



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“GENOTIPICACIÓN DE CEPAS DE *Salmonella* spp.  
PROVENIENTES DE BOVINOS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

ANNIA DENNISE LÓPEZ DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO  
HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”

COMITÉ TUTOR:

DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO  
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y  
PECUARIAS

DR. H. ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO

MAYO 2017



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.

*Dedico este trabajo a:*

*A mi amada familia, mis padres Jaime y Ma. Guadalupe, mis hermanos Ariadna Desireé y Jaime de Jesús, mi abuelita Martha porque me apoyan en todas las decisiones y en cada una de las etapas de mi vida*

*A mi esposo Esteban López Silva, muchas personas me han apoyado en diferentes aspectos, sin embargo, eres tú quien ha estado a mi lado tomando mi mano, levantándome cuando caigo, dándome fuerza cuando las mías se han terminado, además de saber tratar mi carácter*

*Y principalmente a Dios por llenar de bendiciones cada momento de mi vida, por poner siempre a las mejores personas en mi camino y quitar a las que ya han cumplido con su misión*

*A todos muchas gracias por su paciencia y amor*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro, por la oportunidad que me brindó de trabajar con él, por su tutoría, porque siempre tuve el recurso, los reactivos y los equipos necesarios para realizar este trabajo, por su apoyo tanto en lo académico como en lo personal, por compartir sus conocimientos, por su paciencia, por enseñarme a disfrutar y divertirme en lo que hago, y por su tiempo, una vida entregada en cada alumno que forja.

A mi Comité Tutor, Dr. Efrén Díaz Aparicio y Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández, por su apoyo, sus observaciones realizadas para mejorar el escrito del trabajo, por estar siempre pendientes en todo el proceso de la Maestría.

Al Jurado asignado, Dr. Rafael Camacho Carranza, Dr. Rigoberto Hernández Castro, Dra. Gabriela Gómez Verduzco, Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández y Dr. Efrén Díaz Aparicio, por su apoyo en la revisión del trabajo de tesis y por sus observaciones realizadas para la mejora del mismo.

Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, por abrirme las puertas al conocimiento dándome la oportunidad de subir un peldaño más en mi formación académica.

Al Comité Académico del Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por todo el apoyo brindado y principalmente por la confianza que depositaron en mí permitiendo culminar la Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Al CONACyT, por la beca de manutención y el servicio médico (ISSSTE) recibidos durante la realización del trabajo de Maestría, sin este apoyo económico hubiera sido muy difícil la realización del mismo, (Clave/Becario: 563507/301757).

Al Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por abrir las puertas de la Unidad de Investigación a estudiantes y por su apoyo permitiendo el acceso al comedor.

Al Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por el espacio brindado para la realización del trabajo experimental y escrito.

Al técnico Luis Enrique Fernández Maya por su valioso apoyo en la preparación de medios de cultivo, reactivos y esterilización de material.

Al Dr. Fernando Martínez Hernández, por permitir el uso del Espectrofotómetro de Microplaca Epoch y por la orientación académica.

**ÍNDICE**

Dedicatorias	ii
Agradecimientos	iii
Lista de figuras	vii
Lista de cuadros	viii
Abreviaturas y siglas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Generalidades	2
Clasificación	2
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>12</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
Colección de aislamientos bacterianos	13
Identificación fenotípica	13
Identificación molecular	14
Tipificación molecular	15

Análisis de secuencias	18
<b>RESULTADOS</b>	19
Identificación bioquímica y susceptibilidad a quimioterapéuticos	19
Identificación molecular	22
Tipificación por secuencias multilocus (MLST)	22
<b>DISCUSIÓN</b>	31
<b>CONCLUSIÓN</b>	38
<b>REFERENCIAS</b>	39

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Distribución de los marcadores moleculares dentro del cromosoma de *Salmonella*.

**Figura 2.** Amplificación del fragmento del gen *invA*.

**Figura 3.** Amplificación de los siete genes utilizados en MLST de *Salmonella*.

**Figura 4.** Diagrama goeBURST para eBG1 que agrupa a *S. Typhimurium*.

**Figura 5.** Diagrama goeBURST del eBG4.

**Figura 6.** Diagramas goeBURST de los serotipos *S. Muenchen* y *S. Montevideo* dentro de sus eBGs correspondientes.

**Figura 7.** Diagramas goeBURST que muestra el serotipos *S. Choleraesuis*.

**Figura 8.** Diagramas goeBURST de *S. Kentucky* y la ST2858.



**LISTA DE CUADROS**

**Cuadro 1:** Islas de Patogenicidad de *Salmonella*, tamaño y función.

**Cuadro 2.** Características fenotípicas del crecimiento de las colonias de *Salmonella* en medios selectivos y diferenciales utilizados para su aislamiento.

**Cuadro 3.** Características de los siete genes constitutivos utilizados para tipificar molecularmente con MLST.

**Cuadro 4.** Quimioterapéuticos utilizados por el sistema semi automatizado VITEK2 y los puntos de corte utilizados para los criterios de clasificación basados en el CLSI.

**Cuadro 5.** Oligonucleótidos utilizados para realizar la identificación molecular mediante la técnica de PCR, secuencia y localización del oligonucleótido dentro del gen *invA*.

**Cuadro 6.** Concentración de los oligonucleótidos empleados para realizar MLST en los 20 aislados de *Salmonella*.

**Cuadro 7.** Secuencia de los siete oligonucleótidos empleados para realizar el MLST de *Salmonella*: tamaño del gen y fragmento de interés.

**Cuadro 8.** Condiciones para la realización del PCR del gen *invA* y de los siete genes utilizados para realizar MLST en los 20 aislados de *Salmonella*.

**Cuadro 9.** Identificación bioquímica y resistencia de los aislamientos de *Salmonella*.

**Cuadro 10.** Porcentaje de resistencia de los aislamientos de *Salmonella* estudiadas.

**Cuadro 11.** Relación entre perfil de resistencia y la ST de los 20 aislamientos de *Salmonella* estudiados.

**Cuadro 12.** Perfil alélico y ST obtenidos mediante MLST de los aislamientos 20 de *Salmonella*.

**ABREVIATURAS Y SIGLAS**

BG	Verde Brillante
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
eBG	eBourst Group
EMB	Hematoxilina Azul de Metileno
HE	Hektoen Entérico
KOH	Hidróxido de potasio
LIA	Agar Lisina Hierro
MC	McConkey
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
MLEE	Electroforesis de Enzimas Multi-Locus
MLST	Tipificación por Secuencias Multi-Locus
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranósido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RM-VP	Rojo de Metileno y Voges Proskauer
RNAsa	Ribonucleasa
SIM	Sulfuro Indol para Movilidad
SS	<i>Salmonella Shigella</i>
ST	Secuencia Tipo
TSA	Agar Soya Trypticaseína
TSI	Hierro Tres Azúcares
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
XLD	Xilosa Lisina Desoxicolato

## RESUMEN

La salmonelosis es una zoonosis por lo que es considerada un problema de salud pública y animal a nivel mundial. Nuestro país carece de una base de datos epidemiológica de *Salmonella* en bovinos que nos permita conocer la frecuencia de infección del ganado debida a este género, y qué serotipos son los más frecuentes. El bovino tiene papel de reservorio y algunos pueden estar como súper diseminadores poniendo en riesgo al hato y la salud humana. El objetivo de este trabajo fue tipificar molecularmente aislamientos de *Salmonella* spp., provenientes de bovinos clínicamente sanos. Se trabajaron 20 muestras provenientes de recto de bovinos del estado de Veracruz, aisladas en el año 2012. La identificación fenotípica y la Concentración Mínima Inhibitoria de las muestras se realizaron utilizando el sistema semi automatizado VITEK 2. Para la identificación molecular se realizó la PCR de colonia amplificando un fragmento del gen *invA* de 284 pb. Se utilizó la Tipificación por Secuencias Multi-Locus para determinar la Secuencia Tipo de los aislamientos. Mediante el sistema VITEK 2, 19 aislamientos fueron identificadas como *Salmonella enterica* spp. *enterica* y 1 aislamiento como *Salmonella enterica* serovariedad Gallinarum, estos resultados se confirmaron de forma molecular debido a que los 20 aislados amplificaron el fragmento correspondiente al fragmento de 284 pb del gen *invA* específico de este género. El 100% de los aislamientos presentaron resistencia a amikacina, cefazolina y gentamicina. El 70% de los aislamientos fue resistente a tobramicina, el 35% a nitrofurantoína, el 15% a ampicilina, el 10% a ampicilina con sulbactam, el 5% a cefoxitina, el 50% de los aislados presentaron multidrogo resistencia. De los 20 aislamientos, 14 fueron ST19 (*S. Typhimurium*), cada uno de los seis aislados restantes corresponden a diferente ST, ST78 (*S. Gallinarum*), ST83 (*S. Muenchen*), ST138 (*S. Montevideo*), ST139 (*S. Choleraesuis*), ST198 (*S. Kentucky*) y ST2858 es serotipo no definido. El esquema MLST de siete genes permitió la identificación de los serotipos de *Salmonella*, así como la determinación de la secuencia tipo de cada aislamiento.

## ABSTRACT

Salmonellosis is a zoonosis and is considered a public and animal health problem worldwide. Our country lacks an epidemiological database of *Salmonella* in cattle that allows us to know the frequency of cattle infection due to this genus, and which serotypes are the most frequent of this infection. The bovine has a role of reservoir and some can be as super disseminators putting at risk to the herd and human health. The objective of this work was to molecularly characterize strains of *Salmonella* spp. from clinically healthy cattle. Twenty samples from the rectum of bovines of the state of Veracruz, isolated in 2012, were worked. The phenotypic identification and Minimum Inhibitory Concentration of the samples were performed using the VITEK 2 semi automated system. For molecular identification, colony PCR was performed by amplifying a fragment of the *invA* gene of 284 bp. Multi-Locus Sequence Typing was used to determine the Sequence Type of the isolates. By means of the VITEK 2 system, 19 isolates were identified as *Salmonella enterica* spp. *enterica* and 1 isolation as *Salmonella enterica* serovar Gallinarum, these results were confirmed molecularly because the 20 isolates amplified the fragment corresponding to the 284 bp fragment of the *invA* gene Specific of this genus. 100% of the isolates showed resistance to amikacin, cefazolin and gentamicin. 70% of the isolates were resistant to tobramycin, 35% to nitrofurantoin, 15% to ampicillin, 10% to ampicillin with sulbactam, 5% to ceftiofur, 50% of isolates had multidrug resistance. Of the 20 strains isolates, 14 were ST19 (*S. Typhimurium*), each of the remaining six isolates corresponded to different ST, ST78 (*S. Gallinarum*), ST83 (*S. Muenchen*), ST138 (*S. Montevideo*), ST139 (*S. Choleraesuis*), ST198 (*S. Kentucky*) and ST2858 is non-defined serotype. The seven-gene MLST scheme is a method of unambiguous identification of pathogenic bacteria of global concern, including *Salmonella* spp.

## INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es considerada un problema de salud pública y animal a nivel mundial, la infección se disemina comúnmente por la ingesta de agua y alimentos contaminados, sin embargo, el contacto directo con animales infectados es considerado como otra probable vía de infección (Mussaret B. Z., *et al.*, 2012; 2008; Cummings K.J, *et al.*, 2010; Figueroa O. I., y Verdugo R. A., 2005). Los microorganismos del género *Salmonella* se han aislado de diversas fuentes, como aguas residuales, alimentos de origen animal, heces, suelo, entre otros. *Salmonella* es un patógeno zoonótico, por lo tanto la infección se puede transmitir de animales a humanos, tiene como principales reservorios a animales utilizados para el consumo humano, pollo, ganado porcino y bovino, los cuales pueden infectarse directamente en las granjas o por contaminación cruzada en la cadena de producción, en el humano la infección se adquiere con frecuencia después de ingerir alimentos de origen animal contaminados, generando desde una infección intestinal aguda, sin discriminar edad, hasta infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunocomprometidos, por lo que se considera uno de los cinco patógenos zoonóticos más importantes transmitidos por alimentos (Mussaret B. Z, *et al.*, 2006; 2006; Torpdahl M, *et al.*, 2005; Montaña P. J., *et al.*, 2012; Pierre W, *et al.* 2011; Acha P. N. *et al.*, 2001).

En 1880, el patólogo y bacteriólogo alemán Carl Joseph Eberth observó por primera vez los bacilos de *Salmonella* presentes en nódulos linfáticos y bazo de casos de fiebre tifoidea, por lo que fueron nombrados, en aquel tiempo, como bacilos de Eberth o *Eberthella typhosa*. Fue hasta el año 1900 que Lignières propuso que estos bacilos fueran nombrados como *Salmonella* en honor al Médico Veterinario Daniel Elmer Salmon que, junto a Theobald Smith obtuvieron el primer aislamiento de la denominada en ese momento como *S. cholerae-suis* (Faura A. C, *et al.* 2008).

## Generalidades

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que se encuentra conformado por un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. *Salmonella* es un género constituido por bacilos de corta longitud que miden 2-3  $\mu\text{m}$  de largo x 0.4-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho, no forman esporas, algunos serotipos poseen cápsula, son móviles por la presencia de flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* que son inmóviles). Son bacterias anaerobias facultativas, por lo que pueden desarrollar un metabolismo respiratorio cuando se encuentran bajo condiciones aerobias y un metabolismo fermentativo mixto en condiciones anaerobias. La mayoría de los serotipos crecen óptimamente a 37°C, sin embargo, pueden desarrollarse en un rango amplio de temperatura entre los 7°C y 48°C, con un pH que oscila entre 4 y 8, esta característica les confiere la capacidad de resistir el ambiente ácido del estómago que aunado a su vida intracelular facultativa invade células del epitelio intestinal (Figueroa O. I., y Verdugo R. A., 2005; Faura A. C, *et al.*, 2008).

## Clasificación

Tomando en cuenta la distancia genética del género medida por hibridación DNA-DNA, se obtuvo como resultado la identificación de dos especies, *S. bongori* y *S. enterica*. La especie *S. enterica* se divide a su vez en seis subespecies, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae* (Faura A. C, *et al.* 2008). Según el esquema de Kauffmann-White, el cual se basa en los antígenos flagelar (H1 y H2), somático (O) y Vi, polisacárido capsular (*S. Typhi*, *S. Dublin* y *S. Paratyphi*), existen 64 antígenos O y 114 antígenos H, y sus combinaciones resultan en más de 1500 serotipos dentro de *S. enterica* subespecie *enterica* y más de 2000 serotipos en las otras subespecies de *S. enterica*, incluyendo los serotipos de *S. bongori* (Figueroa O. I., y Verdugo R. A., 2005, Achtman M, *et al.* 2012).

### **Factores de virulencia**

*Salmonella* es un patógeno primario que destruye barreras celulares que normalmente restringen el paso, se establece en tejido produciendo daño celular, la interacción con el hospedero es compleja por lo que necesita expresar factores de virulencia específicos que le permiten establecerse dentro del hospedero para transmitir nuevamente la infección. Los genes de virulencia que codifican para estos factores se localizan en 19 Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (IPS, Cuadro 1).

Las IPS han sido adquiridas por transferencia horizontal, algunas se conservan dentro del género, otras son específicas para algunos serotipos. Los genes de virulencia involucrados en la fase intestinal de la infección se localizan en la IPS-1 e IPS-2, mientras el resto de las IPS son necesarias para originar una infección sistémica, sobrevivencia intracelular, expresión de fimbrias, resistencia a quimioterapéuticos, y captación de hierro y  $Mg^{2+}$ . Dentro de los factores de virulencia que contribuyan a la patogenicidad de *Salmonella* se encuentran, el regulador transcripcional principal, factores para invasión de células epiteliales, factores requeridos para infección sistémica, toxinas y plásmidos de virulencia.

El regulador transcripcional principal está formado por dos sistemas de componentes reguladores, PhoP y PhoQ que regulan la expresión de más de 40 genes relacionados con la virulencia en humanos y modelo de ratón, sobrevivencia dentro del macrófago, crecimiento en succinato como fuente única de carbón y poder crecer en concentraciones limitadas de magnesio. Los factores para la invasión de células epiteliales son un grupo de proteínas involucradas en la adhesión y es mediada por al menos cuatro fimbrias diferentes fimbria tipo I (*fim*), fimbria agregativa delgada o curli (*agf*, *csg*), fimbria codificada en plásmido (*pef*), y fimbrias polares largas, además incluye proteínas codificadas en la isla de patogenicidad 1 que conforman al sistema especializado de secreción llamado

sistema de secreción tipo III (SSTIII) que secreta proteínas de invasión a la matriz extracelular y transporta moléculas efectoras en el citosol de la célula hospedera.

Los factores necesarios para una infección sistémica, le dan a *Salmonella* la capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles como, el pH ácido del estómago y el fagosoma, el estrés oxidativo dentro del fagosoma, y la relativa escases de nutrientes como carbono y hierro. Se han descrito toxinas similares a cólera y enterotoxinas, hay evidencia que indica que este operón codifica para un sistema de secreción que se utiliza para la secreción de las toxinas. Los plásmidos de virulencia están presentes en serotipos hospedero específico como *S. Dublin*, *S. Choleraesuis* y *S. Gallinarum*, incluso se encuentran en serotipos con rango amplio de hospedero como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. Algunos aislamientos de *S.* contienen plásmidos de virulencia grandes (50–100 kb), sin embargo, no se han identificado plásmidos virulencia en serotipos específicos para humanos *S. Typhi* y *S. Paratyphi* (Lampel K. A. *et al.* 2ª Edición, Oyarzabal O. A., and Bakert S., 2012; Toldrá F., 2009).

### **Epidemiología**

Globalmente hay ~1.7 billones de casos de enfermedades diarreogénicas cada año, se estiman 93.8 millones de casos al año y 155 mil muertes a causa de *Salmonella* no tifoidea. En países desarrollados como Estados Unidos (EE. UU.) y Reino Unido, se han establecido sistemas de vigilancia, que les permite conocer con relativa certeza la incidencia de las infecciones por *Salmonella* (Mussaret B. Z, *et al.*, 2006; Majowicz *et al.*, 2010, WHO 2013). En EE. UU. se considera que cada año *Salmonella* no tifoidea causa 1 millón de muertes por consumo de alimentos contaminados con 19 mil hospitalizaciones y 380 muertes, mientras que *S. Typhi* causa 1800 casos, 200 hospitalizaciones y no hay muertes registradas (Scallan E *et al.*, 2011, CDC 2011, U. S. Department of H. H. S. 2011). Barkoy-Gallagher *et al* (2003), reportaron que es frecuente aislar *S. enterica* en heces de ganado sano,



**Cuadro 1: Islas de Patogenicidad de *Salmonella*, tamaño y función.**

<b>Isla</b>	<b>Tamaño (kb)</b>	<b>Función</b>
IPS-1	40	SSTIII, captar hierro
IPS-2	40	SSTT
IPS-3	17	Transporte de Mg <sup>2+</sup>
IPS-4	23	SSTI
IPS-5	8	Efectores de SSTIII
IPS-6	59	Sistema de fimbrias <i>saf tcs</i>
IPS-7	134	Antígeno Vi y profago <i>sopE</i>
IPS-8	6.8	Proteína bacteriosinas de inmunidad
IPS-9	16	SSTI
IPS-10	33	Profago ST46 y operón de fimbria <i>sef</i>
IPS-11	14	Efectores del SSTIII
IPS-12	6.3	<i>msgA</i> y <i>narP</i>
IPS-13	-7	Necesario para sobrevivir en macrófagos de pollos
IPS-14	-11	Desconocido
IPS-15	6.5	Proteínas de función desconocida
IPS-16	4.5	Remanentes de bacteriófagos y genes de modificación de LPS
IPS-17	5.1	Remanentes de bacteriófagos y genes de modificación de LPS
IGS-1 <sup>a</sup>	43	Genes de resistencia
IMP	ND	Captación de hierro

IPS: Isla de Patogenicidad de *S.*, IGS: Isla Genómica de *S.*, IMP: Isla Mayor de Patogenicidad. ND: No Determinado, SST: Sistema de Secreción Tipo (I, III), LPS: Lipopolisacárido. <sup>a</sup> Sólo en *S. Typhimurium* DT104

por lo que el ganado bovino para producción de carne es considerado como un vehículo relacionado con casos esporádicos y brotes (Gallagher B. G., *et al.*, 2003; Loneragan G. H., *et al.*, 2005; 2012; Harhay B. D., *et al.*, 2008; Guo C, *et al.*, 2011).

Además, estos animales al no presentar signos clínicos y ser portadores de *S. spp.*, contribuyen a la contaminación de las instalaciones (Bosilevac J. M., *et al.*, 2009; Gragg S. E., *et al.*, 2013). En contraste, las estadísticas de enfermedades por alimentos en países en desarrollo son difíciles de estimar debido a que los reportes son pocos o porque no existe un sistema de vigilancia. Los reportes realizados en México son principalmente en humanos y se le presta mayor importancia a *S. Typhi*, debido a que es el que produce la fiebre tifoidea, anualmente se reportan alrededor de 15 mil casos de fiebre tifoidea (Gomez J. V., *et al.*, 1994).

## **MARCO TEÓRICO**

Debido a la hipótesis planteada, que todos los serotipos de *S. enterica* comparten un ancestro filogenético común y a la capacidad que actualmente están presentando los serotipos para adaptarse a nuevos hospederos, incluyendo al humano, resulta importante poder contar con un método de identificación genética que permita diferenciar entre la gran variedad de serotipos que conforman éste género.

Las técnicas serológicas y características nutricionales han sido utilizadas por muchos años para clasificar a bacterias patógenas, en México se hace uso de medios diferenciales y selectivos para aislar a *Salmonella* como agar McConkey (MC), agar Eosina Azul de Metileno (EMB), agar *Salmonella Shigella* (SS), agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), agar Hektoen (HE), y agar Verde Brillante (BG), las placas se incuban a 37°C durante 18-24 horas y se observan colonias de aproximadamente 2 mm de diámetro (Cuadro 2). Entre las técnicas más utilizadas para realizar un diagnóstico se encuentran las pruebas bioquímicas para las

cuales se utilizan los siguientes medios y reactivos, Agar Soya Trypticaseína (TSA), Agar Hierro Tres Azúcares (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), discos de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), Agar (SIM), Medio Base de Moeller para Descarboxilasas, L-lisina monoclóridato, L-arginina monoclóridato, L-ornitina monoclóridato, Medio Base para Azúcares, solución de Dulcita al 5%, Malonato, Medio RM-VP, Reactivo de Erlich para la Prueba de Indol, Rojo de Metilo, Solución de KOH para la Prueba de Voges Proskauer, y  $\alpha$ -naftol para la prueba de Voges Proskauer.

**Cuadro 2. Características fenotípicas del crecimiento de las colonias de *Salmonella* en medios selectivos y diferenciales utilizados para su aislamiento.**

MEDIO DE CULTIVO	SELECTIVIDAD	ASPECTO DE LAS COLONIAS
Agar MC	Baja	Incoloras
Agar EMB	Baja	Incoloras
Agar SS	Alta	Incoloras con centro negro
Agar XLD	Alta	Rojas con centro negro
Agar HE	Alta	Verdes-azuladas con centro negro
Agar BG	Alta	Rosadas pálidas

Otra técnica empleada es la serotipificación la cual se basa en las diferencias que presentan los microorganismos en su constitución antigénica, poniendo en evidencia la presencia de antígenos somáticos, flagelares y capsulares. La patogenicidad de *Salmonella* depende de su habilidad para internalizarse en células no fagocíticas, por consiguiente, dentro de las técnicas de biología molecular empleadas para identificar el género *Salmonella* se emplea PCR punto final donde se utiliza oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento del gen *invA* que codifica para una proteína que favorece el proceso de invasión, por su importancia dentro de este género, el gen *invA* está presente y es funcional en

la mayoría, si no todas, los aislamientos virulentos de *Salmonella*. El gen *invA* se localiza en la IPS-1 que contiene 31 genes responsables de la invasión de células no fagocíticas y componentes del SSTIII, *invA* es una proteína de membrana interna que participa en la formación de un canal a través del cual se exportan los polipéptidos (Coburn B. *et al.*, 2007, Clements M. *et al.*, 2001).

El poder discriminar entre aislamientos de especies bacterianas se convierte en un punto importante para diferentes aspectos de microbiología, principalmente cuando se trata de géneros bacterianos conformados por una gran variedad de serotipos, como es el caso particular de *Salmonella* que está conformado por ~3,000 serotipos. El MLST se desarrolló a partir de Electroforesis de Enzimas Multilocus (MultiLocus Enzyme Electrophoresis, MLEE), convirtiéndose en una alternativa basada en secuencias, asigna los alelos en cada locus directamente por secuenciación de nucleótidos (Cuadro 3), como la secuenciación de nucleótidos revela toda la variación en un locus, el número de alelos por locus asignados es mucho mayor que en MLEE, por lo tanto las secuencias de fragmentos internos de 399- 501 pb de siete genes constitutivos son determinados en cada aislamiento (Brian S. G., 1999; Mark E. C., and Spratt Brian G. 1999). Esta longitud de fragmento de DNA fue elegido para poder secuenciar con precisión ambas cadenas utilizando un único par de oligonucleótidos y, en la mayoría de los patógenos bacterianos, proporciona una variación suficiente para identificar los diversos alelos dentro de la población. MLST es un método de tipificación que determina la secuencia completa o un fragmento de nucleótidos de genes constitutivos. Las ventajas de MLST no sólo incluyen que la secuencia de DNA resultante es inequívoca y se pueden comparar fácilmente con los resultados obtenidos por otros laboratorios, por ejemplo, a través de la base de datos mundial, además los resultados que se generan mediante la secuencia de DNA se pueden utilizar para inferir una relación filogenética entre los aislamientos (Swaminathan B. *et al.*, 2001, Urwin R. *et al.*, 2003).

**Cuadro 3. Características de los siete genes constitutivos utilizados para tipificar molecularmente con MLST**

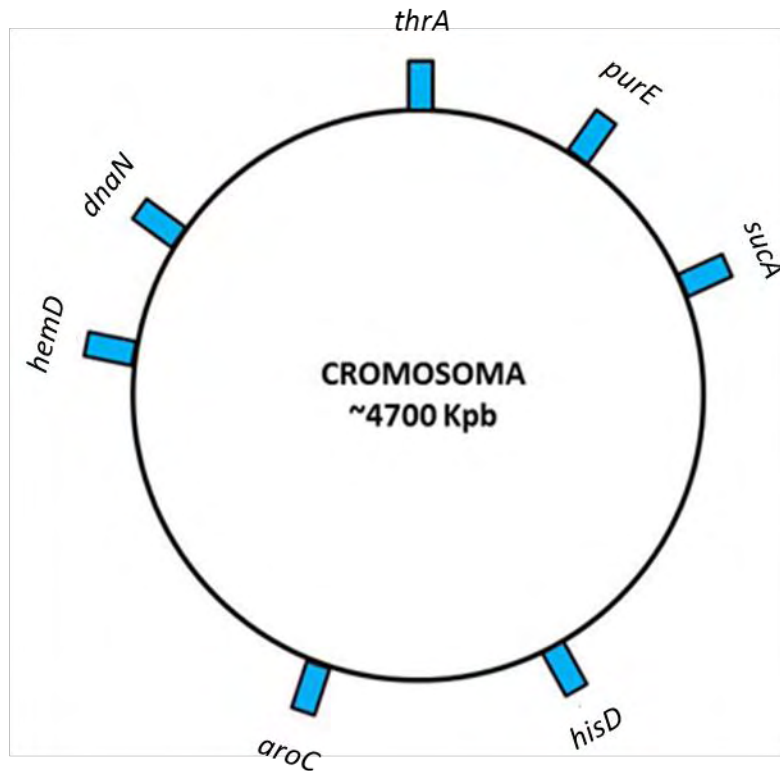
GEN	ENZIMA QUE CODIFICA	FUNCIÓN
<i>aroC</i>	Corismato sintasa	Cataliza fosfoenol piruvato
<i>dnaN</i>	Subunidad $\beta$ de DNA polimerasa III	Estabiliza la hélice de DNA
<i>hemD</i>	Uroporfirinógeno III cosintetasa	Participa en el metabolismo de porfirinas y hemos
<i>hisD</i>	Histidinol deshidrogenasa	Participa en la ruta de biosíntesis de histidina
<i>purE</i>	Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa	Participa en la síntesis de nucleótidos de purinas
<i>sucA</i>	Alfa cetoglutarato deshidrogenasa	Succinil transferidora
<i>thrA</i>	Aspartoquinasa homoserina deshidrogenasa	Complejo que interviene en la biosíntesis de aminoácidos de la familia del aspartato

Para cada gen, las diferentes secuencias se asignan como alelos y los alelos en los siete loci proporcionan un perfil alélico, que define sin ambigüedades la secuencia tipo (ST) de cada aislamiento (Paul V. 201; David A. M., and Spratt Brian G. 2005; Mamuka K., *et al.*, 2002).

El gran número de alelos en cada uno de los siete loci proporciona la capacidad de distinguir miles de millones de diferentes perfiles alélicos, y sólo sería de esperar que una cepa con el alelo más común en cada locus ocurra una vez en aproximadamente 10,000 aislamientos. La mayoría de los perfiles alélicos son mucho más raros que esto y es muy poco probable que dos aislamientos no relacionados posean el mismo perfil alélico.

La relación de los aislamientos se muestra como un dendograma construido utilizando la matriz de diferencias por pares entre sus perfiles alélicos. El dendograma es sólo una forma cómoda de mostrar esos aislamientos que tienen perfiles alélicos idénticos, o muy similares, asumiendo que derivan de un antepasado común. Las relaciones entre los aislamientos que difieren en más de tres, de cada siete loci, tienden a ser poco fiables y no se deben tomar para inferir su filogenia (Cooper J. E., and Feil E. J. 2004; Urwin R., and Maiden M. C. 2003; Turner M. E., and Feil E. J. 2007).

MLST es una técnica de tipificación bacteriana, utilizada principalmente cuando hay brotes en hospitales, por alimentos contaminados, y para realizar muestreos en animales de rastro, además de ser una herramienta empleada a nivel mundial que genera información para identificar y dar seguimiento a estudios epidemiológicos moleculares (Urwin R., and Maiden M. C. 2003). Para realizar la tipificación esta técnica se basa en la amplificación de siete genes conservados (Figura 1) y su posterior secuenciación, los genes son enviados a una base de datos y mediante un programa bioinformático y una persona experta en bioinformática (*curador*) que analiza los datos se obtiene una secuencia tipo lo que permite una identificación rápida y global al comparar los resultados obtenidos por diferentes laboratorios a nivel mundial (Qing H. Z., *et al.*, 2013; Cooper J. E., and Feil E. J. 2004; Aanensen D. M., *et al.*, 2005; Turner M. E., and Feil E. J. 2007).



**Figura 1. Distribución de los marcadores moleculares dentro del cromosoma de *Salmonella*.** Se esquematiza la distribución cromosomal de los 7 genes constitutivos sugeridos para realizar MLST entre aislamientos del género *Salmonella*. Modificado de Wiesner M. et al, 2009.

Actualmente en México se realizan estudios para conocer la incidencia, síntomas clínicos y resistencia a antimicrobianos en infecciones por *S.*, sin embargo, la incidencia es referida solamente por el género, por lo que es necesario implementar metodologías que permitan determinar específicamente los serotipos presentes, así mismo, este patógeno puede infectar a una amplia variedad de vertebrados desde animales de sangre fría como lagartos y tortugas hasta animales de sangre caliente como aves y al humano, esta coexistencia con hospederos vertebrados ha sido por más de 10 millones de años y ha tenido como resultado el desarrollo de mecanismos extremadamente sofisticados, por lo que la infección puede pasar desapercibida en hospederos asintomáticos, también se han descrito en hatos donde el bovino funciona de reservorio y algunos pueden estar como súper-diseminadores poniendo en riesgo al hato, ambiente y humanos.

Análisis epidemiológicos han establecido que los bovinos súper-diseminadores juegan un papel crucial para el control de la enfermedad, eliminando en heces  $10^3$ - $10^5$  UFC/g durante 400 días (Mussaret B. Z., *et al.*, 2008; 2013; Galán J. E. *et al.*, 2001; Gopinath S., *et al.*, 2012).

## **JUSTIFICACIÓN**

En México, las estadísticas de salud pública en incidencia de salmonelosis están basadas primordialmente en signos y síntomas clínicos sin hacer uso de métodos de diagnóstico que nos permita determinar al agente causal, por otro lado, en salud animal se desconoce la frecuencia de infección del ganado bovino debido a que los métodos de diagnóstico utilizados en brotes de salmonelosis no tienen la capacidad de identificar los serotipos llegando a conocer únicamente el género bacteriano. Por lo que es de nuestro interés conocer qué serotipos de *Salmonella* están presentes en el ganado bovino del Estado de Veracruz.

## **HIPÓTESIS**

Los aislamientos de *Salmonella* provenientes de bovinos del Estado de Veracruz presentarán diferentes secuencias tipo (ST).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Tipificación molecular de aislamientos de *Salmonella* provenientes de bovinos clínicamente sanos.

### **Objetivos específicos**

- Identificación bioquímica y determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el sistema semi automatizado VITEK 2.
- Identificación molecular del género *Salmonella* mediante el gen *invA*.
- Tipificación molecular por secuencias multilocus (MLST).



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Colección de aislamientos bacterianos**

Se utilizó un cepario de aislamientos de *Salmonella*, colectados de recto de bovinos productores de carne clínicamente sanos del estado de Veracruz, aisladas en el año 2012. Los aislamientos fueron resembradas en agar McConkey para verificar la pureza, posteriormente, se realizó la renovación del cepario para almacenarlo a -70° C, en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) con 50% de glicerol.

### **Identificación fenotípica**

Los 20 aislamientos fueron sembrados en TSA para ser re-identificados mediante el uso del sistema semi automatizado VITEK 2, de igual manera se realizó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). VITEK 2 es un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos (BioMérieux<sup>MR</sup>), las que son inoculadas con la suspensión de un cultivo puro microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática. Se utilizó a *Escherichia coli* ATCC 25922 como control para las reacciones de identificación y determinación del CMI.

Las tarjetas reactivas tienen 64 pozos que contienen, cada uno, un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras. Se utilizaron tarjetas reactivas para la identificación de GN – bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores. Los quimioterapéuticos presentes en las tarjetas utilizadas por sistema VITEK 2 para determinar la CMI de bacterias Gram negativas se enlistan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Quimioterapéuticos utilizados por el sistema semi automatizado VITEK 2 y los puntos de corte utilizados para los criterios de clasificación basados en el CLSI.**

QUIMIOTERAPEÚTICOS	CONCENTRACIÓN µg/ml Y CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN		
	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Amikacina	8	16	64
Amoxicilina/Ác. Clavulánico	4/2	16/8	32/16
Ampicilina	4	8	32
Cefazolina	4	16	64
Cefepime	2, 8	16	32
Ceftazidima	1, 2	8	32
Ceftriaxona	1, 2	8	32
Ciprofloxacino	0.5	2	4
Ertapenem	0.5	1	6
Fosfomicina	8	16	32
Gentamicina	4	16	32
Imipenem	2	4	16
Meropenem	0.5	4	16
Nitrofurantóina	16	32	64
Norfloxacino	1	8	32
Tigeciclina	0.75	2	4
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1/19	4/76	16/304

### Identificación molecular

Los aislamientos se identificaron de forma molecular mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de una colonia bacteriana para amplificar un fragmento del gen *invA* de 284 pb (Cuadro 5). Se utilizó el sistema

comercial TopTaq Master Mix (Qiagen) siguiendo las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante, 12.5 µl de TopTaq Master Mix (0.625 U/reacción de TopTaq DNA polimerasa, Buffer de PCR con 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP), 13.98 pmol/µl de oligonucleótido sentido y 16.53 pmol/µl de oligonucleótido antisentido, (Rhan K. et al, 1992), 10.5 µl de agua libre de RNAsa y se agrega una colonia (cultivos puros de 18 h en TSA). Las condiciones de reacción se describen en el Cuadro 6. La cepa de referencia *S. Typhimurium* A TIC 14579, Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, se utilizó como control positivo durante el análisis bioquímico y los ensayos de PCR.

**Cuadro 5. Oligonucleótidos utilizados para realizar la identificación molecular mediante la técnica de PCR, secuencia y localización del oligonucleótido dentro del gen *invA*.**

GEN	SECUENCIA 5'-3'	LOCALIZACIÓN EN <i>invA</i>
<i>invA</i>	F: GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	371-396
	R: TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	634-655

**Tipificación molecular**

Para llevar a cabo la tipificación molecular y determinación de secuencias tipo (ST), primero se realizó PCR de colonia para obtener el fragmento amplificado de los siete genes constitutivos empleados para tipificar aislamientos de *Salmonella* mediante MLST, utilizando el sistema TopTaq Master Mix (Qiagen) y siguiendo las condiciones descritas por el fabricante para reacciones de 25 µl se agregaron, 12.5 µl de TopTaq Master Mix (0.625 U/reacción de TopTaq DNA Polimerasa, buffer de PCR/MgCl<sub>2</sub> con 1.5 mM, 200 µM de cada dNTP), 1 µl de oligonucleótido sentido, 1 µl de oligonucleótido antisentido, descritos por Torpdahl M., et al, 2005 (el volumen de oligonucleótidos varía debido a la concentración que se encuentren, ver Cuadro 6), 10.5 µl de agua libre de RNAsa y con un asa estéril se agrega colonia, cultivos puros de 18 h en TSA (Torpdahl M., et al., 2005). Los

fragmentos amplificados se encuentran en un rango de 497 a 738 pb (Kidgell C, *et al.*, 2002). La secuencia de los oligonucleótidos para PCR y las condiciones de reacción para cada gen se describen en los Cuadros 7 y 8 respectivamente.

**Cuadro 6. Concentración de los oligonucleótidos empleados para realizar MLST en los 20 aislados de *Salmonella*.**

Oligonucleótidos Sentido/antisentido	CONCENTRACIÓN pmol/ $\mu$ l
aroCsF/aroCsR	22.12/24.09
dnaNF/dnaNsR	16.47/24.24
hemDF1/hemDR	17.92/19.82
hisDsF/hisDsR	15.91/22.65
purEF/purEsR	19.09/17.27
sucAF/sucAR1	15.91/16.90
thrAF/thrAsR	15.15/15.72

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1%, después se purificaron utilizando el kit QIAquick (Qiagen Ventura CA, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente los fragmentos se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM, para realizar la secuenciación en ambos sentidos, los oligonucleótidos se utilizaron a 10 pmol, y el template de DNA a una concentración de 100  $\mu$ g/ $\mu$ l. La secuenciación se realizó mediante electroforesis capilar utilizando el sistema BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem Foster City, CA, USA), los fragmentos a analizar se marcaron con fluorocromos, el secuenciador inyecta de forma automática las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero (POP-7) que funciona como un gel de secuencia permitiendo que se separen los fragmentos de DNA de cadena sencilla que se diferencian en una sola base. A una altura

determinada el láser del dispositivo detecta la fluorescencia emitida y traduce la secuencia correspondiente.

**Cuadro 7. Secuencia de los siete oligonucleótidos empleados para realizar MLST de *Salmonella*: tamaño del gen y fragmento de interés.**

GEN	SECUENCIA 5'-3'	GEN (pb)	FRAGMENTO INTERÉS(pb)
<i>aroC</i>	F: GGC ACC AGT ATT GGC CTG CT R: CAT ATG CGC CAC AAT GTG TTG	1097	501
<i>dnaN</i>	F: ATG AAA TTT ACC GTT GAA CGT GA R: CCA TCC ACC AGC TTC GAG GT	1101	501
<i>hemD</i>	F: GAA GCG TTA GTG AGC CGT CTG CG R: ATC ACG GAC CTT AAT ATC TTG CCA	757	432
<i>hisD</i>	F: GTC GGT CTG TAT ATT CCC GG R: GGT AAT CGC ATC CAC CAA ATC	1319	501
<i>purE</i>	F: ATG TCT TCC CGC AAT AAT CC R: CGC GGA TCG GGA TTT TCC AG	599	399
<i>sucA</i>	F: AGC ACC GAA GAG AAA CGC TG R: GAC GTG GAA AAT CGG CGC C	2923	501
<i>thrA</i>	F: GTC ACG GTG ATC GAT CCG GT R: CTC CAG CAG CCC CTC TTT CAG	2475	501

**Cuadro 8. Condiciones para la realización del PCR del gen *invA* y de los siete genes utilizados para realizar MLST en los 20 aislados de *Salmonella*.**

GENES	DI (°C/min)	D (°C/s)	A (°C/s)	E (°C/s)	EF (°C/min)	CICLOS
<i>invA</i>	95/3	95/30	55/30	72/30	72/5	30
<i>aroC</i>	94/5	94/30	55/30	72/1	72/5	33
<i>dnaN</i>	94/5	94/30	55/30	72/1	72/5	33
<i>hemD</i>	94/5	94/30	55/30	72/1	72/5	33
<i>hisD</i>	94/5	94/30	55/30	72/1	72/5	33
<i>purE</i>	94/5	94/30	55/30	72/1	72/5	33
<i>sucA</i>	94/5	94/30	55/30	72/1	72/5	33
<i>thrA</i>	94/5	94/30	55/30	72/1	72/5	33

DI: Desnaturalización inicial, D: Desnaturalización, A: alineación, E: Extensión, EF: Extensión final

### **Análisis de secuencias**

Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa Vector NTI Advance 11.5 que mediante la utilización de algoritmos matemáticos facilita editar (curar) las secuencias. Los amplificadores tienen un rango de 497 a 738 pb, para editar las secuencias obtenidas se localizaron los oligonucleótidos de ambos sentidos dentro del amplicón, se eliminaron los dos extremos de las secuencias, antes y después de los oligonucleótidos sentido y antisentido respectivamente, y se obtuvieron los fragmentos de interés los cuales se alinearon comparando base a base la secuencia de los aislamientos con respecto a las secuencias de referencia correspondientes reportadas en la base de datos mlst.net ([mlst.warwick.ac.uk/mlst/](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/)) para *Salmonella*, logrando determinar la existencia de cambios nucleotídicos en cada una de las secuencias. Al ingresar la secuencia a la base de datos se le asignó un “curador” que determinará el perfil de alelo y con

base en programas bioinformáticos que utilizan logaritmos se establece la Secuencia Tipo (ST) para cada una de las muestras.

## **RESULTADOS**

### **Identificación bioquímica y susceptibilidad a quimioterapéuticos**

El método semi automatizado VITEK 2 permitió identificar 19 aislamientos como *S. enterica* ssp., *enterica*, sin embargo uno de los aislamientos fue identificada como *S. enterica* serovariedad Gallinarum (Cuadro 9).

En los resultados obtenidos de CMI, utilizando el sistema semi automatizado VITEK 2 se observó que el 100% de los aislamientos presentaron resistencia a cefazolina, amikacina y gentamicina. El 70% de los aislamientos fue resistente a tobramicina, el 35% a nitrofurantoína, el 15% a ampicilina, el 10% a ampicilina con sulbactam y el 5% a cefoxitina. Todos los aislamientos fueron sensibles al resto de los quimioterapéuticos empleados (Cuadro 10). El 50% (10/20) de los aislamientos presentaron multidrogo resistencia (MDR), el total de los aislamientos MDR pertenecen a *S. Typhimurium* ST19 (Cuadro 11).

**Cuadro 9: Identificación bioquímica y resistencia de los 20 aislamientos de *Salmonella*.**

MUESTRA	IDENTIFICACIÓN	RESISTENCIA
524	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, NTF
142	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, NTF
938	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, AMP, NTF
986	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM
547	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, NTF
525	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, NTF
988	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO
145	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, NTF
921	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO
141	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, NTF
528	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM
413	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, AMP, A/S
990	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, NTF
1055	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO, AMP, A/S
523	<i>Salmonella serovariedad Gallinarum</i>	CFZ, AMK, GM, FOX
1065	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO
1092	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO
931	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM, TO
922	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM
123	<i>Salmonella enterica ssp. enterica</i>	CFZ, AMK, GM

CFZ: cefazolina, AMK: amikacina, GM: gentamicina, TO: tobramicina, AMP: ampicilina, NTF: nitrofurantoína, A/S: ampicilina/sulbactam y FOX: ceftioxitina



**Cuadro 10. Porcentaje de resistencia a quimioterapéuticos de los 20 aislamientos de *Salmonella* estudiados.**

QUIMIOTERAPÉUTICO	NÚMERO DE AISLAMIENTOS (N=20)	% DE RESISTENCIA
Cefazolina	20	100
Amikacina	20	100
Gentamicina	20	100
Tobramicina	14	70
Nitrofurantoína	7	35
Ampicilina	3	15
Ampicilina/sulbactam	2	10
Cefoxitina	1	5

**Cuadro 11. Relación entre perfil de resistencia y la ST de los 20 aislamientos de *Salmonella* estudiados.**

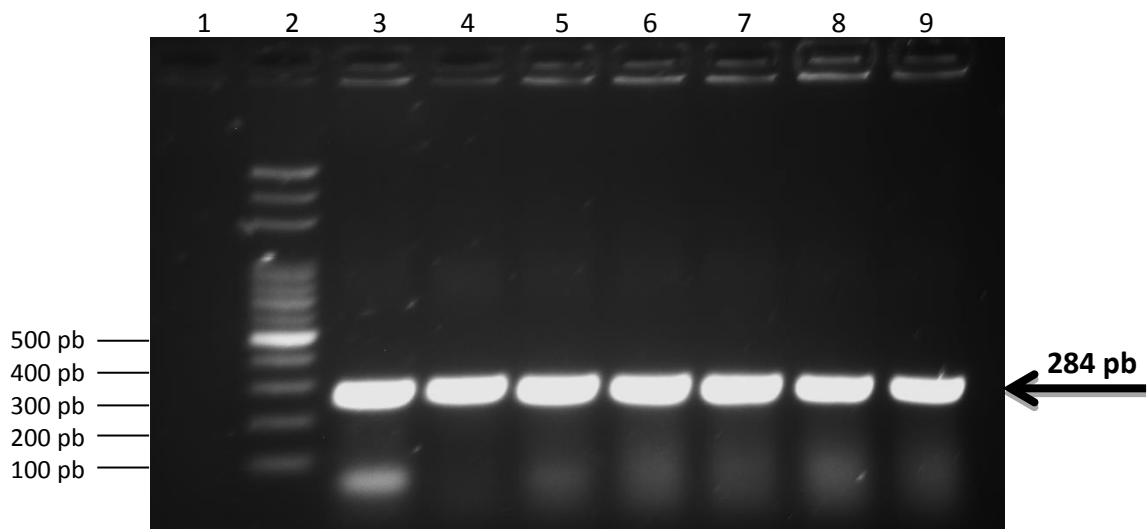
PERFIL DE RESISTENCIA	NÚMERO DE AISLAMIENTOS	ST
CFZ, AMK, GM, TO, NTF	7*	19(7)
CFZ, AMK, GM, TO	5	19(2), 83, 138, 139
CFZ, AMK, GM	4	19(2), 198, 2858
CFZ, AMK, GM, TO, AMP, A/S	2*	19(2)
CFZ, AMK, GM, AMP, NTF	1*	19(1)
CFZ, AMK, GM, FOX	1	78
Total	20	

CFZ: cefazolina, AMK: amikacina, GM: gentamicina, TO: tobramicina, AMP: ampicilina, NTF: nitrofurantoína, A/S: ampicilina/sulbactam y FOX: cefoxitina. ST 19: S. Typhimurium, ST 83: S.

Muenchen, ST 138: *S. Montevideo*, ST 139: *S. Choleraesuis*, ST 198: *S. Kentucky*, ST 2858: serotipo no definido, ST 78: *S. Gallinarum*. \* Aislamientos multidrogo resistente

### Identificación molecular

Se realizaron cultivos en TSA de los 20 aislamientos, bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Los cultivos puros fueron utilizados en las preparaciones de PCR punto final, de las cuales se obtuvieron productos de amplificación de 284 pb del gen *invA* (Figura 2). Por lo que se confirmó que los aislamientos de estudio pertenecen al género *Salmonella*.

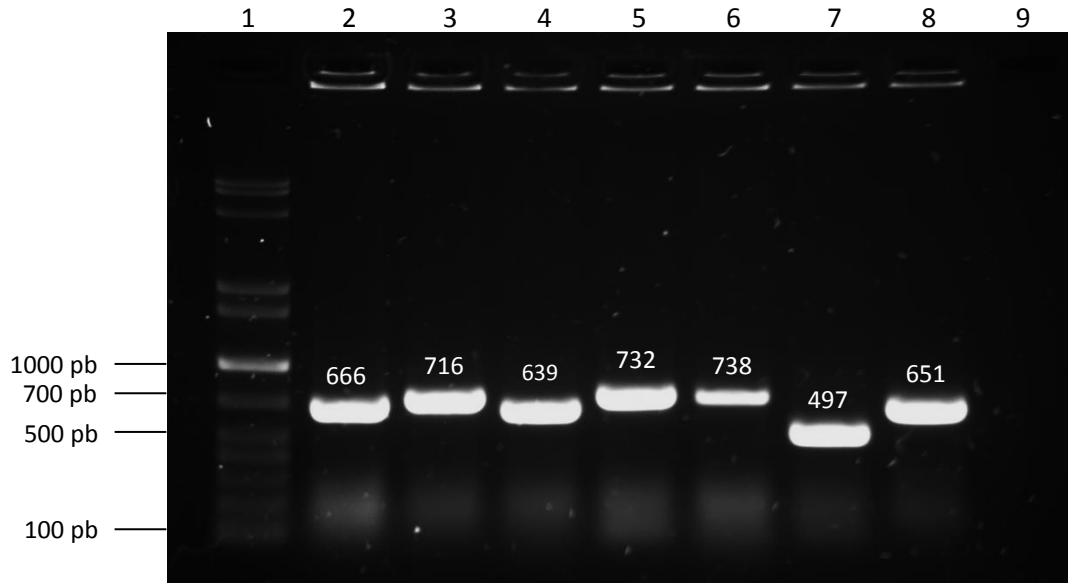


**Figura 2. Amplificación del fragmento del gen *invA*.** Gel de agarosa al 2% teñido con SyBr green safe DNA. Carril 1: control negativo, Carril 2: marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder, Carril 3: control positivo *S. Typhimurium*, Carriles 4-9: muestras de bovinos. La flecha indica el amplicón obtenido.

### Tipificación por secuencias multilocus (MLST)

Para caracterizar las muestras de *Salmonella* por MLST se utilizaron cultivos puros en TSA, los cuales se emplearon para preparar las reacciones de PCR punto final para amplificar el fragmento correspondiente a cada uno de los 7 genes usados como marcadores moleculares (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA*, y *thrA*). Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado para cada gen con la

finalidad de obtener la concentración necesaria requerida y posteriormente purificar los amplicones, se mezclaron en un mismo tubo los productos resultantes para cada gen (Figura 3).



**Figura 3. Amplificación de los siete genes utilizados en MLST de *Salmonella*.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con SyBr green safe DNA. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder, Carril 2: *hemD*, Carril 3: *dnaN*, Carril 4: *aroC*, Carril 5: *thrA*, Carril 6: *sucA*, Carril 7: *purE*, Carril 8: *hisD*, Carril 9: control negativo.

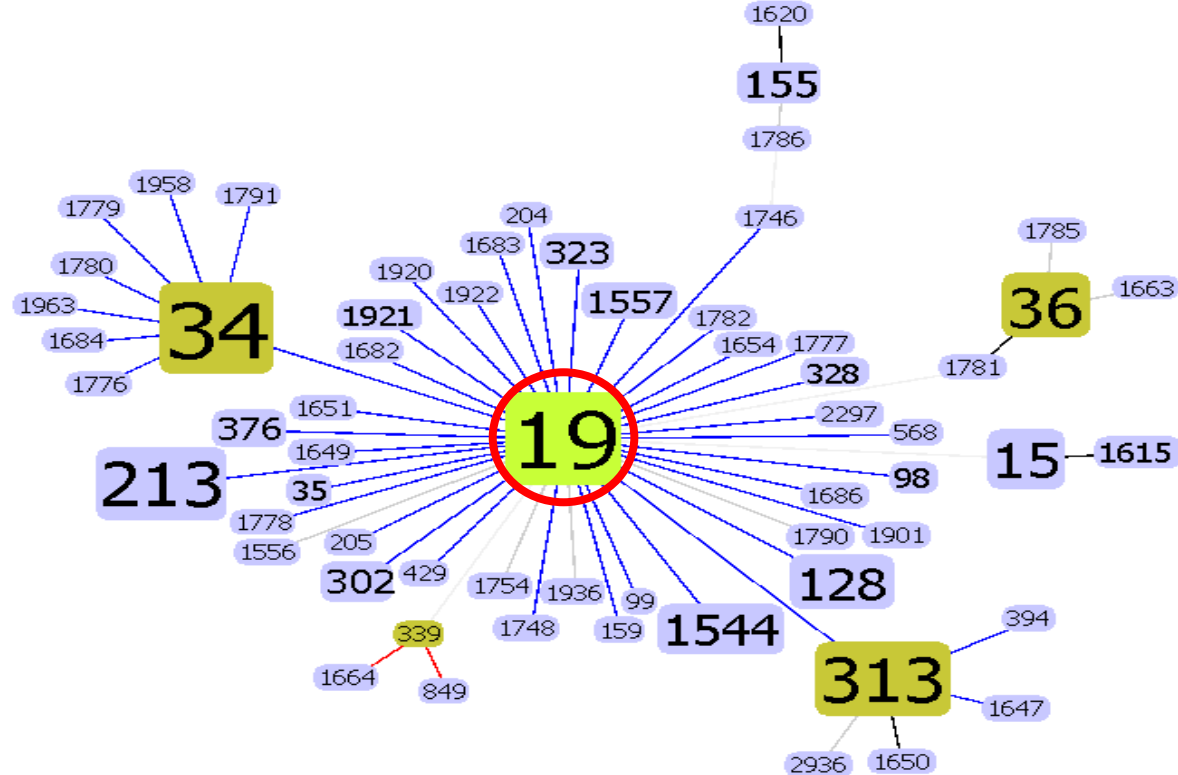
Los productos obtenidos se purificaron con el kit comercial QIAquick (Qiagen Ventura CA, USA), se enviaron a secuenciar en ambos sentidos mediante electroforesis capilar con el sistema BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem Foster City, CA, USA). Las secuencias obtenidas, correspondientes a los siete genes, se editaron utilizando el programa Vector NTI Advance 11.5, se alinearon con las secuencias de referencia reportadas en la base de datos de MLST para Las diferentes secuencias dentro del género *Salmonella* se asignan como distintos alelos, para cada aislado, el alelo de cada uno de los siete genes constitutivos define el perfil alélico y este da origen a la secuencia tipo. El perfil alélico y la secuencia tipo de las muestras se describen en el Cuadro 12, así como

el serotipo al cual se encuentran asociadas. De los 20 aislamientos identificados mediante MLST se obtuvieron siete STs diferentes: ST 19, 78, 83, 138, 139, 198 y 2858, asociadas a los serotipos: *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Muenchen*, *S. Montevideo*, *S. Choleraesuis*, *S. Kentucky* respectivamente. Sin embargo, ST 2858 no ha sido asociada con ningún serotipo. El 70% (14/20) de los aislados fueron *S. Typhimurium*, siendo el serotipo identificado con mayor frecuencia, en contraste con el resto de los serotipos, en los que se identificó un solo aislamiento de cada uno. Todos los grupos de dos o más STs que estaban conectados por identidad en seis de los siete fragmentos de genes se designaron como eBG (eBurstGroups). El programa utilizado para agrupar las STs dentro del eBGs correspondiente fue goeBURST. *S. Typhimurium* se agrupó dentro del eBG1 (Figura 4), resultando la ST19 el grupo fundador. El eBG4 se encuentra conformado, en su mayoría, por el serotipo Enteritidis, sin embargo, incluye un sub-linaje que consta de aislamientos múltiples de *S. Gallinarum* y *S. Gallinarum* var. Pullorum (Figura 5), *S. Muenchen* se encuentra dentro del eBG8, *S. Montevideo* se agrupó en los eBGs39 (Figura 6), 40 y 208, *S. Choleraesuis* conformó el eBG6, y *S. Kentucky* se encuentra dentro de tres eBGs, 15, 56, 164 (Figura 7).

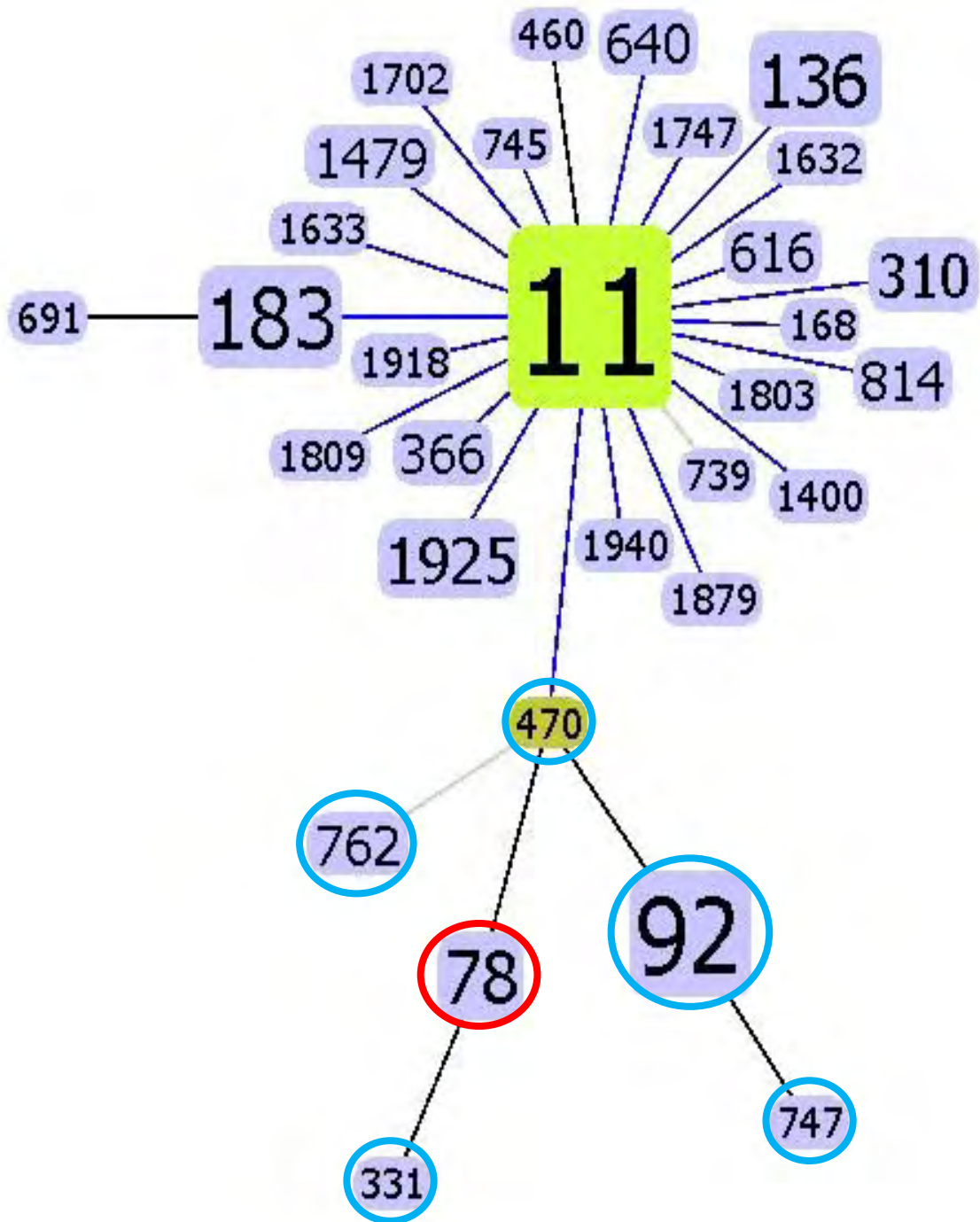
**Cuadro 12. Perfil alélico y ST obtenidos mediante MLST de los aislamientos 20 de *Salmonella*.**

MUESTRA	PERFIL ALÉLICO							ST	SEROTIPO
	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>		
524	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
142	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
938	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
96	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
547	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
525	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
988	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
145	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
921	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
141	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
528	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
413	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
990	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
1055	10	7	12	9	5	9	2	19	<i>S. Typhimurium</i>
1065	41	9	21	12	8	159	19	83	<i>S. Muenchen</i>
1092	11	41	55	42	34	58	4	138	<i>S. Montevideo</i>
931	36	31	57	14	26	34	8	139	<i>S. Choleraesuis</i>
523	5	2	42	7	31	6	11	78	<i>S. Gallinarum</i>
922	76	14	369	77	64	64	67	198	<i>S. Kentucky</i>
123	10	14	469	31	25	20	33	2858	* SND

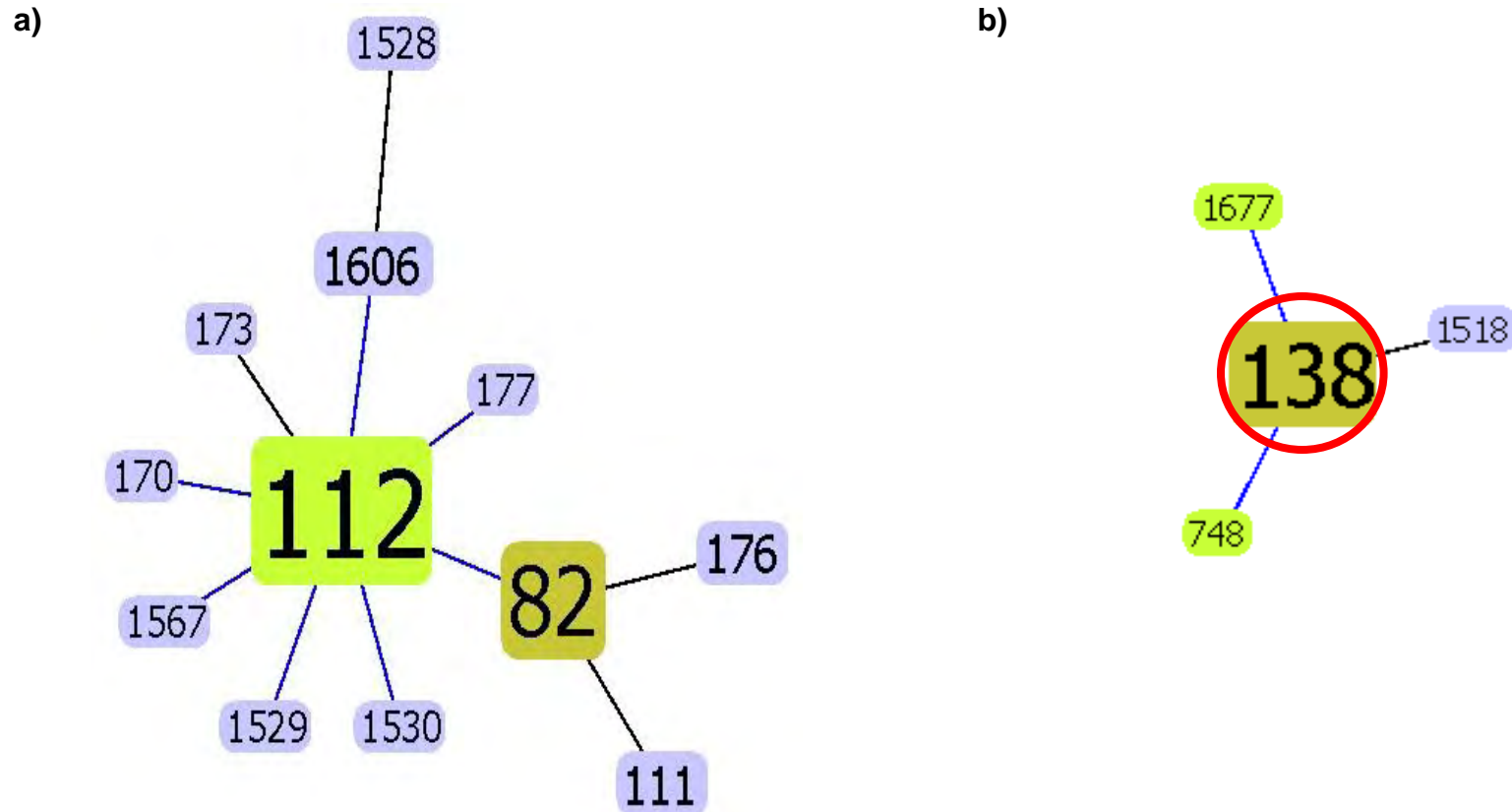
\*Serotipo no definido.



**Figura 4. Diagrama goeBURST para eBG1 que agrupa a *S. Typhimurium*.** Cada recuadro representa una ST, en verde claro se representa al grupo fundador, en amarillo al sub-grupo fundador y en azul los grupos comunes. La disposición topológica dentro del Árbol de Expansión Mínima (MSTree) utiliza enlaces secuenciales de distancia creciente (menos alelos compartidos), iniciando con las STs centrales conteniendo la mayor cantidad de aislados. Las STs con un locus variante (SLV) se dispersan en todo el MSTree próximos al ST que encontró con alelos compartidos. El MSTree muestra enlaces de siete a los idénticos (línea negra), de seis alelos idénticos (SLVs, línea azul), de cuatro alelos idénticos (TLVs, línea roja), de grupos formados a partir de DLVs (línea gris oscuro) y de grupos formados a partir de TLVs (línea gris claro).

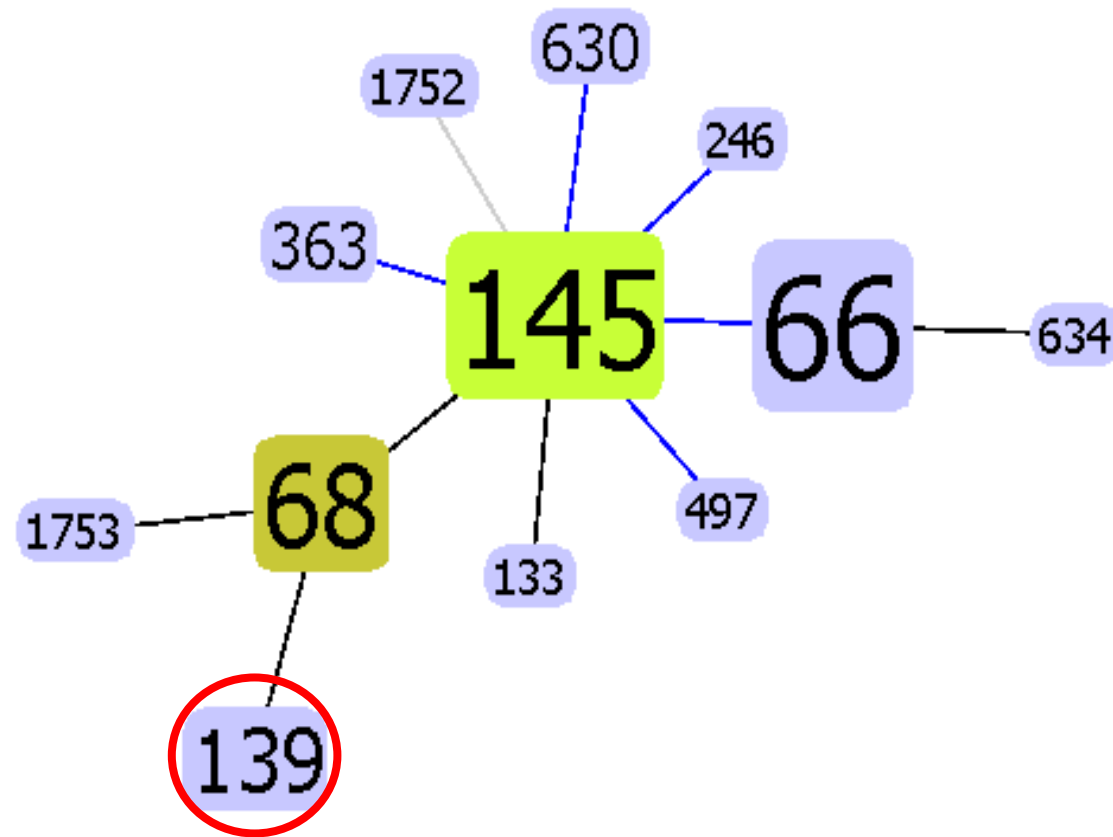


**Figura 5. Diagrama goeBURST del eBG4.** El MSTree representa la distribución del ST 78 (*S. Gallinarum*, círculo rojo) dentro del eBG4, el grupo fundador de este eBG es el ST 11 (*S. Enteritidis*, círculo azul). Además del ST 78, la ST 470 (sub-grupo) incluye cinco STs diferentes que de igual forma pertenecen al serotipo *Gallinarum*.



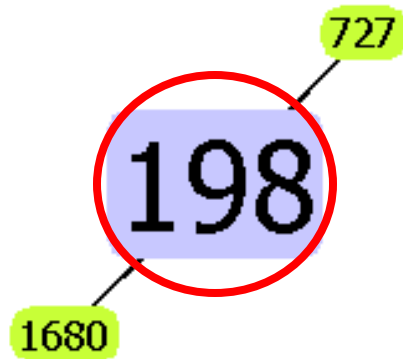
**Figura 6. Diagramas goeBURST representando a los serotipos *S. Muenchen* y *S. Montevideo* dentro de sus eBGs correspondientes. a) MSTree de la distribución del eBG8 conformado por 12 STs diferentes relacionados al serotipo Muenchen. b) En el eBG39 se agrupan cuatro STs diferentes asociados al serotipo Montevideo, la ST 138 (círculo rojo) que corresponde a nuestro aislado se encuentra como sub-grupo fundador y es la ST con mayor cantidad de muestras registradas en la base de datos de MLST para *S.***



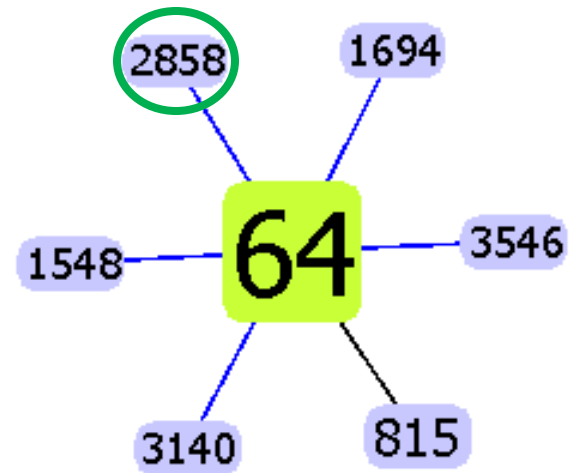


**Figura 7. Diagrama goeBURST que muestra el serotipo *S. Choleraesuis*.** El serotipo Choleraesuis se agrupa dentro del eBG6, tiene como grupo fundador al ST 145 y como sub-grupo fundador ST 68, nuestro aislado corresponde al ST 139 (círculo rojo) que se dispersa a partir del sub-grupo con seis alelos idénticos.

a)



b)



**Figura 8. Diagramas goeBURST de S. Kentucky y la ST2858.** a) El serotipo Kentucky se encuentra en tres eBGs (15, 56 y 164) diferentes, sin embargo, la ST 198 (círculo rojo) se agrupa dentro del eBG56, junto con las STs 727 y 1680. b) La ST 2858 (círculo verde) es serotipo no definido, sin embargo, al tener 6 alelos idénticos al ST64 (S. Anatum) fue posible agruparlo dentro del eBG65.

## DISCUSIÓN

Existen distintos métodos de identificación para el género *Salmonella*, los empleados comúnmente debido a su bajo costo, son los llamados métodos convencionales que utilizan medios de cultivo en placa, así como pruebas bioquímicas clásicas o comerciales, estos procedimientos requieren de mucho tiempo para poder realizar una identificación completa, en ocasiones ese tiempo puede ser de más de 5 días (Lee K. M., *et al.*, 2015; ISO, 2002). Los métodos convencionales han sido mejorados para reducir costos y mano de obra, y además ofrecer una detección e identificación más rápida. Un ejemplo son los medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos como el agar SM-ID, Agar Rambach y S. CHROMagar BBL, que utilizan un día menos que las pruebas bioquímicas (Alakomi H. L., and Saarela M., 2009; Maciorowski K. G., *et al.*, 2006; Manafi M., 2000; Perry J. D., and Freydière A. M., 2007). También se utilizan las pruebas bioquímicas miniatura (API20 20E), que se utiliza como uno de los métodos convencionales para para la identificación de *Enterobacteriaceae* con 86% de especificidad (Smith P. B., *et al.*, 1972; Nucera D. M., *et al.*, 2006; Holmes B., *et al.*, 1978). El sistema API 20E a su vez fue reemplazado por métodos semi automáticos, y pruebas serológicas (Chacón L. *et al.*, 2010). Los métodos convencionales se utilizan comúnmente para la identificación de aislamientos de *Salmonella* en clínicas u hospitales del sector salud para el diagnóstico tanto en humanos como en animales. En el presente trabajo se estudiaron 20 aislamientos de *Salmonella* spp., procedentes de recto de bovinos clínicamente sanos del estado de Veracruz, México.

Los aislamientos fueron identificados utilizando el sistema semi-automatizado Vitek 2, este procedimiento permitió la identificación del total de los aislamientos, la mayoría fue identificada como *S. enterica* spp., *entérica* (19/20 aislamientos), y un solo aislamiento como *S. serovariedad Gallinarum*. En ambientes hospitalarios a nivel veterinario y medicina humana, así como en la industria alimentaria, esta identificación permite la toma de decisiones para aplicar un tratamiento

antimicrobiano, retirar un producto alimenticio y tomar las medidas preventivas para el control del microorganismo.

Galán *et al.* (1991), han reportado que el grupo de genes *invABC* e *invD* son altamente conservados dentro de los diferentes serotipos que conforman al género *Salmonella*, son uno de los grupos que han utilizado el gen *invA* como blanco para la detección de *Salmonella*. En un estudio realizado para detectar el gen *invA* de *Salmonella* en Tailandia, Bishnu *et al* (2010), compararon métodos convencionales de cultivo con PCR punto final, utilizaron DNA a diferentes concentraciones y el gen *invA* como marcador y observaron que el producto se puede detectar a concentraciones tan bajas como 10 pg de DNA y  $10^4$  UFC/ml de *Salmonella*, mediante el ensayo de PCR obtuvieron mayor nivel de detección de *Salmonella* en comparación con los cultivos convencionales. Al igual que estos grupos de investigación, confirmamos que la identificación mediante PCR género específico es una herramienta poderosa, rápida y confiable para la detección de aislamientos de *Salmonella* spp. Se han investigado muchos genes como blanco para la detección específica de *Salmonella* spp., principalmente en muestras de alimentos y ambientales, sin embargo el más utilizado es el gen *invA*, además existe una recomendación a nivel internacional que antepone la detección de *Salmonella* spp., mediante la utilización de este gen como requisito para validar métodos moleculares para el diagnóstico de patógenos en alimento (Malorny *et al.*, 2004; Postollec *et al.*, 2011; González E. *et al.*, 2012; Sharon M. T. *et al.*, 2010; ISO/FDIS 20838, 2006; Salehi T. Z., *et al.*, 2005).

Hay situaciones en las que es suficiente conocer el género del agente causal para poder tomar medidas necesarias de control o tratamiento, sin embargo, para fines epidemiológicos es necesario hacer uso de métodos más discriminatorios que permitan identificar los serotipos en los que se subdivide *Salmonella*, esto se debe a que en la actualidad se han reportado más de ~3,000 serotipos que conforman a este género. Convencionalmente el serotipo de un aislamiento de *Salmonella* se

puede designar mediante serotipificación basado en el esquema Kauffmann-White. En 2010, Guibourdenche M., *et al.*, reportaron el esquema Kauffmann-White-Le Minor, el cual es una modificación del esquema original que se desarrolló en 1930, a pesar de que existen métodos moleculares para subdividir a *Salmonella* la serotipificación continúa siendo un método muy utilizado que con el paso del tiempo ha generado información en bases de datos epidemiológicos para la vigilancia de brotes locales de salmonelosis tanto en casos clínicos como de control en alimentos (Wattiau P., *et al.*, 2011). Dentro de sus desventajas se encuentran los costos elevados, necesita de al menos 20 días para la identificación, requiere experiencia, así como de numerosos anticuerpos producidos por inmunización de conejos, además no da información con respecto a la relación filogenética que existe dentro de los diferentes serotipos (*Salmonella* Subcommittee, 1934; Grimont P. A., Weill F. X., 2007).

En investigación epidemiológica, identificación y vigilancia de brotes de *Salmonella* se requiere del uso de métodos que tengan un nivel discriminatorio más específico que el alcanzado por serotipificación. En las últimas dos décadas han surgido métodos alternativos que pueden identificar con éxito el serotipo de una cepa de *Salmonella* utilizando DNA (Zou Q. H., *et al.*, 2016; Urwin R., and Maiden C. J., 2003). Achtman *et al.* (2012), realizaron un estudio utilizando el esquema de MLST basado en siete genes para reemplazar el método de serotipificación, y obtuvieron 1092 STs y 554 serotipos que conjuntaron en grupos genéticamente cercanos llamados eBGs, estos resultados los compararon con los obtenidos mediante serotipificación y observaron que a diferencia de este, MLST reconoce agrupaciones evolutivas resultando como una mejor alternativa para clasificar a *S. enterica*. Hay estudios en los que comparan el poder discriminatorio de distintos métodos de identificación para *Salmonella* dentro de los cuales destacan Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) y MLST, observan que el método de PFGE tiene nivel discriminatorio alto pero su poder discriminatorio se limita para aislamientos que provienen de un brote local y su base de datos

(PulseNet) no está disponible públicamente, mientras que MLST es un método fácil de interpretar además, permite realizar comparaciones entre laboratorios a nivel mundial, y los resultados son reproducibles. Ambos métodos son considerados como los estándares de oro debido a que permiten realizar de forma rápida la identificación y clasificación de *Salmonella* (Wattiau P., *et al.*, 2011; Torpdahl M., *et al.*, 2005; Shi C., *et al.*, 2015; Ranieri M., *et al.*, 2013; Harbottle H., *et al.* 2006).

En el presente estudio, la ST que predominó notablemente con 14 de 20 aislados fue ST19, asociada al serotipo Typhimurium, es el grupo fundador del eBG1 donde se agrupa con otras STs que son asociadas al mismo serotipo. Cabe mencionar que *S. Typhimurium* tiene 62 STs diferentes según los reportes realizados en la base de datos de MLST para *Salmonella*, por ejemplo, ST34, ST128, ST213, ST313, y ST1544. En México hay estudios que reportan de forma general la identificación del serotipo Typhimurium en bovinos, sin embargo se desconoce si la presencia de este serotipo es endémica en regiones específicas del país, en contraste en el Norte de Europa y en EE. UU., *S. Typhimurium* es endémica en bovinos (Gyles C. L., *et al.*, 4ª edición). Diferentes estudios comprueban que existen diferencias entre las distintos STs de *S. Typhimurium*, como el realizado por Carden S., *et al.* (2015), en el cual hicieron una comparación entre *S. Typhimurium* ST19 y ST313, y observaron que ST19 expresa niveles más altos de RNAm que codifican para la IPS-1 y el sistema efector del flagelo en comparación con ST313, esto explica que ST19 tiene mayor éxito en los procesos de invasión y activación del inflammasoma que ST313. La presencia de la ST19 se ha reportado en cerdos, en mariscos (agua marina), en aves silvestres, en aves de corral, en alimentos, en humanos y en bovinos (Antunes P., *et al.*, 2011; Boehm A. B., *et al.*, 2012; Hughes L. A., *et al.*, 2010; Parsons B. N., *et al.*, 2013; Eguale T., *et al.*, 2016; Gragg S. E., *et al.*, 2013). También se identificaron seis STs más, ST78 asociado a *S. Gallinarum* que se encuentra en el eBG4 siendo ST11 (*S. Enteritidis*) el grupo fundador de ese eBG donde además se encuentran los serotipos Dublin, Paratyphi

B y sus variantes serológicas. Si se sabe que *S. Gallinarum* es hospedero específico de aves de corral, ¿cómo se explica su presencia en uno de nuestros aislamientos? La gallinaza y pollinaza son parte de la alimentación de los bovinos, sin embargo este medio de contaminación lo podemos descartar porque *S. Gallinarum* se hubiera identificado en más de un aislamiento, este hallazgo puede deberse al paso de aves infectadas con *Salmonella* sobre la granja (Feng Y., *et al.*, 2013). ST139 se asocia al serotipo Choleraesuis presente en el eBG6 que agrupa a STs asociadas a este serotipo. Mientras que la mayoría de los serotipos de *Salmonella* tienen un amplio rango de hospederos, un pequeño grupo son hospedero-específico capaz de infectar y causar enfermedades en sólo una o algunas especies hospederas estrechamente relacionadas, por ejemplo serotipo Gallinarum consiste de dos biotipos, Gallinarum y Pullorum, que causan dos estados patológicos distintos en aves de corral, la fiebre tifoidea y la enfermedad pullorum respectivamente, el serotipo Choleraesuis es hospedero-específico de cerdos en los que puede provocar enfermedades sistémicas en forma de septicemia con una alta mortalidad en cerdos jóvenes. En 2015, Matthews *et al.*, realizaron una comparación genómica de tres serotipos de *Salmonella* estrechamente relacionados Enteritidis, Dublin y Gallinarum, en sus resultados observan que estos serotipos evolucionan adquiriendo nuevos genes por transferencia horizontal y la formación de pseudogenes, además pierden genes necesarios para el estilo de vida gastrointestinal que los conduce a adoptar un estilo de vida sistémico y la exclusión de nichos en los serotipos hospedero-específico. Los reportes de Matthews pueden explicar el haber identificado STs asociadas a serotipos hospedero específico como *S. Choleraesuis* y *S. Gallinarum*, o los bovinos pueden estar participando como hospederos accidentales sin presentar signos clínicos de enfermedad (Rossignol A., *et al.*, 2014). ST83 se asocia al serotipo Muenchen, el eBG8 está conformado únicamente por este serotipo, sin embargo ST83 no se encuentra dentro de ningún eBG en la base de datos de MLST para *Salmonella*. La ST138 se encuentra en el eBG39 que agrupa a 4 STs diferentes asociadas al serotipo

Montevideo. La ST198 es asociada al serotipo Kentucky, este serotipo se encuentra agrupado en tres eBGs diferentes eBG15, eBG56 y eBG164, ST198 se encuentra específicamente en el eBG56. La presencia de estos tres serotipos, al igual que *S. Typhimurium*, se ha reportado en estudios previos realizados en México de muestras provenientes de humanos, alimentos, carne cruda de pollo, cerdo y res, y en rastros municipales (Diaz E. C., *et al.*, 2013; Mussaret B. Z., *et al.*, 2007; Hernandez G. C., *et al.*, 2007; Alaniz R., *et al.*, 1996; Cogco L. G., *et al.*, 2000). A pesar que el esquema de MLST utilizado brinda mejor definición en comparación con el método de serotipificación, también presenta algunas limitantes, por ejemplo, se identificó la ST2858 que a diferencia de las STs anteriormente mencionadas es serotipo no identificado, es decir, que no fue posible conocer a qué especie de *Salmonella* se encuentra asociada, tampoco fue posible encontrar reportes que brinden mayor información sobre esta ST, sin embargo, observamos que seis de sus siete alelos son idénticos con la ST64 que se encuentra asociado a *S. Anatum*, grupo fundador del eBG65 en el cual agrupamos a ST2858.

En particular, los aislamientos presentaron resistencia a: cefazolina, amikacina y gentamicina en el 100% (20/20) de los aislados, a tobramicina en el 70% (14/20), a nitrofurantoína en el 35% (7/20), a ampicilina en el 15% (3/20), y ampicilina/sulbactam y cefoxitina menos del 11% (2/20 y 1/20 respectivamente). Los resultados de resistencia obtenidos en este estudio son diferentes a los reportados en otros trabajos realizados en México, en los cuales los aislamientos provienen principalmente de alimentos de origen animal y de humanos (Diaz E. C., *et al.*, 2013; Mussaret B. Z., *et al.*, 2006; 2008; 2012). Miranda J. M., *et al.* (2009), reporta la siguiente resistencia, ampicilina (66.7%), tetraciclina (61.3%), cloranfenicol (64.5%) y gentamicina (3.2%), la resistencia que se obtuvo en ampicilina fue menor (15%) a la obtenida por el grupo de Miranda (66.7%), y por el contrario en el presente estudio se obtuvo mayor resistencia en gentamicina (100%) que la que reportaron en ese estudio (3.2%). Con base en los resultados



de resistencia obtenidos, se clasificaron como MDR los aislamientos que presentaron resistencia a tres o más grupos diferentes de quimioterapéuticos. Distintos estudios reportan la diseminación de aislamientos de *Salmonella* MDR. Antunes *et al.* (2010), describen la emergencia de plásmidos en aislamientos de *S. Typhimurium* ST19 convirtiéndolas en clonas MDR. Este reporte concuerda con los obtenidos en los ensayos de MIC, donde el 50% (10/20) de los aislados fueron MDR, además es interesante mencionar que los 10 aislados MDR pertenecen a *S. Typhimurium* ST19 exponiendo tres perfiles de resistencia diferentes: cefazolina, amikacina, gentamicina, tobramicina y nitrofurantoína (7/20), cefazolina, amikacina, gentamicina, tobramicina, ampicilina y ampicilina/sulbactam (2/20), y cefazolina, amikacina, gentamicina, ampicilina y nitrofurantoína (1/20). Winokur P. L., *et al.* (2000), reportaron resultados similares, analizaron 10 aislamientos de *Salmonella* obtenidas de humanos y animales con MDR y resistencia a cefalosporinas, encontraron la expresión del gen CMY-2 puede ser la responsable de esta resistencia, sin embargo en el análisis cromosomal de DNA obtuvieron 8 patrones diferentes por lo que una diseminación clonal no explica la distribución de esta resistencia (Carattoli A., *et al.*, 2002). Los reportes de un estudio realizado en Europa, sugieren que hay una relación entre los quimioterapéuticos más utilizados en animales para tratar mastitis, diarreas e infecciones uterina (penicilinas, aminoglucósidos y cefalosporinas), con la emergencia de aislamientos de *Salmonella* MDR (Briyne N., *et al.*, 2014). Un estudio realizado en México reporta a un gen como responsable de la MDR en *Salmonella*, Mussaret B. Z., *et al.* (2006) reportaron la diseminación de una cepa MDR de *Salmonella* Typhimurium, estudiaron la expresión del gen CMY-2 en ST19 y ST213, sin embargo esta expresión fue encontrada únicamente en la ST213 (Diaz E. C., *et al.*, 2013; Montaña J. P., *et al.*, 2012). En México, la teoría con la práctica son muy distintas, el poder contar con información verídica relacionada con el uso de quimioterapéuticos puede ayudar a relacionar estudios de resistencia, que en conjunto sirvan para tomar conciencia del uso de los quimioterapéuticos.

## CONCLUSIÓN

El sistema semi automatizado VITEK 2 permitió la identificación de 19 aislamientos *S. enterica* ssp., *enterica* y un aislamiento como *S.* serovariedad Gallinarum, así como el perfil de resistencia donde se observó que cefazolina, amikacina, gentamicina, tobramicina y nitrofurantoína fue el más frecuente presentado por siete aislamientos y corresponden a *Salmonella* Typhimurium ST19. 10 aislamientos MDR fueron *Salmonella* Typhimurium ST19.

La identificación molecular mediante el gen *invA* permitió comprobar que los aislamientos pertenecían al género *Salmonella*.

El esquema de MLST de siete genes logró determinar serotipo a cada uno de los aislamientos, seis STs y sus serotipos asociados, ST19 (*S.* Typhimurium), ST78 (*S.* Gallinarum), ST83 (*S.* Muenchen), ST138 (*S.* Montevideo), ST139 (*S.* Choleraesuis), ST198 (*S.* Kentucky). Se obtuvo una ST serotipo no definido ST2858. La ST más prevalente con 14 de 20 aislamientos fue ST19.

Se identificaron dos serotipos hospedero específico, *S.* Gallinarum (aves de corral) y *S.* Choleraesuis (cerdos).

**REFERENCIAS**

1. Mussaret B. Z., *et al.* (2012). Burden and transmission of zoonotic foodborne disease in a rural community in Mexico. *Microbiology Research Laboratory*, vol. 55(1), pp. 51-60.
2. Mussaret B. Z., *et al.* (2008). Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14(3).
3. Cummings K. J., *et al.* (2010). The effect of clinical outbreaks of salmonellosis on the prevalence of fecal *Salmonella* shedding among dairy cattle in New York. *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 7(7).
4. Figueroa O. I., y Verdugo R. A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, vol. 47(1-2), pp. 25-42.
5. Mussaret B. Z., *et al.* (2006). Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 42, pp. 21-8.
6. Mussaret B. Z., *et al.* (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, vol. 48, (2), pp. 121-125.
7. Torpdahl M, *et al.*, (2005). Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulse-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods*, vol. 63(2), pp. 173-184.
8. Montaña P. J., *et al.*, (2012). Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco state, Mexico. *J food Prot*, vol. 75(5), pp. 867-73.
9. Pierre W, *et al.*, (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77(22), pp. 7877-7885.
10. Acha P. N., *et al.*, (2001). Zoonoses and communicable Diseases common to man and animals. PAHO Scientific and Technical Publications, no. 580.

11. Faura A. C., *et al.*, (2008). La *Salmonella*, de la actualidad desde siempre. Real escuela de avicultura, Laboratorios Calier, 1ª Edición.
12. Achtman M., *et al.*, (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathog 8(6): e1002776.
13. Lampel K. A., *et al.* Bad bug book: foodborne pathogenic toxins handbook. FDA, 2<sup>nd</sup> Edición, pp. 12-16.
14. Oyarzabal O. A., and Backert S. (2012). Microbial food safety: an introduction. Springer, pp. 15 y 16.
15. Toldrá F. (2009). Safety of meat and processed meat. Springer, pp. 5 y 6.
16. Gyles C. L., *et al.*, (2010). Pathogenesis of bacterial infections in animals. Wiley-Blackwell, 4<sup>th</sup> Edition, pp. 232.
17. Majowicz S. E., *et al.*, (2010). The global Burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis, vol. 50, pp.882-889.
18. World Health Organization (2013). Diarrhoeal disease. Fact sheet No. 330. <http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs330/en/index.html>. Acceso Marzo 2016.
19. Scallan E., *et al.*, (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogenes. Emerg Infect Dis, vol. 17, pp. 7-15.
20. Center for Disease Control and Prevention (2011). CDC stimates of foodborne illness in the United States. [http://www.cdc.gov/food-burden/PDFs/FACTSHEET\\_A\\_FINDINGS\\_updated4-13.pdf](http://www.cdc.gov/food-burden/PDFs/FACTSHEET_A_FINDINGS_updated4-13.pdf). Acceso Marzo 2016.
21. U. S. Department of Health and Human Services (2011). National statistics on intestinal infections. <http://hcupnet.ahrq.gov/HCUPnet.jsp>. Acceso Marzo 2016.
22. Gallagher B. G., *et al.*, (2003). Seasonal prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. J Food Prot, vol. 6, pp. 1978-1986.
23. Loneragan G. H., and Brashears M. M., (2005). Effects of using retention-pond water for dust abatement on performance of feedlot steers and

carriage of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. J Am Vet Med Assoc, vol. 226, pp. 1378-1383.

24. Harhay B. D., *et al.*, (2008). *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 contaminations on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: An evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. Appl Environ Microbiol, vol.74, pp. 6289-6297.
25. Guo C, *et al.*, (2011). Application of Bayesian techniques to model the burden of human salmonellosis attributable to U.S. food commodities at the point of processing: Adaptation of a Danish model. Foodborne Pathog Dis, vol. 8, pp. 509-516.
26. Loneragan G. H., *et al.*, (2012). *Salmonella* diversity and burden in cows on and culled from dairy farms in the Texas high plains. Foodborne Pathog Dis, vol. 9.
27. Bosilevac J. M., *et al.*, (2009). Prevalence and characterization of *Salmonella* in commercial ground beef in the United States. Appl Environ Microbiol 2009; 75:1892-1900.
28. Gragg S. E., *et al.*, (2013). Cross-sectional study examining *Salmonella enterica* carriage in subiliac lymph nodes of cull and feedlot cattle at harvest. Foodborne Pathog Dis, vol. 10(4), pp. 368-374.
29. Coburn B., *et al.*, (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. Immunol Cell Biol, vol. 85, pp. 112-118.
30. Clements M., *et al.* (2001). Virulence genes regulation in *Salmonella enterica*. Ann Med, vol. 33, pp. 178-185.
31. Brian S. G., (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. Current Opinion in Microbiology, vol. 2, pp. 312-316.
32. Mark E. C., and Spratt Brian G. (1999). Multilocus sequence typing. Trends in Microbiology, vol. 7(12), pp. 482-487.

33. Swaminathan B., *et al.* (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*, vol. 7, pp. 382-389.
34. Paul V. (2011). Multilocus sequence determination and analysis. *Methods in Microbiology*, vol. 38, pp.385-407.
35. David A. M., and Spratt Brian G. (2005). The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*, vol. 33, pp. 728-733.
36. Mamuka K., *et al.*, (2002). Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *Journal Clinical Microbiology*, vol. 40(5), pp. 1626-1635.
37. Cooper J. E., and Feil E. J. (2004). Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends in Microbiology*, vol. 12(8), pp. 373-377.
38. Urwin R., and Maiden M. C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology*, vol. 11(10), pp. 479-487.
39. Turner M. E., and Feil E. J. (2007). The secret life of the multilocus sequence type. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 29, pp. 129-135.
40. Qing H. Z., *et al.*, (2013). Identification of genes to differentiate closely related *Salmonella* lineages. *PLoS ONE*, vol. 8(2), pp. 1-8.
41. Cooper J. E., and Feil E. J. (2004). Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends Microbiol*, vol. 12(8), pp. 373-377.
42. Aanensen D. M., *et al.*, (2005). The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*, vol. 33, pp. 728-733.
43. Wisner M., *et al.* (2009). Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiology*, vol. 9(31), pp. 1-15.
44. Mussaret B. Z., *et al.*, (2013). Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatán, Mexico. *Front Microbiol*, vol. 4, pp. 1-10.

45. Galán J. E., *et al.*, (2001). *Salmonella* interactions with host cells: Type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 17, pp. 53-86.
46. Gopinath S., *et al.*, (2012). Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends in Microbiology*, vol. 20(7), pp. 320-327.
47. Rhan K., *et al.*, (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes*, vol. 6(4), pp. 271-279.
48. Kidgell C., *et al.*, (2002). *Salmonella* Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 2, pp. 39-45.
49. Bell R. L., *et al.*, (2016). Recent and emerging innovation in *Salmonella* detection: a food and environmental perspective. *Microbial Biotechnology*, vol. 9, pp. 279-292.
50. Lee K. M., *et al.*, (2015). Reviews of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency responses and food safety. *Food Control*, vol. 47, pp. 264-276.
51. ISO (2002). ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
52. Alakomi H. L., and Saarela M. (2009). *Salmonella* importance and Current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops Food*, vol. 1, pp. 142-152.
53. Maciorowski K. G., *et al.* (2006). Cultural and immunological detection of *Salmonella* spp. In animal feeds—a review. *Veterinary Research Communication*, vol. 30, pp. 127-137.
54. Manafi M. (2000). New development in Chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 103, pp. 205-218.
55. Perry J. D., Freydière A. M. (2007). The Application of chromogenic media in clinical Microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 103, pp. 2046-2055.

56. Smith P. B., *et al.* (1972). API System a multitube micromethod for identification of *Enterobacteriaceae*. *Applied Microbiology*, vol. 2(3), pp. 449-452.
57. Nucera D. M., *et al.* (2006). Comparison of API 20E and *invA* PCR for identification of *Salmonella enterica* isolates from swine production units. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 4(9), pp. 3388-3390.
58. Holmes B., *et al.* (1978). Identification of *Enterobacteriaceae* by the API 20E system. *Journal of Clinical Pathology*, vol. 31, pp. 22-30.
59. Chacón L., *et al.* (2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* spp. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 30, pp. 18-23.
60. Galán J. E., *et al.* (1991). Distribution of the *invA*, *-B*, *-C* and *-D* genes of *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella* Typhi are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immunol*, vol. 59, pp. 2901-2908.
61. Bishnu P. U., *et al.*, (2010). Detection of *Salmonella invA* gene in shrimp enrichment culture by polymerase chain reaction. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, vol. 41(2), pp. 426-435.
62. Malorny B., *et al.* (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microbiol*, vol. 69, pp. 290-296.
63. Postollec F., *et al.* (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) Application is in food Microbiology. *Food Microbiol*, vol. 28, pp. 848-861.
64. Gonzalez E., *et al.* (2012). Development and evaluation of multiplex real-time PCR (qPCR) assay targeting. RSBCA locus and *invA* gene for accurate detection of *Salmonella* spp. In fresh produce and eggs. *Food Res Int*, vol. 48, pp. 202-208.
65. Sharon M. T., *et al.* (2010). Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 4(3), pp. 1-9.



66. ISO/FDIS 20838 (2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs—Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens—requirements for Amplification and detection of qualitative methods.
67. Salehi T. Z., *et al.* (2005). Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. International Journal of Poultry Science, vol. 4(8), pp. 557-559.
68. Guibourdenche M., *et al.* (2010). Supplement 2003-2007(no. 47) to the Withe-Kauffman-Le Minor scheme. Res Microbiology, vol. 161, pp. 26-29.
69. Wattiau P., *et al.* (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* subtyping: gold standards and alternatives. Applied and Environmental Microbiology, vol. 2(22), pp. 7877-7885.
70. *Salmonella* Subcommittee: the genus *Salmonella* Lignières 1900. J Hyg, vol. 34, pp. 333-350.
71. Grimont P. A., and Weill F. X. (2007). Antigenic formulae of the *salmonella* serovars. Institut Pasteur and WHO Collaborating centre for reference and Research on *Salmonella*, Paris, France.
72. Zhoë Q. H., *et al.* (2016). Genotyping of *Salmonella* with lineage-specific genes: correlation with serotyping. International Journal of Infectious Diseases, vol. 49, pp. 134-140.
73. Torpdahl M., *et al.* (2005). Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. Journal of Microbiological Methods, vol. 63, pp. 173- 184.
74. Shi C., *et al.* (2015). Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. Critical Reviews in Microbiology, vol. 41(3), pp. 309-325.
75. Ranieri M. L., *et al.* (2013). Comparison of typing methods with new procedure base on sequence Characterization for *Salmonella* serovar prediction. Journal of Clinical Microbiology, vol. 51(6), pp. 1786-1797.

76. Harbottle H., *et al.* (2006). Comparison of multilocus sequence typing, pulse-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serovar Newport isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44(7), pp. 2449-2457.
77. Antunes P., *et al.* (2011). Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. *J Antimicrob Chemother*, vol. 66, pp. 2028-2032.
78. Boehm A. B., *et al.* (2012). Solar inactivation of four *Salmonella* serovars in fresh and marine water. *Journal of Water and Health*, vol. 10(4), pp. 504-510.
79. Hughes L. A., *et al.* (2010). Multi-locus sequence typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from wild birds in Northern England suggest host-adapted strain. *Applied Microbiology*, vol. 51, pp. 477-479.
80. Parson B. N., *et al.* (2013). Invasive non-typhoidal *Salmonella* Typhimurium ST313 are non-host-restricted and have an invasive phenotype in experimentally infected chickens. *PLoS Neglect Trop D*, vol. 7(10), pp.1-8.
81. Eguale T., *et al.* (2016). Fecal prevalence phenotype distribution and antimicrobial resistance of *Salmonella* in dairy cattle, in central Ethiopia. *BMC Microbiology*, vol. 16(20), pp. 1-11.
82. Gragg S. E., *et al.* (2013). Substantial within-animal diversity of *Salmonella* isolates from lymph nodes, feces and hides of cattle at slaughter. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79(15), pp. 4744-4750.
83. Feng Y., *et al.* (2013). Genomic comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: differential pseudogene formation under common host restriction. *PLoS ONE*, vol. 8(3), pp. 1-6.
84. Diaz E. C., *et al.* (2013). Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail store in Jalisco State, Mexico. *Journal of Food Protection*, vol. 76(12), pp. 2004-2010.

85. Mussaret B. Z., *et al.* (2007). Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla<sub>CMY-2</sub>* *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 60, pp. 398-401.
86. Hernandez G. C., *et al.* (2007). Prevalencia de *Salmonella* sp en alimentos en el estado de Tamaulipas durante el año 2005. *Revista de Investigación Clínica*, vol. 59(6), pp. 437-443.
87. Alaniz R. *et al.* (1996). Resistencia a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de fuentes de animales. *Vet Mex*, vol. 28(3), pp. 215-220.
88. Cogco L. G., *et al.* (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en Mexico. *Salud Pública de México*, vol. 42(6), pp. 490-495.
89. Winokur P. L., *et al.* (2000). Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC  $\beta$ -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 4(10), pp. 2777-2783.
90. Carattoli A., *et al.* (2002). Characterization of plasmid carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolates in United States between 1996 and 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 46(5), pp. 1269-1272.
91. Briyne N., *et al.* (2014). Antibiotics used most commonly to treat animal in Europe. *Veterinary Record*, vol. 175(13), 1-9.