citrato sódico	8,5 g.
Tiosulfato sódico	8,5 g.
Citrato férrico	1 g.
Rojo neutro	0,025 g
Agar	13,5 g
Verde brillante	0,330 g
pH	7,2 ± 0,2

*Formula por litro de agua purificada

Fundamento: la diferenciación de los organismos entéricos se logra mediante la incorporación de lactosa en el medio. Los organismos que fermentan lactosa producen ácido que, en presencia del indicador rojo neutro, propicia la formación de colonias de color rojo. Los organismos no fermentadores de lactosa forman colonias incoloras. Este último grupo incluye la mayoría de los patógenos intestinales, incluidos *Salmonella* y *Shigella*. El tiosulfato sódico y el citrato férrico permiten la detección de producción de ácido sulfhídrico, como lo demuestran las colonias con centros de color negro. Este medio se utiliza para el aislamiento primario de *Salmonella* a partir de muestras fecales humanas. Dado que existen medios más eficaces para el aislamiento de *Shigella*, no debe utilizarse para el aislamiento de este organismo.

Proveedor: BD Bioxon®

- a) Suspender 60 g. del polvo en un litro de agua purificada; calentar hasta que hierva por un minuto para poder disolver completamente el polvo.
- b) Enfriar el medio a 45-50°C y vacíe en las placas hasta la marca establecida.
- c) Dejar solidificar por 10 minutos y almacenar a 4°C.

- Agar Entérico Hektoen (EH)

Tabla 8. Componentes del agar Enterico Hektoen (EH)

Composición:	
Digerido péptico de tejido animal	12 g.
Extracto de levadura	3 g.
Sales biliares	9 g.
Lactosa	12 g.
Sacarosa	12 g.
Salicina	2 g.
Cloruro sódico	5 g.
Tiosulfato sódico	5 g.
Citrato férrico de amonio	1.5 g
Azul de bromotimol	0,065 g.
Fucsina acida	0,1 g
Agar	14 g.
pH	7,6 ± 0,2

*Formula por litro de agua purificada

Fundamento: Las sales biliares hacen que el medio sea selectivo, inhibiendo los microorganismos grampositivos y reduciendo el crecimiento de algunos microorganismos gram-negativos diferentes de *Salmonella* y *Shigella*. Se incluyen lactosa, sacarosa y salicina para una óptima diferenciación según el color de las colonias y del medio adyacente a éstas. La *Salmonella* y la *Shigella* no fermentan estos compuestos de carbono y, por tanto, no ocasionan un cambio de color en el sistema indicador del pH, en tanto que los microorganismos como la *E. coli*, por ejemplo, que fermentan uno o más de tales compuestos hasta convertirlos en ácidos, causan un cambio de color a amarillo o anaranjado. El citrato férrico de amonio y el tiosulfato sódico del medio permiten detectar la producción de sulfuro de hidrógeno por la *Salmonella*. El sistema indicador del pH consta de fucsina ácida y azul de bromotimol.

Proveedor: BD Bioxon®

- a) Suspender 60 g. del polvo en un litro de agua purificada; calentar hasta que hierva por un minuto para poder disolver completamente el polvo.
- b) Enfriar el medio a 45-50°C y vacíe en las placas hasta la marca establecida.
- c) Dejar solidificar por 10 minutos y almacenar a 4°C.

- Agar Soya Trypticaseína (TSA)

Tabla 9. Componentes del agar Soya Trypticaseína

Composición:	
Digerido pancreático de caseína	15 g.
Digerido papaico de soja	5 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agar	15 g.
pH	7,3 ± 0,2

*Formula por litro de agua purificada

Fundamento: la combinación de caseína y peptonas de soja hace al medio nutritivo, al suministrar nitrógeno orgánico, en especial aminoácidos y péptidos de cadena más larga. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico.

Proveedor: BD Bioxon®

- a) Suspender 60 g. del polvo en un litro de agua purificada; calentar hasta que se disuelva completamente el polvo.
- b) Esterilizar en autoclave a 121°C a 15 lb de presión por 15 minutos
- c) Enfriar el medio a 45-50°C y vacíe en las placas hasta la marca establecida.
- d) Dejar solidificar por 10 minutos y almacenar a 4°C.

Apéndice 2: Preparación de soluciones para PFGE.

Las soluciones fueron preparadas por lo descrito en el manual de *PulseNet*, para la técnica de PFGE.

Solución Sarkosyl al 10% (p/v)

- Tomar un matraz graduado limpio y estéril
- Pesar 10 g de Sarkosyl
- Disolver en 90 mL de agua destilada con un ligero calentamiento de 50 a 60°C.

Proteinasa K (20 mg/mL) H₂O

- Considerar los mg de proteinasa K que trae el frasco para que al agregar el agua de grado biología molecular se obtenga una concentración final de 20 mg/mL.
- El cálculo de los mL de agua de grado biología molecular para disolver los mg de proteinasa K se calcula de la siguiente manera:

$$ml\ de\ Agua = \frac{mg\ de\ Proteinasa\ K\ (proveedor)}{20\ \frac{mg}{mL}}$$

- En el frasco de proteinasa K de la marca ROCHE, vienen 250 mg por lo cual se realiza el cálculo con la fórmula de arriba, por lo cual se le añaden:

$$\begin{aligned} ml\ de\ Agua &= \frac{250\ mg\ de\ Proteinasa\ K\ ROCHE}{20\ \frac{mg}{mL}} \\ &= 12.5\ mL\ de\ agua\ grado\ biologia\ molecular \end{aligned}$$

Buffer de suspensión celular (100 mL)

- Tomar una probeta graduada limpia y estéril
- 10 mL de Tris 1M, pH 8.0
- 20 mL de EDTA 0.5M, pH 8.0
- Llevar a 100 mL con agua destilada estéril.

Buffer TE (1000 mL)

- Tomar un matraz graduado limpio y estéril
- 10 mL de Tris 1M, pH 8.0
- 2 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0
- Llevar a 1000 mL con agua destilada estéril

El buffer TE se utiliza para hacer los plugs de agarosa y para lavar los plugs lisados.

Buffer de Lisis Celular

- Tomar un matraz graduado limpio y estéril
- 25 mL de Tris 1 M, pH 8.0
- 50 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0
- 50 mL de Sarcosyl (N-lauroilsarcosina, sal de sodio) al 10%
- Llevar a 500 mL de agua grado biología molecular

Agarosa para plugs

- Pesar 0.5 g de Agarosa (SeaKem Gold "SKG" o Certified Megabase Agarose) y colocar en un matraz de 250 mL.
- Añadir 50 mL de buffer TE y mezclar suavemente
- Introducir el matraz en horno de microondas por 30 segundos, repetir en intervalos de 10 a 15 segundos hasta disolver por completo.
- Ya preparado, mantener a 57°C hasta que sea utilizado.

Agarosa para gel de electroforesis al 1%

- Tomar un matraz graduado, limpio y esteril
- Agregar 1.5 g de agarosa (1% Sea Kem Gold "SKG" o *pulsed field certified agarose*) en 150 mL de buffer TBE 0.5x (para un gel de 15 pozos), o 1g de agarosa en 100 ml de TBE 0.5x para un gel de 10 pozos
- Fundir la agarosa en microondas hasta su completa disolución

Solución de bromuro de etidio (1µg/mL)

- Tomar una probeta graduada limpia
- Homogeneizar 10 µL de Stock Bromuro de Etidio (10 mg/mL) en 100 mL de agua destilada

Solución del buffer Tris Borato EDTA (TBE) al 0,5X

- Se preparan 2,5L de buffer TBE al 0,5X para el llenado de la cámara y la elaboración del gel.
- El buffer es una solución comercial que se compra a una concentración alta; por lo cual se debe realizar una dilución de este para tener la concentración deseada; de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$ml \text{ de agua esteril} = \frac{(0,5 X)(2500 mL)}{\text{Concentración de buffer TBE}}$$

- En la siguiente tabla se enlistan las formas de dilución para llegar al 0.5X partiendo de las principales concentraciones de venta comercial.

Tabla 10. Volumen de TBE a agregar de acuerdo a su presentación comercial para llegar a la concentración final de 0.5X

Reactivo	TBE 10X	TBE 5X
TBE	125 ml	250 mL
Agua estéril	2375 ml	2250 mL
Volumen total	2500 ml	2500 mL

Apéndice 3: Técnica de PFGE por el CHEF Mapper de Bio Rad

Este procedimiento describe los pasos a seguir para realizar la tipificación molecular de microorganismos como *E. coli* O157:H7, *E. coli* NO-O157 (STEC), *Shigella* spp. y *Salmonella* spp., con la finalidad de garantizar la comparación de resultados con la red de PulseNet.

a) Siembra de patógeno.

Sembrar en placa la cepa a tipificar en medio sólido TSA (Agar Soya Tripticasa), posteriormente incubar de 18 a 24 horas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

b) Elaboración de Plugs

b.1 Suspensión bacteriana

- Etiquetar y colocar 2mL de buffer de suspensión celular en tubos estériles de 5 mL
- Tomar una parte del crecimiento bacteriano con un asa estéril de la placa de TSA sembrada el día anterior y suspender en el tubo con buffer de suspensión celular.
- Transferir la suspensión celular a una celda de cuarzo (limpia y desinfectada) y colocar en el espectrofotómetro.
- Ajustar la suspensión a una absorbancia de 1.00 (rango de 0.9-1.0) a una longitud de onda de 610 nm en el espectrofotómetro, o en su caso una densidad óptica entre 3.5 a 3.65, en el Densicheck Biomerieux
- Repetir el primer y/o segundo paso hasta lograr la absorbancia o densidad óptica indicada.

b.2 Elaboración de los plugs

- Encender el Termo baño y ajustar a una temperatura de $54-55^{\circ}\text{C}$.
- Transferir 400 μL de la suspensión bacteriana del paso anterior, en microtubos estériles y etiquetados de 1.5 a 2 mL.
- Añadir 20 μL de proteinasa K a cada tubo y homogeneizar suavemente por pipeteo.
- Colocar y etiquetar los moldes para plugs en una superficie estable, para su llenado.

- Añadir 400 μ L de la agarosa para plugs en el micro tubo con la suspensión celular y la proteinasa K, homogeneizar de 2 a 3 veces por pipeteo.
- Tomar 400 μ L de la mezcla anterior, llenar con cuidado y completamente cuatro pozos de los moldes desechables para plugs, o dos pozos en los moldes reusables; evitar la formación de burbujas. Es importante no regresar volumen de la suspensión en el tubo, por lo que en caso de que sobre volumen de la mezcla en la punta, esta se desechara totalmente.
- Dejar solidificar los plugs de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente o 5 min a 4°C

b.3 Lisis celular en plugs de agarosa

- Etiquetar tubos conicos falcón de 50 mL y agregar 5 mL de Buffer de lisis celular.
- Adicionar 25 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) en cada tubo del paso anterior
- Eliminar el exceso de agarosa y retirar los plugs de los moldes con ayuda de una espátula. Colocar los plugs de cada cepa en un tubo cónico falcón; recordar que se debe colocar como máximo 4 plugs por cada tubo falcón.
- Asegurar que los plugs se encuentren inmersos en el buffer de lisis y no pegados en la pared del tubo
- Colocar los tubos en la incubadora con agitación (Shaker) a $54\pm 1^\circ\text{C}$ a 150-175 rpm por dos horas.

El exceso de agarosa, los moldes, espátula, navajas y el material que entro en contacto con los plugs están contaminados, por lo que es necesario colocarlos en una solución de etanol al 70%, 1% antibenzil, Lysol, Amphyll u otro desinfectante, dejar remojando durante 30 a 60 minutos antes de lavarlos.

b.4 Lavado de plugs

- Calentar 500 mL de aguas destilada estéril a $50\pm 2^\circ\text{C}$
- Transcurrido el tiempo de incubación de la lisis celular, retirar los tubos de la incubadora con agitación (Shaker)
- Colocar a cada tubo cónico una tapa Screened (tapa con malla) para tubos Falcón de 50 mL
- Verter y eliminar el buffer de lisis con cuidado en un contenedor de desecho adecuado y escurrir los tubos cónicos invertidos en un papel absorbente

- Colocar de 10-15 mL de agua destilada estéril en cada tubo, e incubar a $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación de 150-170 rpm por 15 minutos, para un primer lavado
- Verter y eliminar el agua destilada estéril con cuidado en un contenedor de desecho adecuado y escurrir los tubos cónicos invertidos en un papel absorbente.
- Repetir los dos pasos anteriores para realizar un segundo lavado con agua destilada estéril.
- Calentar aproximadamente 1L de buffer de TE 1X a $50\pm 2^{\circ}\text{C}$, cantidad necesaria para realizar cuatro lavados (60 mL por tubo)
- Después del segundo lavado con agua destilada estéril, realizar un primer lavado con TE 1X, agregando de 10-15 mL de buffer TE 1X en cada tubo falcón de 50 mL, e incubar en termobañó o incubadora a $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos a una velocidad de 150-170 rpm
- Verter y eliminar buffer Te 1X con cuidado en un contenedor de desecho adecuado y escurrir los tubos cónicos invertidos en un papel absorbente
- Repetir los dos pasos anteriores para realizar tres lavados adicionales con buffer TE 1X.
- Desechar el buffer del último lavado y añadir 5 mL de buffer TE y se almacenarán de 4 a 8°C hasta su uso

c) Restricción de ADN en bloques de agarosa

c.1 Corte de los plugs

- Etiquetar de 10 a 15 microtubos de entre 1.5 a 2 mL dependiendo del número de corte de plugs que se va a realizar
- Sobre un soporte de acrílico, colocar el plug y realizar un corte aproximadamente de 2 a 3 mm con la ayuda de una navaja estéril
- Con ayuda de la espátula colocar el corte del plug en el microtubo etiquetado correspondiente a cada cepa
- Realizar 3 cortes (para gel de 10 pozos) o 4 cortes (para gel de 15 pozos) de la cepa control *Salmonella* Braenderup H9812
- El resto del plug se guarda en el tubo original que contienen 5 mL del buffer TE y se almacenan de 4 a 8°C

c.2 Pre-restricción

- Preparar un mix (en un bloque frío) de acuerdo al número de cortes de plugs como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 11. Volumen de reactivos empleados en la pre-restricción enzimática de acuerdo a la metodología de Pulsenet

Reactivo	μL/corte plug	μL/10 cortes de plug	μL/15 cortes de plug
Agua grado biología molecular estéril	180 μL	1800 μL	2700 μL
Buffer de restricción 10X	20μL	200 μL	300 μL
Volumen total	200μL	2000μL	3000 μL

- Añadir 200 μL del mix de pre-restricción en los tubos de micro centrifuga que contienen los plugs cortados
- Asegúrese que el corte de plug se encuentre inmerso en el buffer
- Incubar la muestra y control en un termobloque a 37±1°C durante 5-10 minutos, o a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos
- Después de la incubación, se elimina el buffer de pre-restricción usando una micropipeta con puntas de 200 μL, teniendo cuidado de no dañar el plug con la punta

c.3 Restricción de plugs

- Preparar un mix (en un bloque frío) para llevar a cabo la restricción, utilizando los siguientes volúmenes:

Tabla 12. Volumen de reactivos empleados en la pre-restricción enzimática de acuerdo a la metodología de PulseNet

Reactivo	μL/corte plug	μL/10 cortes plug	μL/15 cortes plug
Agua grado biología molecular estéril	173 μL	1730 μL	2595 μL
Buffer de Restricción H (10X)	20 μL	200 μL	300 μL
BSA (10 mg/μL)	2 μL	20 μL	30 μL
Enzima XbaI (10 U/LI)	5 μL	50 μL	75 μL
Volumen total	200 μL	2000 μL	3000 μL

Los cálculos descritos se basan en el uso de una enzima a una concentración de 10 U/ μ L. Si la enzima utilizada es de una concentración diferente, se debe realizar los ajustes necesarios para el volumen de la enzima y el agua para conseguir una concentración final de 50 U/muestra.

- Añadir 200 μ L del mix de restricción a cada tubo
- Cerrar el tubo y mezclar suavemente golpeando ligeramente el microtubo, asegurándose que los cortes del plug estén inmersos en la solución
- Incubar las muestras y controles a $37\pm 1^\circ\text{C}$ en termobloque durante 2 horas
- Terminada la reacción de restricción eliminar con la micropipeta la mezcla de reacción y reemplazar con 200 μ L de TBE 0.5X durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Los plugs no utilizados se pueden almacenar de 4 a 8 $^\circ\text{C}$

d) Electroforesis

d.1 Colocación de los plugs en cámara

- Preparar la agarosa al 1% para hacer el gel, aproximadamente media hora antes de que finalice la restricción y dejar en termobañó a $55\pm 1^\circ\text{C}$ para evitar su polimerización
- Realizar un lavado a la cámara del gel con agua destilada y limpiar al final con etanol al 70% antes de utilizar
- Nivelar la cámara de gel con el nivel de burbuja circular
- Retirar los plugs del buffer TBE 0.5X contenidos en los microtubos y con ayuda de la espátula colocarlos en los dientes del peine, retirando el exceso de agua con toallas Kimwipes
- Cargar *Salmonella braenderup* H9812 en los carriles 1,5,10 (en un gel de 10 pozos), o en los carriles 1,5, 10, 15 (en un gel de 15 pozos)
- Cargar las muestras en los pocillos restantes
- Asegurarse que los plugs estén en contacto con la superficie negra de la cámara del gel
- Adicionar la agarosa al 1% (atemperada a $55\pm 1^\circ\text{C}$), a la base del gel, procurando eliminar las burbujas, dejar solidificar durante 30 minutos a temperatura ambiente

- Una vez solidificada la agarosa, retirar el peine, destornillar y retirar las paredes laterales del molde del gel, eliminar el exceso de agarosa de los lados y de la parte inferior de la plataforma con un pañuelo o Kimwipe.

d.2 Preparación de la cámara de PFGE

- Realizar un lavado de la cámara de electroforesis con agua destilada y limpiar al final con etanol al 70%
- Nivelar la cámara de electroforesis con nivel de burbuja circular
- Agregar de 2 a 2.5 litros de buffer TBE 0.5X a la cámara
- Encender la fuente de poder, seguido de la bomba y por último el refrigerante.
- Fijar la velocidad de la bomba en 70 para un flujo aproximado de 1litro/minuto.
- Programar el refrigerante a 14°C
- Dejar recircular el buffer TBE 0.5X de 10 a 15 minutos, o hasta alcanzar la temperatura de 14°C
- Evitar burbujas del buffer TBE 0.5X en las distintas mangueras
- Poner el marco negro del gel en la cámara de electroforesis
- Mantener el gel solidificado en la plataforma y colocarlo cuidadosamente dentro del marco negro del gel de la cámara de electroforesis.
- Cerrar la tapa de la cámara

d.3 Programación de la cámara de electroforesis

La programación de las condiciones a utilizar depende del patógeno en estudio, por lo que en este caso se utilizarán las siguientes:

- Seleccionar las siguientes condiciones en CHEFMapper para *Salmonella* con Xbal o AvrII (BLNI)
Auto algoritmo
30 kb-bajo MW
700 kb-alto MW
- Seleccionar los valores predeterminados, pulsando “enter”
Valor de Switch time inicial: 2.16 segundos
Valor de Switch time final: 63.8 segundos

Gradiente de 6 V/cm con un ángulo de 120°

Tiempo de la corrida de 18 a 19 horas

e) Tinción del gel

- Teñir el gel de agarosa con solución de bromuro de etidio durante un periodo de 20 a 30 minutos en agitación constante
- Enjuagar con ± 500 mL de agua destilada por 15-20 minutos en agitación
- Eliminar el agua y agregar nuevamente ± 500 mL de agua destilada por 15-20 minutos en agitación (repetir este paso una vez más)
- Observar el gel en el foto documentador Bio Rad, de acuerdo a lo siguiente:
 - Encender el foto documentador de Bio Rad, así mismo encender la computadora a la cual está conectado
 - Colocar el gel teñido en la parte del tras iluminador del equipo y abrir la puerta del equipo
 - Una vez encendido el equipo de cómputo abrir el icono del escritorio con nombre "Image Lab"
 - Cuando es abierto el programa, seleccionar en la barra de herramientas la opción que dice "New" dentro de la sección de Protocolos "Protocol"
 - Se abrirá una nueva ventana, la cual lleva por nombre "Protocol-ChemiDoc", en esta ventana se seleccionara la aplicación para la cual funcionará el foto documentador. Para el caso de Campos pulsados se selecciona la opción de ácidos nucleicos "*Nucleid acid gels*" y teñido con Bromuro de etidio "*Ethidium Bromide*"
 - Ya seleccionados estos campos, se encuentra un botón amarillo el cual dice, posicionar gel "*Position gel*"
 - Ajustar el gel con los botones de zoom, ya sea acercar o alejar el gel para que se observe el principio del gel(los pozos que deja el peine) y el fin del cuadro del gel
 - Una vez que el gel fue posicionado correctamente se cierra la puerta del equipo para empezar la toma de fotografía
 - Cerrada la puerta en el software se oprime el botón que dice correr protocolo "*Run protocol*", y el equipo empezará a tomar la foto del gel

por lo cual no se deberá abrir la puerta del equipo hasta que no aparezca la imagen del gel en la pantalla

- Cuando se muestra la imagen del gel en el monitor, se guarda la imagen oprimiendo el disquet en la barra del menú y se coloca el nombre de la corrida
- Por último se oprime en el menú “file”, después se oprime importar imagen “import image” y se pone transportar a PulseNet
- Al seleccionar estas pestañas se abrirá un cuadro de guardado, donde se vuelve a colocar el nombre del protocolo de corrida. Este nuevo archivo se guardara en formato .tiff para poder utilizarlo en el análisis del gel por el software BioNumerics
- Vaciar el buffer de la cámara de electroforesis y descartar
- Enjuagar la cámara con 2 litros de agua destilada estéril, dejar en funcionamiento la bomba entre 5-10 minutos antes de drenar el agua de la cámara y las mangueras.

Criterios de aceptación

Se considera que la metodología se realizó adecuadamente cuando cumple con los siguientes criterios:

- Presencia de control (*Salmonella* Braenderup H9812) en los carriles 1, 5, 10 (en un gel de 10 pozos), o en los carriles 1, 5, 10, 15(en un gel de 15 pozos)
- El control correspondiente a *Salmonella* Braenderup H9812, debe ser la banda que migre más bajo hasta 1,0-1,5 cm de la parte inferior del gel
- El gel de agarosa debe estar íntegro y sin fisuras
- La imagen del gel observada en el foto documentador debe estar limpia, sin residuos (pelusas, polvo, burbujas de agua, etc,) que puedan distorsionar la imagen y/o ocasionar la presencia de reflejos o “fantasmas” de las bandas

Bibliografía

- (s/a). (2007). Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. OMS: Francia.
- (s/a). (2012). Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos. Consultado en línea el día 24 de Enero de 2019 en: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/laboratorio-de-diagnostico-para-la-deteccion-de-organismos-patogenos-lddop>
- (s/a). (2013). Salud pública, calidad e inocuidad de los alimentos. Ministerio de salud y protección social. Bogotá
- (s/a). (2015). Enfermedades transmitidas por alimentos; Ficha técnica número 9: Salmonelosis. RENAPRA: México. Consultado en línea el 23 de Enero de 2019 en: <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/salmonelosis.pdf>
- (s/a). (2015). Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Consultado en línea de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es
- (s/a). (2018). Salmonella (No Tifoidea). OMS. Consultado en línea de: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)#:~:text=Salmonella%20es%20un%20g%C3%A9nero%20de,Salmonella%20bongori%20y%20Salmonella%20enterica.](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)#:~:text=Salmonella%20es%20un%20g%C3%A9nero%20de,Salmonella%20bongori%20y%20Salmonella%20enterica.)
- Barreto M. Castillo M. Retamal P. (2016). *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Revista Chilena Infectol. 33 (5): 547-557.
- Birren B, Lai E. (1993). Pulsed-field gel electrophoresis. En: Birren B, Lai E, editores. Pulsed-field gel electrophoresis. A practical guide. San Diego, CA, EEUU: Academic Press Inc.
- Blair C., Taylor R. (2008). Bioestadística. Editorial Peason. Prentice Hall. México

- Bliska JB, Galán JE, Falkow S. (1993). Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell*; 73: 903-20.
- Cardozo A. et al. (2015). Electroforesis en Gel de Campo pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Univ. Sci.* 2013, Vol. 18 (2): 203-222.
- Carle G, Olson M. (1984). Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. United States.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2016). National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED) Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Consultado en línea el día 25 de Septiembre de 2019 de: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html#>
- Chu G, Vollrath D, Davis R W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*; 234 (4783): 1582-1585.
- Cockerill F R, Smith T F. (2004). Response of the clinical microbiology laboratory to emerging and reemerging infectious diseases. *Journal of Clinical Microbiology*; 42 (6): 2359-2365.
- Dijkshoorn L, Towner K J, Struelens M J. (2001). *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*. Elsevier.
- Dirección General de Epidemiología (DGE). Anuario de Morbilidad 1984-2017. Morbilidad nacional. Consultado en línea el día 18 de febrero de 2019 de: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_enfermedad.html
- Dominguez, M. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología*. Editorial Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Efrain M. et al. (2006). Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*. Volume 3, Number 1.

- Escobar de Rico, M. (2004). Microbiología General. Primera ed. Editorial Javegraf. Bogotá.
- FAO. (2002). Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC). Ministerio de salud y consumo: España.
- Fierro F. (2010). Electroforesis de ADN. Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM: México.
- Firacative C. (2006). Caracterización molecular de aislamientos invasores colombianos de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 5 recuperados entre 1994 y 2004. Grupo de microbiología, Instituto Nacional de Salud de Bogotá, D.C., Colombia. *Biomédica* 2006; 26:295-301.
- Freifelder D. (1981). Applications of Biochemistry and Molecular Biology. New York: Freeman and Company.
- Galán JE, Zhou D. (2001). Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci: USA*; 97: 8754-761.
- Garaizar J, Rementeria A, Porwollik S. (2006). DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; 47 (2): 178-189.
- Gautom R. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol*; 35:2977-2980.
- Gonzalez M. (2013). La inocuidad en el Plan Nacional de Seguridad Alimentaria y Nutricional: análisis orientado a la valoración del concepto. *DIAETA revista argentina de dietistas y nutriólogos: Buenos aires* ;31 (145):15-21
- Jaramillo L. (2011). Caracterización de los sistemas de producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Estado de Jalisco, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14 (2011): 501 – 512.
- Jawetz, E. Melnick, J. y Adelberg, E. (2005). Microbiología Médica. Editorial El manual Moderno. 18ª Edición: México.

- Jurado, R. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por *salmonellas*. Revista de Medicina. 10(52):3497-501
- Martínez N. (2007). Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella* entérica. Universidad de Oviedo: España.
- Maslow J N, Slutsky A M, Arbeir R D. (1993). Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. American Society for Microbiology: Washington D C; 21: 563-572.
- Nassonova, E.S. (2008). Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, instruments and application. Cell and Tissue Biology 2: 557-565
- Nochumson S. (1985). Polyacrylamide cross-linked with a polysaccharide resin as electrophoretic gel medium. FMC corporation assignee.
- Oliver D M, Bean P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology; 37 (6): 1661-1669.
- Olivera B M, Baine P, Davidson N. (1964). Electrophoresis of the nucleic acids. Biopolymers; 2 (3): 245-257.
- Richard V. (2011). Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Laboratory and Epidemiologic Considerations for Interpretation Data. Molecular Microbiology Principles and practice. (2nd edition). ASM Press: Washington.
- Robles Y. (2015). Enzimas de Restricción. Departamento de ciencias y Tecnología. Universidad Interamericana de Puerto Rico: Puerto Rico.
- Rojas R. Gonzalez T. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud pública mexicana. 47(5).
- S/A. (2008). Preparación de buffer Tris-EDTA. Laboratorio de Genomic Viral y Humana; Facultad de Medicina. UASLP: México
- Salazar M. et al. (2013). Enzimas de restricción. Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Mc Graw Hill Education: México.
- Sanchez M. et al. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Asociación Colombiana de Infectología vol.7-1.

- Santamaría Y. (2015). Metodología para utilizar un molde único en la preparación de muestras de ADN inmovilizado en agarosa de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, útiles en miniecp. Revista CENIC Ciencias Biológicas; versión electrónica, 46(3).
- Saravia, J. (2008). Salmonelosis. Sección de Enfermedades Infecciosas. Hospital San Juan de Dios. Bogotá – Colombia.
- Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. Cell 37: 67-75
- Schwartz DC. (1984). Cantor CR. Separation of yeast chromosome sized ADNs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. Cell; 37:67-75.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2013). Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes (CNRPyC). Boletín de Sanidades. SAGARPA: México. Año II. Núm. 15 consultado en línea el día 24 de enero de 2019 de: <http://www.conasamexico.org.mx/13/wp-content/uploads/2014/01/Centro-Nacional-de-Referencia-de-Plaguicidas-y-Contaminantes-CNRPyC.pdf>
- Smith, D. Conat, N. y Beard, J. (1952). Zinseer's textbook of bacteriology. Ed. Appietoh Century Cofts. 10 Edition. USA.
- Southern EM, Anand R, Brown WRA, Fletcher DS (1987) A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. Nucleic Acids Research 15: 5925-5943
- Stanchi, O. (2007). Microbiología Veterinaria. Primera edición. Editorial Intermedica. Buenos aires.
- Swaminathan B (2001) *Listeria monocytogenes*, in Doyle MP, Beuchat, L.R., Montville, T.J., (Eds). Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Tafur M. (2009). La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. Rev Colom Cienc Pecua vol.22 no.3 Medellín July/Sept. 2009.
- Tenover, F. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of clinical microbiology, 33(9), 2233.

- Terragno, R. Caffer, M. Bruna, S. y Binsztein, N. (2003). Manual de procedimientos. *Salmonella*: Parte I. Aislamiento, Identificación y Serotipificación. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Global Salm-Surv y CDC. Buenos aires Argentina.
- Walpole R., Myers R., Myers S., Ye K. (2007). Probabilidad y Estadística para ingeniería y ciencias. Octava Edición. Editorial Pearson, Prentice Hall. México
- Wayne D. (2006). Bioestadística. Cuarta edición. Editorial Limusa Wiley. México
- Whitt, D. y Slayers, A. (2002). Bacterial pathogenesis. A molecular approach. Segunda ed. ASM Press. Washington, D.C.
- Williams D W, Wilson M J, Lewis M A O. (1999). Deoxyribonucleic acid typing methods for medically important microorganisms. *British Journal of Biomedical Sciences*; 56 (1): 56-65.
- Yábar C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Instituto Nacional de Salud: Lima.
- Zavala, J. (2005). Enzimas de restricción. Manual de técnicas básicas de biología molecular. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán: México.
-