



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

Licenciatura en Bioquímica

Tesina de Grado

***Evaluación de métodos moleculares
como reemplazo para la serotipificación
clásica de Salmonella enterica***

Julieta Bisio

4.595.935-7

Tutora: Dra. Laura Betancor

Julio, 2017 – Montevideo, Uruguay

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi familia, por creer en mí y apoyarme a lo largo de toda la carrera.

A mi tutora, Laura, por aceptarme como estudiante, por su capacidad de transmitirme conocimientos y, sobre todo por su paciencia, horas de dedicación y todas las oportunidades brindadas.

Al Dr. Alejandro Chabalgoity por recibirme en el laboratorio y a todos los compañeros del Depto. de Desarrollo Biotecnológico por su ayuda y por todos los momentos compartidos.

A los compañeros del Departamento de Bacteriología y Virología por su ayuda en la realización de varias técnicas, así como por brindarnos algunas cepas necesarias para este trabajo.

A la Dra. Lorena Soletto del Centro Nacional de Enfermedades Tropicales de Bolivia por brindarnos la colección de cepas necesarias para realizar este trabajo.

A la red CYTED SALMOIBER, en el marco de la cual realizamos este trabajo y posibilitó el intercambio de cepas.

A la CSIC, UdelaR, programa Grupos de Investigación “*Salmonella* como patógeno transmitido por alimentos: epidemiología, patogénesis y prevención”, que dio un marco a la realización de este trabajo.

Y, por último, pero no menos importante, a mis amigos de toda la vida por estar siempre y a mis amigos de la carrera, por hacer de la misma una de las experiencias más lindas.

RESUMEN

Salmonella enterica es una de las principales causas de enfermedad transmitida por alimentos a nivel mundial, existiendo 1586 serotipos diferentes. Estos serotipos se determinan en base a las distintas combinaciones de 67 antígenos O (somáticos) y 114 antígenos H (flagelares de primer y segunda fase).

Clásicamente la tipificación de *Salmonella* se realiza mediante técnicas de aglutinación con anticuerpos, lo cual no solamente resulta caro, sino que también requiere una gran cantidad de tiempo y personal entrenado. Como alternativa se han propuesto métodos moleculares que, basándose en la secuencia de ADN, permiten una tipificación de *Salmonella enterica* comparable a la serotipificación.

En este trabajo realizamos la tipificación de una colección de 58 cepas de *Salmonella* de origen humano y alimentario obtenidas en Bolivia entre 2008 y 2016, y comparamos los resultados obtenidos por el método clásico y por un método basado en 3 PCR múltiples que, mediante la amplificación de regiones variables de genes del complejo *rfb*, *fliC* y *fljB*, permiten la determinación de 5 antígenos somáticos, 8 antígenos flagelares de primera fase y 7 de segunda fase, respectivamente. Se analizó, además, la secuencia del gen *fliC* para completar la asignación de serovar cuando fue

necesario y, por otra parte, se analizó algunos alelos de MLST para un conjunto de cepas seleccionadas.

Los métodos de PCR permitieron la completa caracterización de 36 cepas de 9 serovares distintos. Al combinarlos con la secuenciación del gen *fliC*, se alcanzó la identificación de 15 serovares y un total de 54 cepas, y, analizando la secuencia de algunos alelos de MLST fue posible completar la caracterización de las 4 cepas restantes. Estos resultados fueron validados mediante técnicas serológicas.

Con la combinación de resultados obtenidos por los distintos métodos se logró identificar las 58 cepas, de las cuales 56 corresponden a 17 serovares diferentes dentro de la subespecie *enterica*, y 2 a la subespecie *diarizonae*.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Agradecimientos | 2 |
| Resumen..... | 3 |
| ÍNDICE | 5 |
| 1. Introducción | 7 |
| 1.1. Taxonomía y epidemiología del género Salmonella | 7 |
| 1.2. Antígenos somáticos y flagelares | 10 |
| 1.2.1. Antígenos somáticos | 12 |
| 1.2.2. Antígenos Flagelares | 16 |
| 1.3. Serotipificación clásica | 21 |
| 1.4. Métodos moleculares de tipificación | 23 |
| 1.4.1. Métodos de tipificación basados en PCR | 23 |
| 1.4.2. Secuenciación del gen fliC | 26 |
| 1.4.3. Multi-locus Sequence Typing (MLST) | 26 |
| 2. Objetivos | 29 |
| 2.1. Objetivo general..... | 29 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 29 |
| 3. Materiales y métodos | 30 |
| 3.1. Cepas de trabajo | 30 |
| 3.2. Medios de cultivo..... | 30 |
| 3.3. Serología..... | 32 |
| 3.3.1. Detección de antígenos somáticos..... | 32 |
| 3.3.2. Detección de antígenos flagelares | 33 |
| 3.4. Pruebas bioquímicas | 33 |
| 3.5. Selección de controles por PCR in-silico..... | 34 |
| 3.6. Análisis de secuencias | 35 |
| 3.7. Extracción de ADN..... | 35 |

| | |
|---|----|
| 3.8. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) | 36 |
| 3.8.1. PCR inv-A para identificación de Salmonella sp. | 36 |
| 3.8.2. PCR múltiple para identificar tipos somáticos | 36 |
| 3.8.3. PCR múltiple para identificar tipos flagelares de fase I..... | 37 |
| 3.8.4. PCR múltiple para identificar tipos flagelares de fase II..... | 38 |
| 3.8.5. PCR para amplificar el gen fliC | 41 |
| 3.9. Secuenciación y análisis de la secuencia del gen fliC | 41 |
| 3.10. MLST..... | 42 |
| 3.11. Visualización de los productos de PCR..... | 43 |
| 4. Resultados y Discusión | 45 |
| 4.1. PCR in silico y selección de controles..... | 45 |
| 4.1.1. Evaluación in silico de primers para detección de tipos somáticos | 46 |
| 4.1.2. Evaluación in silico de primers para detección de tipos flagelares..... | 50 |
| 4.2. Puesta a punto de las reacciones de PCR múltiples..... | 53 |
| 4.2.1. PCR múltiple para identificar tipos somáticos | 53 |
| 4.2.2. PCR múltiple para identificar tipos flagelares fase I..... | 55 |
| 4.2.3. PCR múltiple para identificar tipos flagelares de fase II..... | 57 |
| 4.3. Serotipificación de la colección de cepas bolivianas por el método basado en 3 PCR múltiples..... | 61 |
| 4.4. Amplificación y secuenciación del gen fliC..... | 64 |
| 4.5. Serología..... | 70 |
| 4.6. Pruebas bioquímicas | 73 |
| 4.7. MLST..... | 75 |
| 5. Discusión General Y Conclusiones..... | 81 |
| 6. Perspectivas | 86 |
| 7. Referencias..... | 88 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Taxonomía y epidemiología del género *Salmonella*

Salmonella es un género de bacterias que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, formado por bacilos Gram negativos no exigentes. En su gran mayoría son móviles con flagelos de distribución peritrica, y, al igual que las demás enterobacterias son anaerobios facultativos.

El género *Salmonella* se divide en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, comprendidas por 2637 y 22 serovariedades, respectivamente. *Salmonella enterica*, a su vez se divide en 6 subespecies: *S. enterica* subesp. *Enterica* (I), *S. enterica* subesp. *Salamae* (II), *S. enterica* subesp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subesp. *díarizonae* (IIIb), *S. enterica* subesp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subesp. *indica* (VI) (Fig. 1) ¹⁻³. Inicialmente, *S. bongori* fue descrita como la subespecie V, pero estudios subsecuentes demostraron que era suficientemente diferente como para ser considerada una especie distinta ⁴. La diferenciación entre las distintas subespecies se logra mediante distintas pruebas bioquímicas. Esta clasificación ha sido confirmada por multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) y por análisis de secuencias de genes housekeeping ⁵⁻⁸.

Los siete miembros principales del género *Salmonella* se subtipifican mediante métodos serológicos basados en la identidad de tres tipos de

antígenos: O, H, y Vi, lo que permite llegar a su clasificación en serovariedades. El esquema de Kauffmann-White-Le Minor (KW) es usado por la mayoría de los laboratorios para la caracterización de aislamientos de *Salmonella*. Un serotipo de *Salmonella* se determina en base a los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). El antígeno O determina el serogrupo, mientras que los antígenos H completan la definición del serovar o serotipo de un aislamiento de *Salmonella*¹.

S. enterica subesp. *enterica* representa el grupo con mayor cantidad de serovares (1586) y de mayor importancia clínica, causando un 99 % de los casos de salmonelosis humana ^{3,9}. *S. bongori* y las demás subespecies de *S. enterica* son más comunmente aisladas de fuentes ambientales o a partir de animales de sangre fría, y, aunque los casos de salmonelosis causados por serovares pertenecientes a esta otra especie o subespecies son relativamente raros, ocasionalmente pueden llegar a causar infecciones en humanos ¹⁰.

El rango de hospederos varía de un serovar a otro. Mientras que algunos infectan exclusivamente al ser humano como los serovares Typhi y Paratyphi, otros se encuentran adaptados para infectar únicamente a algunas especies animales como el serovar Gallinarum a las aves. Existen otros serovares que se encuentran adaptados a un hospedero. Éstos infectan preferentemente a una especie, aunque en ciertas ocasiones

pueden infectar a otras, como por ejemplo Dublin, que es un serotipo adaptado a ganado bovino, pero, con baja frecuencia también causa enfermedad en humanos. Sin embargo, la mayoría de los serotipos de *Salmonella* son ubicuos, es decir que son capaces de infectar un amplio rango de hospedadores. Los serovares Typhimurium y Enteritidis, por ejemplo, son capaces de transmitirse de huéspedes humanos a huéspedes animales con facilidad y viceversa ¹¹.

La infección en humanos ocurre principalmente por vía alimentaria, asociada al consumo de productos derivados de animales (carne, leche, huevos, etc) y por contaminación fecal de agua y alimentos. También puede ocurrir por contacto con animales infectados o por transmisión interhumana.

Tanto en Uruguay como a nivel mundial, la salmonelosis es una de las principales causas de enfermedad transmitida por alimentos, representando un gran problema para la salud pública ¹².

La severidad de la enfermedad depende tanto del estado general del hospedero (siendo más susceptibles niños e inmunocomprometidos), como del serotipo implicado. Aunque casi todas las serovariedades de *Salmonella* se consideran patógenos en potencia, los diferentes serotipos tienen una amplia variedad de huéspedes y producen síndromes distintos que abarcan desde una gastroenteritis auto-limitada que se resuelve en 12

a 72 horas, hasta infecciones sistémicas severas. Por ejemplo, las infecciones por serovar Dublin (adaptado a bovinos) o serovar Choleraesuis (adaptado a porcinos), son muy poco frecuentes en el ser humano, pero cuando ocurren causan infecciones invasivas con alta morbilidad y mortalidad. En general, los serovares ubicuos causan una gastroenteritis aguda auto-limitada, mientras que los restringidos o adaptados a hospedero se asocian frecuentemente a infección sistémica que puede producir focos extra-intestinales de infección ¹¹.

De ahí la importancia de su identificación a nivel de serovariedades.

1.2. Antígenos somáticos y flagelares

Los serotipos se determinan en base a las distintas combinaciones de 67 antígenos somáticos (O) y 114 antígenos flagelares de fase I (H1) y fase II (H2), según el esquema de KW ¹⁻³. Clásicamente la serotipificación de *Salmonella* se realiza mediante técnicas serológicas que detectan epítopes de superficie (Fig. 1).

Las distintas cepas pueden presentar uno o varios antígenos O de forma simultánea y, mientras que hay antígenos que definen un serogrupo como por ejemplo los factores 9 y 4, que indican la pertenencia a los serogrupos O:9 y O:4, respectivamente, existen otros que se encuentran presentes en

varios serogrupos como factores accesorios (1 y 12, entre otros) y que dan menos información a la hora de realizar la serotipificación.

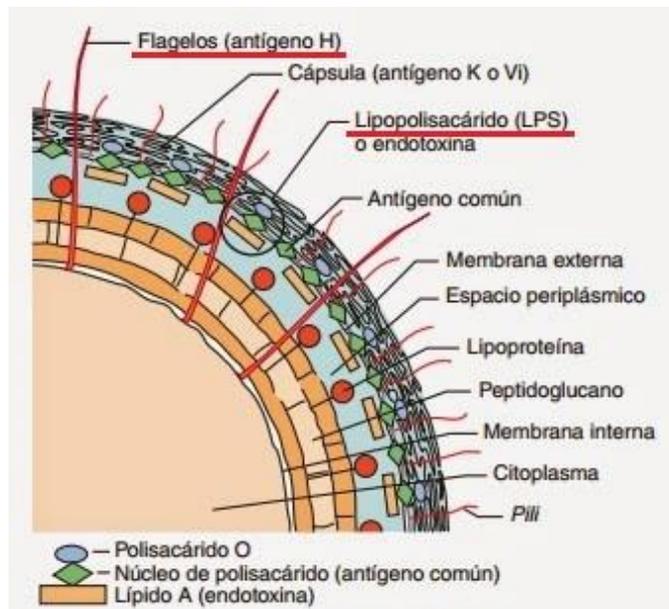


FIG. 1. Estructura de la pared celular de las enterobacterias. Las estructuras que constituyen epítopes de superficie relevantes para la serotipificación de *Salmonella* se encuentran subrayadas en rojo. Figura tomada de ¹³ y modificada en este trabajo.

Algunos antígenos H están compuestos por múltiples antígenos, llamados factores; por ejemplo, H:e,n,x es la designación que se le da a un antígeno flagelar que consiste en 3 factores separados, e, n y x, que se encuentran juntos en un mismo flagelo. Los 114 antígenos H están compuestos por 99 factores antigénicos diferentes. Los antígenos flagelares inmunogénicamente relacionados se conocen como complejos. Por ejemplo, el complejo G incluye todos los tipos de antígenos flagelares que contengan el factor antigénico g (ej., g,m; f,g; g,z₅₁, etc), además del

antígeno flagelar m,t. Los tipos de antígenos flagelares que incluyen al antígeno H:z₄ forman el complejo Z₄ ¹⁴.

1.2.1. Antígenos somáticos

Los antígenos O (polisacárido O) están presentes en el lipopolisacárido (LPS), un componente de la membrana externa de la pared celular de bacterias Gram-negativas.

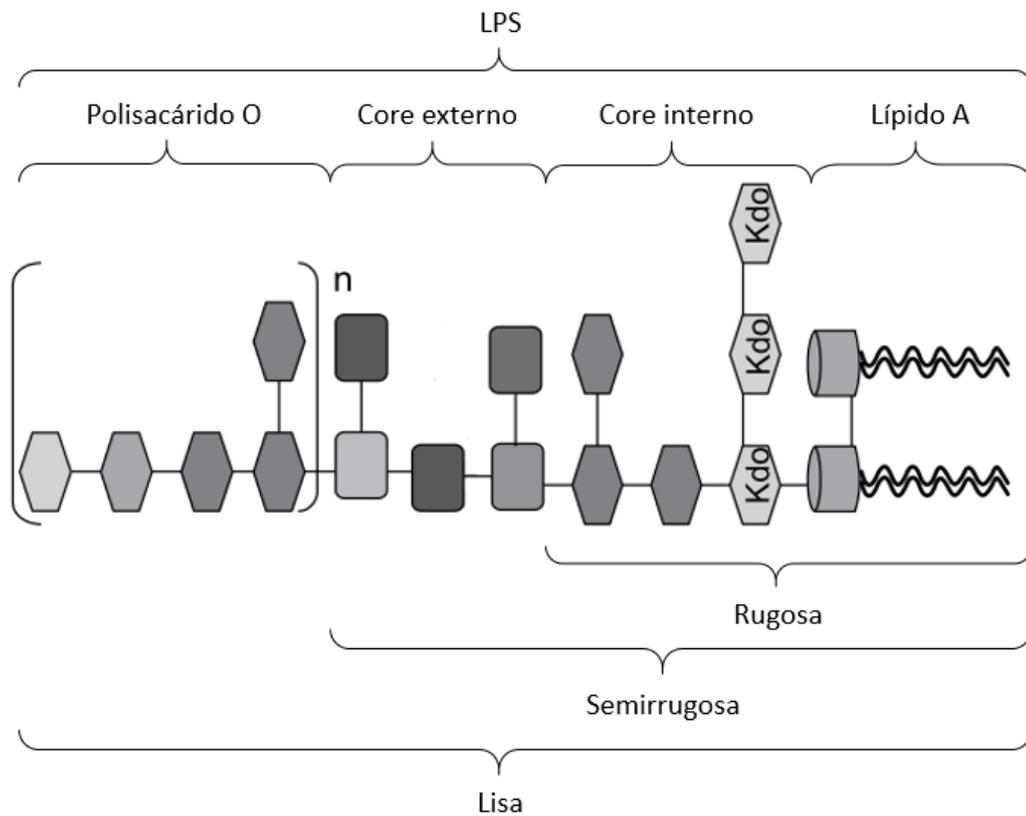


FIG. 2. Representación esquemática de la estructura del lipopolisacárido de las bacterias gram-negativas. El LPS consiste en el lípido A (interno), seguido por el núcleo o core de polisacárido y el polisacárido O (o antígeno O). Las cepas lisas conservan el antígeno O, las semirrugosas portan una subunidad del antígeno O y las cepas rugosas pierden las subunidades del antígeno O. (Figura tomada de ¹⁵).

La molécula de LPS se puede dividir en 3 partes: lípido A, núcleo o core del polisacárido y polisacárido O (Fig. 2). El lípido A representa el componente hidrofóbico del LPS y se localiza hacia la membrana interna. Éste se continua con el core del polisacárido que es el dominio que lo conecta con el polisacárido O, el cual queda expuesto hacia la superficie celular ¹⁶. Existen excepciones estructurales a nivel de las cepas rugosas, que pierden la expresión del lipopolisacárido O y exponen el core del polisacárido hacia la superficie (Fig. 2) ¹⁵.

El polisacárido O consiste en repetidos de oligosacáridos que contienen de 2 a 8 residuos de azúcares. La variación se da a nivel del tipo de azúcares presentes, del orden que siguen dentro de la estructura y del tipo de enlaces que forman entre ellos.

La gran diversidad de antígenos O no solo crea una base para la serotipificación, sino que además es importante para las bacterias ya que ofrece ventajas selectivas dentro de sus nichos ecológicos específicos ¹⁷. Esta presión selectiva generada en parte por el sistema inmune innato del hospedero es, a su vez, responsable de la generación de diversidad a nivel de los antígenos O. La presencia e identidad del antígeno O es esencial para la supervivencia de las bacterias en su ambiente natural y juega un rol importante en la virulencia ¹⁸.

Los genes específicos para la síntesis del antígeno O normalmente se encuentran en el cromosoma como un cluster de genes que mapea entre *galF* y *gnd* en *Salmonella*, *E. coli* y *Shigella*, pero a veces, uno o más de dichos genes mapean fuera del cluster ¹⁹.

Las variaciones genéticas dentro del cluster del antígeno O son los mayores determinantes de las diferencias entre los distintos tipos de antígenos O. Los genes de la síntesis del antígeno O se clasifican en 3 categorías principales:

1- Genes involucrados en la biosíntesis de moléculas de azúcar-nucleótido, conteniendo los azúcares específicos para incorporar al antígeno O, por ejemplo, síntesis de TDP-Ramnosa. Cabe destacar que en los antígenos O existen azúcares comunes que también se encuentran en otras estructuras formando polisacáridos o están implicados en procesos metabólicos, como es el caso de la glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. Las enzimas necesarias para la biosíntesis de estos últimos usualmente están codificadas en genes fuera del cluster del antígeno O.

2- Genes que codifican para glicosil-transferasas asociadas al ensamblaje del polisacárido O, que son específicas para cada uno de los azúcares dadores y aceptores.

3- Genes que codifican para proteínas de procesamiento del antígeno O, que están involucradas en la translocación a través de la membrana y la polimerización del mismo (wzx y wzy en la vía dependiente de wzy, wzm y wzt en la vía de los transportadores ABC).

Por otra parte, existen genes localizados en bacteriófagos o en otras regiones del cromosoma fuera del cluster del antígeno O que están involucrados en la modificación de la estructura y particularmente, en la adición de residuos laterales al polisacárido O.

En las enterobacterias se han descrito 2 mecanismos principales para la síntesis y translocación del antígeno O: la vía dependiente de Wzy y la vía de los transportadores ABC y un tercer mecanismo denominado vía dependiente de la sintasa que es específico para un tipo O de *Salmonella* (O:54) ^{15,18,20}.

La vía dependiente de Wzy involucra la síntesis individual de las subunidades repetidas O sobre la cara citosólica, seguido por su translocación a la cara periplasmática de la membrana citoplasmática. Las subunidades en el periplasma empiezan a polimerizarse y posteriormente el polisacárido se une al oligosacárido del core con la liberación de undecaprenol fosfato (Und-PP). El segundo mecanismo de biosíntesis del LPS es el de los transportadores ABC, que utilizan la energía del ATP para transportar las moléculas a través de la membrana ¹⁵.

Casi todos los antígenos O de *Salmonella* son heteropolímeros y utilizan la vía dependiente de *wzy* para su síntesis y translocación. Las únicas excepciones son O:54 y O:67, que usan la vía dependiente de la sintasa y la vía de los transportadores ABC, respectivamente ¹⁸.

1.2.2. Antígenos Flagelares

Por otro lado, los antígenos flagelares corresponden a la flagelina (proteína del filamento del flagelo bacteriano). La estructura del flagelo se suele describir en 3 partes: el cuerpo basal (que contiene el motor reversible que ancla la estructura a la membrana celular), el gancho o codo y el filamento flagelar (Fig.3A). El flagelo es una de las maquinarias de movilidad más distribuidas en las bacterias y le confiere a las mismas la capacidad de nadar, lo cual es esencial para la patogénesis completa de muchas bacterias, incluida *Salmonella spp.* Además de su contribución a la virulencia como mecanismo de movilidad, el flagelo juega un rol central en muchos otros procesos relacionados con la infección tales como adherencia a superficies, formación de biofilms, secreción de efectores moleculares y modulación de la respuesta inmune ²¹⁻²³.

La flagelina es la proteína estructural predominante del filamento del flagelo bacteriano. Es una proteína monomérica que presenta 4 dominios conectados de forma lineal, dos dominios del núcleo del filamento (D0 y D1) y dos dominios de la región hipervariable (D2 y D3) (Fig. 3B).

Las regiones N- y C-terminal de la flagelina forman estructuras en hélice alfa empaquetadas, que constituyen los dominios D0 y D1, posicionados hacia el núcleo del filamento. La región variable de la flagelina adquiere una conformación de hoja beta plegada (dominios D2 y D3) y queda expuesta hacia la superficie externa del filamento ²³.

Típicamente los genes que codifican para la flagelina (*fliC* y *fljB*) se encuentran altamente conservados en sus regiones 5' y 3' mientras que la región central generalmente es más variable. Las regiones conservadas de estos genes codifican para las partes de la proteína que formarán el núcleo del filamento flagelar (dominios D0 y D1 de la flagelina) y son críticas para el ensamblaje del filamento. La región variable de los genes *fliC* y *fljB*, codifica para los aminoácidos 181 a 390 de la flagelina, aproximadamente. Estos formarán la porción de la proteína que queda expuesta hacia la superficie del filamento y que es de antigenicidad variable (comprende los dominios D2 y D3 de la flagelina) ¹⁴.

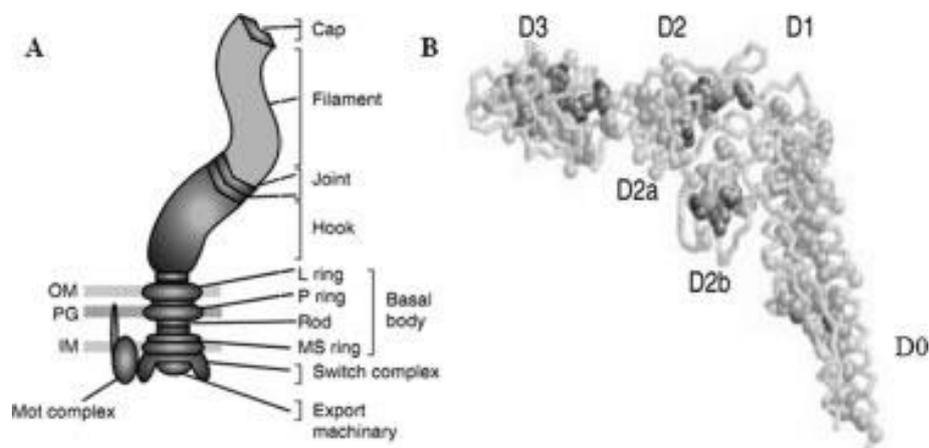


FIG. 3. (A) Diagrama esquemático de la estructura del flagelo de bacterias gramnegativas. El flagelo consiste en 3 partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal. (B) Estructura 3D de la molécula de flagelina (FliC) de *Salmonella Typhimurium*. Imagen obtenida de ²³

Existen serovares de *Salmonella enterica* que expresan un solo tipo de flagelina, FliC (monofásicos), y otros que son capaces de expresar, de forma alternativa, dos proteínas distintas para el filamento flagelar, FliC y FljB, mediante un proceso conocido como variación de fase (difásicos).

En casos raros, algunos aislamientos de *Salmonella* expresan antígenos flagelares adicionales. Algunos de estos son inestables, mientras que otros se comportan como los antígenos flagelares típicos, o se cree que pueden ser variantes de los antígenos flagelares comunes. Éstos se designan como fases III y fases R ^{1,14}. Las flagelinas de fase III se encuentran codificadas en genes diferentes a *fliC* o *fljB*, por ejemplo el gen *flpA*, que se encuentra en un plásmido que se encuentra en el serovar Rubislaw ²⁴. Por otro lado, las bases genéticas de las fases R solo se conocen en unos pocos casos,

en los que se encuentran deleciones dentro de la región variable de *fliC* y por lo tanto producen proteína flagelar con antigenicidad diferente ¹.

El gen *fliC* está localizado en uno de los operones de biosíntesis del flagelo, está presente en todo el género *Salmonella*, y tiene un homólogo en *Escherichia coli*. El gen *fljB* se localiza en una región del genoma que es única para *Salmonella* y que está presente en 4 de las 6 subespecies. Se han reportado aislamientos de *S. bongori* que tienen un gen homólogo a *fljB*, pero en general, esta especie es típicamente monofásica ¹⁴.

El mecanismo molecular que media la variación de fase ocurre por un evento de inversión sitio-específico del ADN en el cromosoma bacteriano (Fig 4). El promotor para la proteína FljB está flanqueado por los sitios de recombinación *hixL* y *hixR*. La Hin recombinasa, en conjunto con las proteínas potenciadoras de la recombinación Fis (factor for inversion stimulation) y HU (histone-like protein), median una reacción de recombinación reversible entre los sitios *hix*, dando como resultado la inversión del segmento de ADN que contiene el promotor *fljBA*.

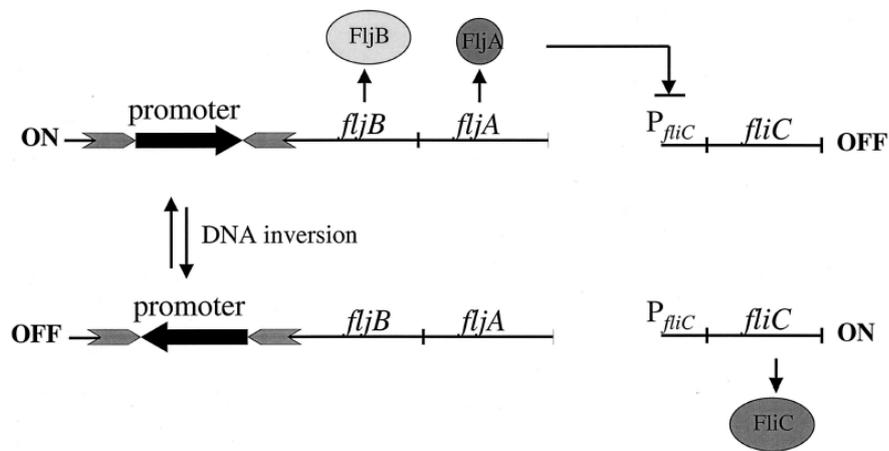


FIG. 4. Representación esquemática del mecanismo de variación de fase en *Salmonella enterica*. (Figura tomada de ²⁵)

Cuando el promotor *fljBA* se encuentra en una orientación, dirige la transcripción del operón *fljBA* y se produce flagelina FljB. El gen *fljA* se cotranscribe con *fljB* y codifica para un represor transcripcional del gen *fliC*, por lo tanto, cuando la bacteria expresa el flagelo de fase II, se inhibe la expresión del flagelo de fase I. FljA, además, inhibe la producción de FliC a nivel postraduccional, ya que interacciona con una secuencia situada en el 5'-UTR del mensajero, impidiendo así su traducción. En la orientación alternativa, el operón *fljBA* no se expresa y en su lugar se transcribe el gen *fliC*, produciéndose la proteína flagelar de fase I.

Las flagelinas FliC y FljB son idénticas en sus primeros 71 y últimos 46 aminoácidos, pero se diferencian en los aminoácidos de la región central, que son los que quedan expuestos hacia la superficie, resultando en antigenidades diferentes. La mayoría de los alelos de *fliC* y *fljB* reportados

en la literatura son bastante homogéneos en cuanto a su tamaño, variando desde 1,488 a 1,536 pb de largo, existiendo excepciones para alelos de *fliC* de aislamientos del complejo Z4, que son de 200 a 300 nucleótidos más cortos ¹⁴.

La flagelina es un potente antígeno capaz de activar la respuesta inmune innata en muchas plantas y animales y se cree que la variación de fase juega un rol en la patogénesis del organismo al proveer a la bacteria con un mecanismo que le permite evadir la respuesta inmune de forma temporal ^{25,26}.

1.3. Serotipificación clásica

La serotipificación es muy útil para identificar cepas que varían en su rango de hospedadores y su patogenicidad, incluyendo a organismos como *Salmonella*, y es esencial en investigaciones epidemiológicas.

La serotipificación de *Salmonella* se basa en un test de aglutinación de las células bacterianas. Es un método sencillo que se puede realizar tanto con bacterias vivas como muertas, y da una reacción clara y suficientemente rápida sin necesidad de extraer los antígenos de la célula bacteriana ¹⁶. Es el método de oro y el más comúnmente usado.

La aglutinación se puede hacer por diferentes técnicas, entre ellas aglutinación en tubos y aglutinación en lámina. Estas técnicas permiten

discriminar la presencia o ausencia de factores antigénicos determinados en un cultivo bacteriano.

Los antisueros para realizar la tipificación pueden ser obtenidos inmunizando conejos. Aunque hoy en día se puede acceder a una gran variedad de antisueros comerciales, estos no cubren la totalidad de las variantes requeridas en los centros de referencia.

Para realizar la serotipificación de *Salmonella* por el método clásico es necesario contar con gran cantidad de antisueros diferentes (más de 250), así como 350 antígenos diferentes para la preparación y control de calidad de los antisueros. Muchas veces los antisueros comerciales para los antígenos poco comunes no se encuentran disponibles, y aunque lo estén, su calidad puede ser variable. Además de ser un método costoso resulta laborioso y requiere una gran cantidad de tiempo y personal entrenado. De acuerdo al esquema de serotipificación actual, se requiere un mínimo de 3 días para determinar el serotipo de un aislamiento; dependiendo de la complejidad del serotipo puede llevar incluso más tiempo ⁹.

Por otro lado, este método presenta limitaciones debido a posibles pérdidas de expresión de los antígenos necesarios para la serotipificación. Por ejemplo, en las cepas que producen cápsula, el antígeno O no es detectable; las cepas no móviles no expresan antígenos flagelares, etc ²⁷.

1.4. Métodos moleculares de tipificación

Como alternativa a la serotipificación clásica se han propuesto distintos métodos moleculares que se basan en la secuencia de ADN para determinar la serovariedad de los aislamientos de *Salmonella*. Éstos presentan numerosas ventajas sobre los métodos tradicionales, sobre todo en cuanto a su reproducibilidad, estandarización y poder discriminatorio ⁹. Dentro de las técnicas más utilizadas para esto destacamos aquellas basadas en métodos de PCR, en MLST (Multi-locus sequence typing) y secuenciación del gen *fliC*, que codifica para la flagelina de fase I.

1.4.1. Métodos de tipificación basados en PCR

1.4.1.1. Amplificación del gen *invA* para detección de *Salmonella sp.*

El gen *invA* se localiza en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella sp.*, que codifica para proteínas de un sistema de secreción de tipo III. Este gen es esencial para la invasión de células epiteliales por parte de *Salmonella* y se encuentra presente tanto en la especie *enterica* como en *bongori* ^{28,29}.

El gen *invA* presenta una secuencia única para *Salmonella* y, por lo tanto, la amplificación por PCR de esta secuencia blanco empleando el par de primers descrito por Rhan et. Al. ²⁹ puede ser usada para diferenciar *Salmonella* de otras bacterias.

1.4.1.2. Identificación de distintos serovares de *Salmonella* mediante métodos basados en PCR

Dentro de los métodos de PCR propuestos para la serotipificación de *Salmonella* encontramos algunos que se basan en la amplificación de la región variable de los genes que codifican para proteínas implicadas en la variación antigénica, tanto de los antígenos somáticos como de los flagelares. De este modo es posible identificar un gran número de serovares a partir de la combinación de variedad de cada uno de estos tipos O y H identificados. Estos métodos pueden presentar errores al momento de la determinación del serotipo ya que clásicamente lo que se detecta es la expresión de los antígenos, mientras que en este caso se detecta la presencia o no de los genes relacionados, lo que implica que la cepa tiene el potencial de expresar el antígeno, aunque no necesariamente significa que lo haga ^{27,30-34}. Por otro lado, existen otros métodos basados en PCR que emplean marcadores genéticos serotipo-específicos que no tienen relación con los genes que codifican para los distintos tipos antigénicos. Estos últimos permiten la detección de un menor número de serovares, pero en general son más específicos ³⁵⁻³⁸.

Los métodos de PCR múltiple que vamos a tomar como base para este trabajo tienen como blanco los genes implicados en la determinación de los antígenos somáticos (genes del cluster rfb, más específicamente *wzx* y

tyv)³² y los antígenos flagelares de primera y segunda fase (*fliC* y *fljB*, respectivamente) ^{30,31}. Éstos permiten la detección de 5 tipos somáticos (O:4, O:7, O:6,8, O:9 y O:3), 8 tipos flagelares de fase I (i; r; l,v; e,h; z₁₀; b; d y el complejo G) y 7 tipos flagelares de fase II (1,2; 1,5; 1,6; 1,7; l,w; e,n,x y e,n,z₁₅). En el caso de los antígenos flagelares, la PCR amplifica directamente los genes responsables de la producción de flagelina, mientras que para los somáticos la PCR tiene como blanco aquellos genes que codifican para enzimas necesarias para la biosíntesis de los antígenos O. *Tyv* codifica para la tyvelosa epimerasa, y se encuentra presente en los serotipos de tipo somático O:9 y algunas cepas con tipo somático O:2, aunque en estas últimas el gen se encuentra mutado, resultando en una forma inactiva de la enzima ³⁹. *Wzx*, por otra parte, codifica para la flipasa del antígeno O, y mediante la amplificación de su región variable, es posible la identificación de los tipos somáticos O:4, O:7, O:6,8 y O:3 ^{32,40}.

Por otra parte, la PCR múltiple para la identificación de tipos flagelares de fase I, incluye un par de cebadores (*sdf-I* forward y reverse), que amplifican una región del genoma presente únicamente en el serovar Enteritidis, actuando como un marcador genético que permite identificar a este serotipo entre los de tipo flagelar de primera fase del complejo G ^{31,35}. Esto resulta de gran utilidad ya que Enteritidis es uno de los serovares de *Salmonella enterica* más prevalentes a nivel mundial.

1.4.2. Secuenciación del gen *fliC*

Como se describió previamente, el gen *fliC* de *Salmonella* codifica para la flagelina de fase I y la secuencia de su región variable es la que va a determinar la identidad del antígeno flagelar de fase I de cada cepa, por lo que la amplificación y secuenciación de este gen aporta la información necesaria para realizar la caracterización de los antígenos flagelares de primera fase ³⁴.

La secuencia del gen *fliC* puede, además, ser considerada como un marcador de la variabilidad genética tanto entre los distintos serotipos como dentro de un mismo serotipo. En la mayoría de los casos, existe suficiente variabilidad dentro del *fliC* como para separar serotipos que comparten un mismo antígeno flagelar de fase I, por lo que la secuencia de este gen resulta un buen predictor de serovares ⁴¹.

1.4.3. Multi-locus Sequence Typing (MLST)

El MLST es un método basado en la determinación de secuencias nucleotídicas de las regiones internas de una serie de 7 genes housekeeping (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* y *thrA* para *Salmonella*). Las variaciones en los diferentes *locus* se detectan de forma directa por secuenciación del ADN en fragmentos de genes seleccionados. La secuencia de cada uno de los *loci* se alinea con las ya existentes en una

base de datos y si la secuencia coincide, se le asigna uno de los alelos ya identificados, en caso contrario, se asigna un nuevo número a ese nuevo alelo. Una vez asignado un número a cada alelo, y manteniendo un orden específico, se genera un perfil alélico, lo que permite la comparación entre cepas ^{42,43}.

La aplicación de MLST según el esquema de 7 genes descrito anteriormente ha sido sugerida como reemplazo a la serotipificación clásica de *Salmonella enterica*. El MLST es considerado una herramienta valiosa que permite la identificación de clusters genéticos y la elucidación de la diversidad intra- e inter-serotipos. En el trabajo de Achtman y colaboradores ⁴³ se demostró que, en general, la mayoría de las cepas pertenecientes a un mismo serovar se encuentran muy relacionadas genéticamente. Sin embargo, existen aislamientos de *Salmonella* pertenecientes al mismo serotipo que agrupan en clusters separados y que no necesariamente son similares en virulencia y epidemiología, mientras que, por otra parte, hay cepas de distintos serotipos que, aunque presentan epítopes distintos (producto de la transferencia horizontal de genes), agrupan juntas dentro de un mismo cluster por estar muy relacionadas genéticamente. En luz de esto, la principal crítica que se le hace al sistema de clasificación clásico en serovariedades de *Salmonella*, es la poca información que brinda, y se propone que éste se reemplace por uno basado en MLST ⁴³.

Las principales ventajas que presenta este método son su alta reproducibilidad, menor costo y la facilidad para intercambiar resultados entre laboratorios. Además, existen bases de datos de acceso público para MLST, que contienen perfiles alélicos y secuencias de los distintos alelos, así como software y herramientas online de libre acceso para el análisis de datos ^{9,43}.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Poner a punto y aportar métodos moleculares que sirvan como reemplazo para la serotipificación clásica de *Salmonella enterica*.

2.2. Objetivos específicos

- i. Seleccionar controles adecuados para la puesta a punto de las PCR múltiples mediante el uso de herramientas informáticas.
- ii. Poner a punto 3 métodos de PCR múltiple que permitan la identificación de los tipos somáticos y flagelares de fase I y II más comunes.
- iii. Caracterizar una colección de 58 cepas de *Salmonella* de origen humano y alimentario obtenidos de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia entre 2008 y 2016 usando las PCR múltiples puestas a punto.
- iv. Completar la tipificación a nivel de serovar utilizando secuenciación del gen *fliC* y/o determinación de alelos de MLST.
- v. Comparar los resultados obtenidos por métodos moleculares con la serología clásica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas de trabajo

La colección de cepas de *Salmonella sp.*, que se describen en la Tabla 1-a, proviene de diversos orígenes, de aislamientos humanos y alimentarios obtenidos entre 2008 y 2016 en Santa Cruz de la Sierra, Bolivia aportadas por la Dra Lorena Soletto, del centro nacional de enfermedades tropicales de Bolivia (CENETROP). Las cepas fueron identificadas como *Salmonella sp.* por pruebas bioquímicas estándar en el laboratorio de microbiología de CENETROP. La identidad de *S. enterica* fue confirmada en el Instituto de Higiene, por espectrometría de masas, y en algunos casos por PCR para el gen *invA* como se describe debajo.

Las cepas usadas a modo de control consisten en aislamientos uruguayos de *Salmonella* de serovar conocido y cuyo genoma fue previamente secuenciado en la mayoría de los casos (Tabla 1-b).

3.2. Medios de cultivo

- Triptona soya agar (TSA) OXOID
- Luria Bertani agar (LB agar) SIGMA
- Luria Bertani broth (LB) SIGMA
- Agar semisólido (caldo nutriente 8 g/L, peptona 5g/L, NaCl 5 g/L, agar 7g/L)

Tabla 1-a. Cepas de la colección boliviana

| Cepa | Fecha de aislamiento | Origen |
|-------------|-----------------------------|-------------------------|
| SBO-1 | 2016 | Heces |
| SBO-2 | 2013 | Leche en polvo |
| SBO-3 | 2014 | Heces |
| SBO-4 | 2014 | Sangre |
| SBO-5 | 2014 | Heces |
| SBO-6 | 2011 | Heces |
| SBO-7 | 2015 | Heces |
| SBO-8 | 2015 | Heces |
| SBO-9 | 2015 | Heces |
| SBO-10 | 2015 | Heces |
| SBO-11 | 2015 | Heces |
| SBO-12 | 2015 | Heces |
| SBO-13 | 2014 | Restos endocervicales |
| SBO-14 | 2016 | Heces |
| SBO-15 | D | Heces |
| SBO-16 | D | Clínica |
| SBO-17 | 2015 | Heces |
| SBO-18 | 2015 | D |
| SBO-19 | D | D |
| SBO-20 | 2014 | Heces |
| SBO-21 | D | D |
| SBO-22 | 2008 | Heces |
| SBO-23 | D | D |
| SBO-24 | 2008 | Heces |
| SBO-25 | 2015 | Heces |
| SBO-26 | 2014 | Heces |
| SBO-27 | 2008 | Líquido cefalorraquídeo |
| SBO-28 | D | D |
| SBO-29 | D | D |
| SBO-30 | D | D |
| SBO-31 | D | D |
| SBO-32 | D | D |
| SBO-33 | 08.12.15 | Heces |
| SBO-34 | D | D |
| SBO-35 | D | D |
| SBO-36 | D | D |
| SBO-37 | D | D |
| SBO-38 | D | D |
| SBO-39 | D | D |
| SBO-40 | 2008 | Sangre |
| SBO-41 | D | D |
| SBO-42 | D | D |
| SBO-43 | 2013 | Vaginal/post aborto |
| SBO-44 | 2016 | Heces |
| SBO-45 | 2014 | Líquido pancreático |
| SBO-46 | 2015 | Heces |
| SBO-47 | 2013 | Leche en polvo |
| SBO-48 | 2013 | Alimento |
| SBO-49 | 2013 | Alimento |
| SBO-50 | 2013 | Alimento |
| SBO-51 | 2016 | D |
| SBO-52 | 2015 | Heces |
| SBO-53 | 2016 | Heces |
| SBO-56 | 2014 | Chorizo crudo de res |
| SBO-57 | 2016 | Pollo crudo |
| SBO-58 | 2016 | Pollo crudo |
| SBO-59 | 2016 | Pollo crudo |
| SBO-60 | 2016 | Pollo congelado |

Tabla 1-b. Cepas uruguayas usadas como control

| Cepa | Serovar | Fecha de aislamiento | Origen |
|-------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| UY001 | Enteritidis | 2001 | Huevo |
| UY032 | Agona | 2007 | Coprocultivo |
| UY051 | Typhimurium | 1977 | Sangre |
| UY081 | Hadar | 1998 | Coprocultivo |
| UY085 | Heidelberg | 2000 | Carne de pollo |
| UY136 | Paratyphi B | 1997 | Harina |
| UY137 | Livingstone | 1997 | Ave |
| UY182 | Panama | 2004 | Coprocultivo |
| SPE-10 | Typhi | 2009 | Sangre |
| 35/10 | Bredeney | 2010 | D |
| H9812* | Braenderup | D | D |
| Hadar | Hadar | D | D |

D: Desconocido

* Cepa de *Salmonella* Braenderup utilizada como control estándar de campo pulsado

3.3. Serología

Los antígenos somáticos y flagelares se determinaron por aglutinación en lámina de las células bacterianas con antisueros mono- y polivalentes (PRO-LAB Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La asignación de serovar se realizó de acuerdo a lo establecido en el esquema de Kauffman-White-Le Minor ¹.

3.3.1. Detección de antígenos somáticos

Se partió de cultivos frescos en medio TSA en tubos inclinados obtenidos a partir de una única colonia. Se colocan 50 µL de suero fisiológico estéril sobre la lámina y con un ansa se emulsiona una cantidad de bacterias suficiente para generar una suspensión lechosa. A continuación, se mezcla una gota de antisuero con la suspensión bacteriana utilizando un ansa estéril, se inclina la lámina realizando movimientos rotatorios durante un

minuto y se observa sobre un fondo oscuro si se produce una reacción de aglutinación o no.

3.3.2. Detección de antígenos flagelares

En este caso, se parte de un cultivo puro en agar semisólido. Para ello, se toma con un ansa una cantidad suficiente de bacterias del cultivo en TSA y se siembra un botón en el centro de la placa procurando no romper la superficie del agar. El cultivo en un medio semisólido promueve la expresión de flagelos y aquellas bacterias que los expresen van a “nadar”, observándose crecimiento desde el centro hacia los bordes de la placa.

Para realizar la reacción de aglutinación de los antígenos flagelares, se toman bacterias de la parte más externa de la placa para asegurarnos que estamos tomando células que expresaron sus flagelos. A partir de aquí, el procedimiento es igual que para los antígenos somáticos.

3.4. Pruebas bioquímicas

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas a algunas cepas para determinar la subespecie a la que pertenecen:

- TSI
- Fenilalanina
- Azúcares
 - Salicina
 - Malonato
 - Sorbitol

- Manitol
- Maltosa
- Dulcitol
- Urea
- Descarboxilasas
 - Lisina
 - Ornitina
 - Arginina

3.5. Selección de controles por PCR *in-silico*

Para seleccionar controles adecuados para la puesta a punto de las PCR múltiples se utilizaron las herramientas informáticas Nucleotide BLAST y Primer-BLAST disponibles en la página web de la NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En primer lugar, se localizaron los genes de interés en los genomas completos de distintos serovares de *Salmonella* de una colección de cepas uruguayas. Esto se logró usando Nucleotide BLAST y alineando las secuencias de los genes obtenidos de la base de datos contra los genomas completos de las cepas uruguayas. Obtener la secuencia de los genes fue necesario para realizar las PCR *in silico* ya que la herramienta Primer-BLAST no permite ingresar el genoma completo como molde. Luego, sobre la secuencia de los genes se realizaron las PCR *in silico* con los primers descritos en ⁷⁻⁹ usando Primer-BLAST.

Para corroborar la especificidad de los primers y verificar que no se produzcan productos secundarios se realizó además el alineamiento de cada par de primers contra la base de datos de *Salmonella* y contra el genoma completo de cada una de las cepas control cuando éste estaba disponible. Para las cepas que no se contaba con el genoma secuenciado, lo que se hizo fue descargar varios genomas que correspondieran a aislamientos del mismo serovar de la base de datos de la NCBI y realizar el alineamiento contra éstos.

3.6. Análisis de secuencias

Para el análisis de las secuencias obtenidas y para realizar los alineamientos necesarios se utilizó la herramienta informática libre BioEdit versión 7.2.5, disponible en internet (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

3.7. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de colonias aisladas en placas de LB agar. Se tomó una colonia con un tip plástico y se suspendió en 150 uL de agua ultrapura (Gibco). La suspensión bacteriana se llevó a ebullición por 7 minutos y luego se pasó inmediatamente al freezer a -20°C,

manteniéndose por al menos 20 minutos. A continuación, se centrifugó a 13.000 rpm durante 7 minutos y se recuperaron 130 uL del sobrenadante. El extracto de ADN fue conservado a -20°C para su posterior uso.

3.8. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

3.8.1. PCR inv-A para identificación de *Salmonella sp.*

La amplificación se realizó en un volumen total de 20 µL. Las reacciones se realizaron utilizando un kit comercial (Thermo Scientific) en Taq Buffer con (NH₄)₂SO₄, con una concentración de MgCl₂ de 2 mM, 0.2 mM de dNTPs, 0.25 µM de cada primer (Tabla 2) y 0.05 U/µL de Taq polimerasa, empleando 2 µL del extracto de ADN como molde.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 45 s, 58°C por 45 s y 72°C por 45 s, y un ciclo final de extensión de 72°C durante 7 min.

3.8.2. PCR múltiple para identificar tipos somáticos

Se utilizaron cinco pares de primers previamente reportados por Herrera-León *et al.* (2007)³² para amplificar las regiones variables de los genes *tyv* y *wzx* (Tabla 2). El primer R-*wzx*C1mod fue rediseñado como parte de este

trabajo ya que el primer R-wzxC1 presentado en el artículo de referencia, tenía bases que no eran complementarias a la secuencia blanco. La amplificación se realizó en un volumen total de reacción de 20 uL utilizando un kit comercial (Thermo Scientific). Se usó 1 U de Taq polimerasa, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y 0.2 uM de cada primer, usando Taq Buffer con (NH₄)₂SO₄. Como molde se emplearon 2 µL del extracto de ADN.

El programa de ciclado es el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 40 s, 58°C por 45 s y 72°C por 30 s, y un ciclo final de extensión a 72°C por 7 min.

3.8.3. PCR múltiple para identificar tipos flagelares de fase I

Los antígenos flagelares de fase I fueron determinados mediante una PCR múltiple previamente reportada ³¹ que tiene como blanco el gen *fliC*. En esta PCR se usa un primer forward para 6 primers reverse específicos para los antígenos flagelares i, z₁₀, b, eh, lv y r; además de 2 pares de primers específicos para el tipo flagelar d y para el complejo G. Incluye también un par de primers para amplificar el gen *sdf*, que permite identificar a Enteritidis entre los serovares que presentan el complejo G (Tabla 2).

La amplificación se realizó en un volumen total de reacción de 20 µL en las condiciones descritas en la PCR para identificar tipos somáticos, usando 0.3 µM de los primers antisense-i, antisense-z₁₀, antisense-lv, antisense-r y

sdf-forward y –reverse; y 0.2 μM de los primers sense-60, antisense-b, antisense-eh, d y G forward y reverse. Se usaron 2 μL de DNA extraído de colonias como molde. El programa de ciclado empleado fue el mismo que se describió arriba.

3.8.4. PCR múltiple para identificar tipos flagelares de fase II

La PCR para determinar los tipos flagelares de fase II ³⁰ tiene como blanco la secuencia interna del gen *fljB* y usa 10 primers para identificar 7 tipos flagelares diferentes. Se usa un primer forward para 4 primers reverse específicos para los tipos flagelares 1,2; 1,5; 1,6 y 1,7; un par de primers para el tipo lw; y un primer forward para dos primers reverse específicos para e,n,x y e,n,z₁₅ (Tabla 2). Las condiciones de amplificación fueron idénticas a las descritas anteriormente, con una concentración de 0.2 μM para los primers Antisense-R5m, Antisense-R6 y Antisense-R7; 0.3 μM de primers Sense-F1m, Antisense-R1m, Sense-Fe, Antisense-Rx y Antisense-Rz15; y 0.4 μM de los primers Sense-Fw y Antisense-Rw.

TABLA 2. Cebadores utilizados en este trabajo

| PCR | Cebador | Secuencia (5'-3') | Tamaño del amplicón (pb) | Referencia |
|--|---|-------------------------------|--------------------------|--|
| invA | 139 (Fw) | GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA | 284 | 29 |
| | 141 (Rev) | TCATCGCACCGTCAAAGGAACC | | |
| Somáticos | F-tyvD | GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT | 615 | 32 |
| | R-tyvD | TAGCAAACGTCTCCCACCATAC | | |
| | F-wzxB | GGCATATATTTCTGTATTCGC | 229 | |
| | R-wzxB | GCCTTAATTAAGTAAGTTAGTGGAAGC | | |
| | F-wzxC1 | CAGTAGTCCGTAATAACAGGGTGG | 483 | |
| | R-wzxC1mod ^a | AATGCTATAAATACTGTGTTAAATTGC | | |
| | F-wzxC2 | ACTGAAGGTGGTATTTTCATGGG | 154 | |
| | R-wzxC2 | AAGACATCCCTAACTGCCCTGC | | |
| F-wzxE1 | TAAAGTATATGGTGCTGATTTAACC | 344 | | |
| R-wzxE1 | GTTAAAATGACAGATTGAGCAGAG | | | |
| Flagelares fase I (gen <i>fliC</i>) | Sense-60 ^b | GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG | 31 | |
| | Antisense-i | ATAGCCATCTTTACCAGTTCC | | 253 |
| | Antisense-z ₁₀ | CGTCGCAGCTTCTGCAACC | | 448 |
| | Antisense-b | CGCACCAGTCYWACCTAAGGCGG | | 169 |
| | Antisense-eh | AACGAAAGCGTAGCAGACAAG | | 198 |
| | Antisense-lv | CCTGTCACTTTCGTGGTTAT | | 327 |
| | Antisense-r | AAGTGACTTTTCCATCGGCTG | | 281 |
| | Forward-d | CCCGAAAGAACTGCTGTAACCG | | 87 |
| | Reverse-d | TGGATATCAGTATTGCTCTGGGC | | |
| | Forward-G | GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG | | 509 |
| | Reverse-G | AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG | | |
| | Forward-Sdf-I | TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG | | 293 |
| | Reverse-Sdf-I | CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC | | |
| | Flagelares fase II (gen <i>fliB</i>) | Sense-F1mod ^c | | CTTATGCCRATAATGGTACTACTG |
| Antisense-R5mod | | GGTTACAGVAGCCGTACCAG | 98 | |
| Antisense-R6 | | CTCCTGTACTTCTGTTTTGGTTGTA | 290 | |
| Antisense-R7 | | TAATCGCCATTTTTGTGCGAG | 190 | |
| Antisense-R1mod | | TTGACCAAYKYMCGSCAT | 388 | |
| Sense-Fw | | GTGGGGCAACMCTCAATACTG | 241 | |
| Antisense-Rw | | CCTGCCACTTTCGTGGTTGC | | |
| Sense-Fe ^d | | GGCAACCCGACAGTAACTGGCGATAC | 56 | |
| Antisense-Rx | | CCATCCTTAAAGGATACGGC | | |
| Antisense-Rz ₁₅ | | ATCAACGGTAACTTCATATTTG | | 135 |
| | | | | |
| fliC | FliC5 (Fw) | CACGAATTGATCATGGCACAAGTCATTA | ~1500 | Diseñados en el laboratorio. Dra. L. Yim |
| | FliC6 (Rev) | CACAAGCTTCGGATTAACGCAGTAAAGAG | | |

| PCR | Cebador | Secuencia (5'-3') | Tamaño de amplicón (pb) | Referencia |
|------|----------------------|--------------------------|-------------------------|------------|
| MLST | aroC-F | CCTGGCACCTCGCGCTATAC | 826 | 43 |
| | aroC-R | CCACACACGGATCGTGGCG | | |
| | dnaN-F | ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA | 833 | |
| | dnaN-R | AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC | | |
| | hemD-F | GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG | 666 | |
| | hemD-R | ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA | | |
| | hisD-F | GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC | 894 | |
| | hisD-R | CTGAACGGTCATCCGTTTCTG | | |
| | purE-F | ATGTCTTCCC GCAATAATCC | 510 | |
| | purE-R | TCATAGCGTCCCCCGCGGATC | | |
| | sucA-F | AGCACCGAAGAGAAACGCTG | 643 | |
| | sucA-R | GGTTGTTGATAACGATACGTAC | | |
| | thrA-F | GTCACGGTGATCGATCCGGT | 852 | |
| | thrA-R | CACGATATTGATATTAGCCCG | | |
| | hemD-SF ^e | GTGGCCTGGAGTTTTCCACT | - | |
| | hemD-SR ^e | GACCAATAGCCGACAGCGTAG | - | |
| | purE-SF ^e | CGCATTATTCCGGCGCGTGT | - | |
| | purE-SR ^e | CGCGGATCGGGATTTCCAG | - | |

^a El primer R-wzxC1mod fue modificado a partir del primer R-wzxC1 descrito en ³²

^b El primer Sense-60 se utiliza como forward con los primers antisense-i, -z10, -b, -eh, -lv y -r

^c El primer Sense-F1mod se utiliza como forward con los primers Antisense-R5mod, -R6, -R7 y -R1mod.

^d El primer Sense-Fe se utiliza como forward con los primers Antisense-Rx y -Rz15

^e Primers de secuenciación para los genes *purE* y *hemD*. No se emplean para realizar la amplificación de los genes.

Subrayado: secuencia que hibrida con el genoma de *Salmonella enterica*.

3.8.5. PCR para amplificar el gen *fliC*

La amplificación se realizó en un volumen total de reacción de 50 µL utilizando un kit comercial (Thermo Scientific). Se empleó 1 U de Taq polimerasa y 0,2 U de Pfu polimerasa (Thermo Scientific), 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y 0.25 µM de cada primer (Tabla 2), usando Taq Buffer con (NH₄)₂SO₄. Como molde se emplearon 2 µL del extracto de ADN.

El programa de ciclado es el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 s, 48°C por 45 s y 72°C por 1:30 min, y un ciclo final de extensión a 72°C por 3 min.

3.9. Secuenciación y análisis de la secuencia del gen *fliC*

Los productos de amplificación fueron purificados usando uno de dos métodos:

- Kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.
- Precipitación con etanol: 40 µL producto de PCR, 10 µL de acetato de sodio 3M, 50 µL agua y 250 µL etanol PPA, se mezcla por inversión y se incuba a -20°C por al menos 30 minutos. Se centrifuga 30 minutos a 20.000 g, se lava 2 veces con etanol 70% y se resuspende en agua.

La concentración y pureza del ADN fue evaluada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y por electroforesis en gel de agarosa.

Los productos fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto Pasteur de Montevideo utilizando los mismos primers de amplificación. Se analizaron las secuencias usando BioEdit. Posteriormente se realizó el alineamiento de las mismas contra la base de datos de *Salmonella* de la NCBI con la herramienta informática Nucleotide BLAST.

3.10. MLST

La amplificación de los genes *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* y *thrA* se realizó en un volumen de reacción de 50 µL, las reacciones se realizaron utilizando un kit comercial (Thermo Scientific) en Taq Buffer con (NH₄)₂SO₄, empleando una concentración de MgCl₂ de 3 mM, 0,2 mM de dNTPs, 0,3 µM de cada primer (Tabla 2), 1,25 U de Taq Polimerasa y 2 µL del extracto de ADN como molde.

Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 45 s, 55°C por 30 s y 72°C por 45 s, y un ciclo final de extensión de 72°C durante 5 min.

Los productos de PCR fueron purificados POR Uusando el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y luego se midió la concentración y pureza del ADN como se describió en el punto anterior. Los productos fueron secuenciados utilizando los mismos primers de amplificación o primers diseñados para la secuenciación, como se indica en la tabla2 para los genes *hemD* y *purE*, en el Servicio de Secuenciación Automática del Instituto Pasteur de Montevideo y las secuencias obtenidas se analizaron usando BioEdit. Las secuencias corregidas fueron ingresadas a la página de MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>) para obtener el perfil alélico de cada cepa y determinar su ST.

3.11. Visualización de los productos de PCR

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis unidireccional en geles de agarosa en buffer TBE 0,5X. Se corrieron 10 µL de los productos de PCR mezclados con 2 µL de DNA Loading Buffer 6X (Fermentas). Los geles se tiñeron con GelGreen (GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain, Biotium) y se visualizaron bajo luz UV utilizando un equipo automatizado de visualización y registro fotográfico (Gbox, Syngene, USA).

El tamaño de los fragmentos fue determinado por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific, GeneRuler™

100-bp DNA ladder) o 100 pb plus (Thermo Scientific, GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus) y con los productos obtenidos a partir de ADN de cepas control.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PCR *in silico* y selección de controles

Para seleccionar los controles positivos adecuados para la puesta a punto de las PCR múltiples, realizamos un análisis de los genomas que teníamos disponibles de una colección de cepas uruguayas que había sido previamente secuenciada. En aquellos casos donde no contábamos con las cepas secuenciadas, lo que se hizo fue descargar genomas de varias cepas que correspondieran al mismo serovar y realizar el análisis sobre esas secuencias. Para cada una de las cepas seleccionadas se realizó la PCR *in silico* con sus respectivos primers Forward y Reverse, comprobándose que los cebadores fueran específicos para una secuencia blanco dentro del gen esperado, y que los amplicones fueran de los tamaños esperados. En algunos casos, los tamaños de los amplicones varían ligeramente con respecto a los mencionados en la bibliografía. Éstos fueron corregidos y se muestran en la Tabla 3.

Además de realizarse el BLAST de los cebadores contra los genomas de los controles correspondientes, se hizo lo mismo contra la base de datos de *Salmonella* de NCBI para comprobar que éstos fueran específicos para los tipos antigénicos que tienen que amplificar y que no hibriden con otras

secuencias ya que esto podría dar lugar a productos inespecíficos en cepas donde no corresponde.

4.1.1. Evaluación *in silico* de primers para detección de tipos somáticos

El par de primers wzx-E1 está diseñado por Herrera-León et al. ³² para identificar cepas que pertenecen al serogrupo E, dentro del cual se encuentran los serogrupos E1 y E4. Aunque en ambos casos está presente el antígeno O:3, expresan de forma diferencial los antígenos O:10 y O:19, respectivamente.

Tras realizar la PCR *in silico* y el análisis de la secuencia de los productos de amplificación, se pudo comprobar que, tanto para las cepas que presentan antígenos O:3,10 (serogrupo E1) como para las que tienen antígenos O:3,19 (serogrupo E4), se obtiene un producto del mismo tamaño (344 pb) ya que la región donde hibridan los cebadores es común a ambos.

Los primers wzx-C2 descritos en ³² se encuentran descritos para amplificar un producto de 154 pb dentro del gen wzx de cepas que presentan antígenos somáticos de tipo C2. Sin embargo, pudimos determinar que en realidad dan un producto del tamaño esperado tanto para cepas que presentan antígenos O:6,8 (serogrupo C2), como para las que presentan

antígenos O:8 (serogrupo C3), es decir que lo que amplifican es un producto dentro del gen *wzx*, que es común para todas las cepas que montan antígenos O del tipo 8.

Por otra parte, el par de primers *tyv-D* fue diseñado para amplificar un producto de 615 pb dentro del gen *tyv* de cepas que presentan antígenos O:9 (serogrupo D). Sin embargo, aunque se obtiene un amplicón del tamaño esperado para las cepas que presentan el tipo somático O:9, en algunos casos también se obtiene un producto del mismo tamaño para cepas que presentan antígenos del tipo O:2 (serogrupo A), como por ejemplo cepas de los serovares Nitra, Koessen y Paratyphi A, ya que éstas presentan un gen *tyv* de secuencia muy similar. Si bien a la hora de diseñar los cebadores se tuvo en cuenta esta similitud entre los genes *tyv* de las cepas pertenecientes a serogrupos A y D y se generaron primers cuya secuencia blanco abarca la región donde la mayoría de estos genes presentan las diferencias, existen cepas del serogrupo A donde las mutaciones que inactivan el gen *tyv* se encuentran en otras regiones del mismo y, por lo tanto, los cebadores hibridan sin problemas y amplifican un producto que, por su tamaño, es indistinguible del que se obtiene en cepas con antígenos O:9.

En resumen, este método no permitiría diferenciar entre los serogrupos E1 y E4, entre C2 y C3, ni entre grupo D y A en algunos casos. Esto podría

presentarse como una limitación a la hora de determinar el serotipo de una cepa específica si existen dos serovares que tengan los mismos antígenos flagelares y solo se diferencien en su antígeno O.

En cuanto al par de cebadores *wzx*-B, las PCR *in silico* mostraron que, de acuerdo con lo esperado, hibridan dentro del gen *wzx* de las cepas que presentan antígenos O:4 y rinden un único producto de 229 pb, sin presentar reactividad cruzada con cepas de otros serogrupos.

Al realizar los BLAST para seleccionar controles del tipo somático C1 (O:6,7), se vio que el primer R-*wzx*C1 no hibridaba completamente con la secuencia blanco, sino que solamente es complementario de la base 4 a la 25 y tiene mismatches tanto en su extremo 5' como en el 3' (Fig. 5). Como es sabido, el extremo 3' tiene gran relevancia a la hora de realizar la PCR ya que es por donde la DNA polimerasa comienza a agregar los nucleótidos.

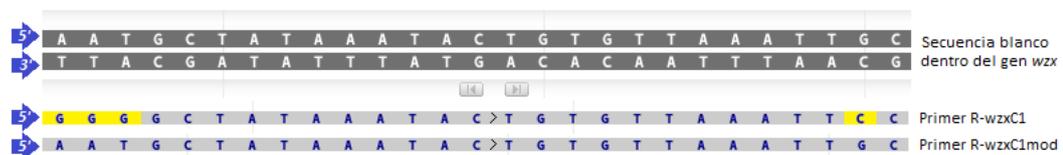


FIG. 5. Alineamiento de la secuencia de los primers R-*wzx*C1 y R-*wzx*C1mod contra su secuencia blanco dentro del gen *wzx* de los serovares con antígenos O:6,7. En amarillo se resaltan las bases del primer original que no son complementarias a la secuencia blanco.

Por este motivo, decidimos rediseñar este primer y generar uno que sea totalmente complementario a la secuencia blanco en el gen *wzx* de las cepas con antígenos O:6,7. Para ello analizamos secuencias de varias cepas que presentan dicho tipo somático (serovares Montevideo, Choleraesuis, Thompson, Livingstone, Infantis, Rubislaw) y comprobamos que la región donde hibrida este primer es muy conservada y específica para el tipo O:6,7. Por lo tanto, lo que hicimos fue cambiar las bases de los extremos 5' y 3' por las que son complementarias a la secuencia blanco, obteniéndose así el primer R-*wzxC1mod*, que es del mismo tamaño que el descrito en ³² y da un amplicón del tamaño esperado (Tabla 3).

TABLA 3. Resultados de las PCR in silico y selección de controles positivos

| Antígeno | Primer Forward | Primer Reverse | Tamaño del amplicón (pb) | Cepa control | Serovar de la Cepa control | |
|----------|---------------------|-----------------|----------------------------|--------------|----------------------------|-------------|
| O | 3 | F- <i>wzxE1</i> | R- <i>wzxE1</i> | 344 | UY032 | Anatum |
| | 4 | F- <i>wzxB</i> | R- <i>wzxB</i> | 229 | UY051 | Typhimurium |
| | 6,7 | F- <i>wzxC1</i> | R- <i>wzxC1</i> | 483 | UY137 | Livingstone |
| | 8 | F- <i>wzxC2</i> | R- <i>wzxC2</i> | 154 | UY081 | Hadar |
| | 9 | F- <i>tyvD</i> | R- <i>tyvD</i> | 615 | UY001 | Enteritidis |
| H1 | i | | Antisense-i | 253 | UY051 | Typhimurium |
| | r | | Antisense-r | 281 | UY085 | Heidelberg |
| | Z ₁₀ | Sense-60 | Antisense-Z ₁₀ | 448 | UY081 | Hadar |
| | b | | Antisense-b | 169 | UY136 | Paratyphi B |
| | eh | | Antisense-eh | 198 | UY032 | Anatum |
| | lv | | Antisense-lv | 327 | UY182 | Panama |
| | d | Forward-d | Reverse-d | 87 | SPE10 | Typhi |
| | G | Forward-G | Reverse-G | 509 | UY001 | Enteritidis |
| sdf | Forward-sdf-I | Reverse-sdf-I | 293 | UY001 | Enteritidis | |
| H2 | 1,2 | Sense-F1mod | Antisense-R1mod | 387 | UY051 | Typhimurium |
| | 1,5 | | Antisense-R5mod | 98 | UY182 | Panama |
| | 1,6 | | Antisense-R6 | 290 | UY032 | Anatum |
| | 1,7 | | Antisense-R7 | 190 | 35/10 | Bredeney |
| | lw | Sense-Fw | Antisense-Rw | 241 | UY137 | Livingstone |
| | e,n,x | Sense-Fe | Antisense-Rx | 56 | Hadar | Hadar |
| | e,n,Z ₁₅ | | Antisense-RZ ₁₅ | 135 | H9812 | Braenderup |

4.1.2. Evaluación *in silico* de primers para detección de tipos flagelares

En primer lugar, se realizaron las PCR *in silico* con los pares de primers que distinguen entre distintos antígenos flagelares de fase 1 (H1). En este caso, no observamos reactividad cruzada para otros tipos flagelares, sino que, para todos los casos, los cebadores hibridan dentro del gen *fliC* de cepas que presentan los antígenos H1 esperados.

Sin embargo, observamos algunas discrepancias en cuanto a los tamaños de los amplicones descritos en el trabajo de referencia ³¹ donde se establece que para cepas con antígenos H:G, H:z10, H:l,v, H:r, H:i, H:e,h, H:b, y H:d se obtienen amplicones de 500, 400, 300, 275, 250, 200, 150, y 100 pb, respectivamente. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas para cada caso, pudimos determinar que los tamaños reales de los amplicones son 509, 448, 327, 281, 253, 198, 169 y 87 pb, respectivamente. En cuanto al producto de amplificación de los cebadores sdf-I, obtuvimos un amplicón de 293 pb, mientras que el tamaño previsto era de 333 pb.

Si bien los tamaños de los amplicones difieren ligeramente de los establecidos en la bibliografía, esto no representa un problema a la hora de separar los productos de PCR en una electroforesis ya que las diferencias

de tamaño entre los distintos fragmentos son suficientes para distinguirlos como productos diferentes.

En segundo lugar, se realizaron las PCR *in silico* con los pares de primers que permiten la identificación de 7 tipos flagelares de fase II (H2).

Todos los primers ensayados hibridan dentro del gen *fljB* y son específicos para las regiones variables de los genes de cepas que expresan antígenos H2 del tipo esperado. No se observa reactividad cruzada excepto para las cepas que montan en su antígeno el factor 1 (explicado en detalle más adelante en esta sección).

En cuanto al tamaño de los amplicones existen ligeras diferencias entre nuestros resultados y lo establecido en la bibliografía ³⁰. Según el estudio que tomamos como referencia, se esperan amplicones de 400, 100, 300, 200, 250, 150 y 50 pb para los antígenos H:1,2, H:1,5, H:1,6, H:1,7, H:l,w, H:e,n,z₁₅, y H:e,n,x, respectivamente. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, los productos de amplificación deberían ser de 388, 98, 290, 190, 241, 135 y 56 pb, respectivamente.

Cuando se realizó el alineamiento de la secuencia del gen *fljB* de varios serovares con el primer reverse descrito como específico para el tipo H2: 1,2 (Antisense-R1mod), encontramos que en realidad es complementario a una secuencia conservada en todas las cepas que presentan antígeno H2

del complejo 1: 1,2 o 1,5 o 1,6 o 1,7 (Fig. 6). Debido a que para la amplificación de cualquiera de los tipos H2 del complejo 1 se utiliza el mismo primer forward (Sense-F1mod), previmos que las cepas con antígenos 1,5, o 1,6 o 1,7 pueden rendir dos productos de amplificación en la PCR múltiple: un producto de 387 pb que corresponde al factor “1”, y un producto de 98, 290 o 190 pb que corresponde a los factores “5”, “6” o “7”, respectivamente.

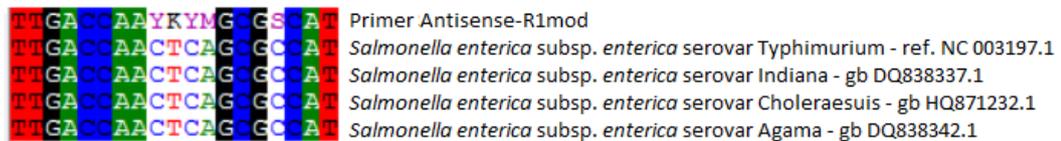


FIG. 6. Alineamiento de la secuencia del primer Antisense-R1mod contra su secuencia blanco en el gen *fljB* de los serovares Typhimurium, Indiana, Choleraesuis y Agama. Se muestran esos serovares como representativos para los antígenos flagelares de fase II 1,2; 1,7; 1,5 y 1,6, respectivamente. Para todos los casos se observa que la región donde hibrida el cebador es conservada.

Teniendo en cuenta los resultados de las PCR *in silico* pudimos seleccionar controles positivos adecuados para la puesta a punto de las tres reacciones de PCR múltiple. Estos resultados se presentan en la Tabla 3.

4.2. Puesta a punto de las reacciones de PCR múltiples

Una vez que contamos con controles adecuados para cada una de las reacciones de PCR se procedió a su puesta a punto. En primer lugar, se realizaron las PCR para cada control por separado con su par de primers específico para verificar los resultados de las PCR *in silico* y comprobar que los primers funcionaran en las condiciones establecidas. Una vez que se ajustaron las condiciones para obtener productos de amplificación para todos los controles, se procedió a realizar las PCR múltiples, esto es, usando una mezcla de todos los primers para cada una de las reacciones y, de ser necesario, se volvió a ajustar las condiciones para obtener los productos esperados y reducir la cantidad de productos inespecíficos cuando éstos estuvieran presentes.

4.2.1. PCR múltiple para identificar tipos somáticos

Se partió de las condiciones descritas en ³², obteniéndose productos de amplificación de los tamaños esperados para los controles B, C2, D y E pero no se observa producto para el control C1 (Fig. 7). Este resultado era esperable, ya que en el análisis inicial de secuencias se vio que el primer R-wzxC1 no hibrida con su secuencia blanco en el extremo 3'.

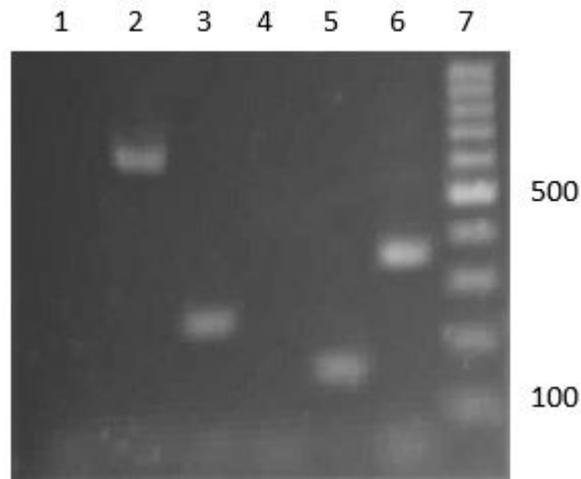


FIG. 7. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para identificación de tipos somáticos. 1) Control negativo; 2) *S. Enteritidis* (O:9); 3) *S. Typhimurium* (O:4); 4) *S. Livingstone* (O:7); 5) *S. Hadar* (O:6,8); 6) *S. Anatum* (O:3); 7) GeneRuler 100-bp DNA ladder

Se realizaron cambios en las condiciones de PCR para que la misma fuese menos específica y así obtener productos para el tipo somático C1. Dichas modificaciones consistieron en el aumento de la concentración de $MgCl_2$ a 3 mM, aumento de la concentración de primers F- y R-wzxC1 a $0,5\mu M$ y reducción de la temperatura de apareamiento a $56^\circ C$. Bajo estas condiciones se obtuvo de forma exitosa la amplificación de todos los productos.

De todas formas, decidimos rediseñar el primer R-wzxC1 para que fuera 100% complementario a su secuencia blanco, y al realizar la PCR múltiple con el nuevo primer se logró obtener productos de amplificación para todos los controles (Fig. 8) en condiciones de mayor especificidad (2 mM de $MgCl_2$) y menor concentración del par de primers wzxC1 ($0.2\mu M$), así como

una temperatura de annealing de 58°C, lo que permite realizar esta PCR usando el mismo programa de ciclado que las que detectan los tipos flagelares de fase I y II, y, por lo tanto, realizar las tres PCR a la vez en el mismo termociclador.

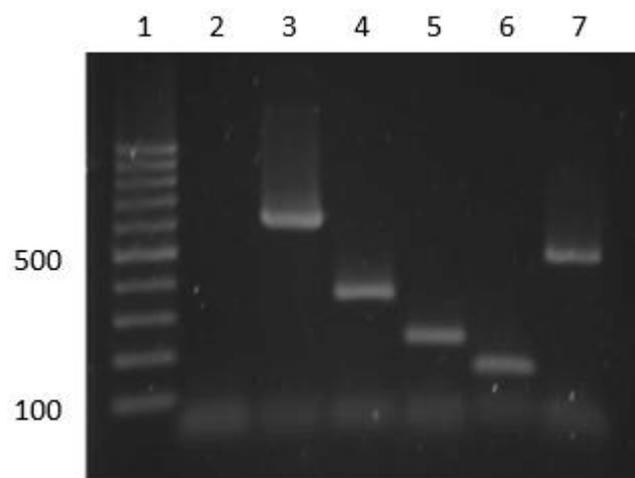


FIG. 8. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR obtenidos para los controles de los 5 tipos somáticos: 1) GeneRuler 100-bp DNA ladder; 2) Control negativo; 3) *S. Enteritidis* (O:9); 4- *S. Anatum* (O:3,10); 5) *S. Typhimurium* (O:4); 6) *S. Hadar* (O:6,8); 7) *S. Livingstone* (O:7).

Estas condiciones son las que se emplearon para la identificación de los tipos somáticos de la colección de cepas problema.

4.2.2. PCR múltiple para identificar tipos flagelares fase I

En primer lugar, se realizó la PCR con el par de primers específico para cada control en las condiciones descritas en ³¹, obteniéndose productos de amplificación para todos los controles positivos, por lo que no fue necesario

realizar modificaciones en el protocolo. Al hacer la PCR múltiple, observamos que, aunque todos los controles presentaban sus productos específicos, los controles b, d, G y lv mostraban bandas más tenues, indicando una menor cantidad de producto. Por esta razón se decidió aumentar la concentración de sus primers específicos a 0.3 μ M. Como resultado obtuvimos productos de amplificación del tamaño esperado para los 8 controles y sin productos inespecíficos (Fig. 9), por lo que mantuvimos estas condiciones de PCR para la identificación de los tipos flagelares de fase I.

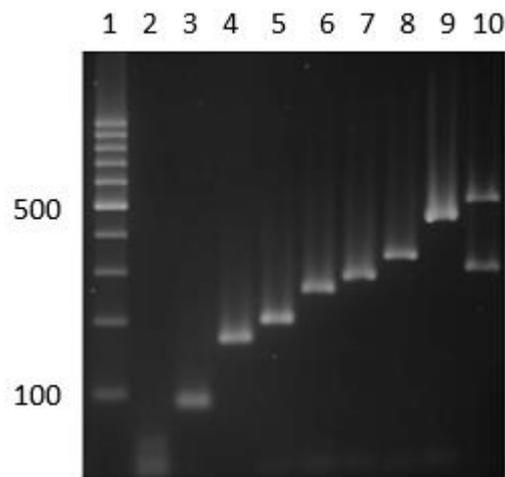


FIG. 9. Electroforesis en gel de agarosa 2,5% de los productos de PCR obtenidos para cada uno de los controles de 8 tipos flagelares de primera fase: 1) GeneRuler 100-bp DNA ladder; 2) Control negativo; 3) *S. Typhi* (H:d); 4) *S. Paratyphi B* (H:b); 5) *S. Anatum* (H:e,h); 6) *S. Typhimurium* (H:i); 7) *S. Heidelberg* (H:r); 8) *S. Panama* (H:l,v); 9) *S. Hadar* (H:z₁₀); 10) *S. Enteritidis* (H:G), sdf.

4.2.3. PCR múltiple para identificar tipos flagelares de fase II

En principio se realizó la PCR para cada uno de los controles solamente con sus primers específicos bajo las condiciones descritas en ³⁰ y para cada uno de ellos obtuvimos los productos de amplificación del tamaño esperado (Fig. 10).

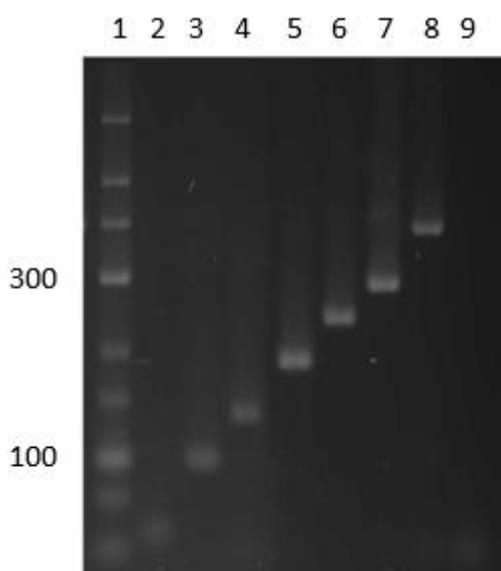


FIG. 10. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de los productos de PCR para los tipos flagelares de fase II. 1) GeneRuler Low range DNA ladder; 2) *S. Hadar* (H:e,n,x); 3) *S. Panama* (H:1,5); 4) *S. Branderup* (H:e,n,z₁₅); 5) *S. Bredeney* (H:1,7); 6) *S. Livingstone* (H:l,w); 7) *S. Anatum* (H:1,6); 8) *S. Typhimurium* (H:1,2); 9) Control negativo.

Luego se procedió a realizar la PCR múltiple con todos los pares de primers (Fig. 11) y, tras ajustar la concentración de algunos de los primers hasta obtener los productos esperados para todos los controles, observamos que *S. Anatum* (H:1,6) y *S. Panama* (H:1,5) presentan dos bandas en el gel,

una del tamaño esperado para cada uno, y otra de aproximadamente 400 pb, que coincide con lo esperado para un antígeno flagelar del tipo 1,2. Esto se corresponde con los resultados de la PCR *in silico*, donde se vio que el primer Antisense-R1mod hibrida de forma específica con una región conservada del gen *fljB* de todas las cepas que presentan antígenos flagelares fase II de tipo 1.

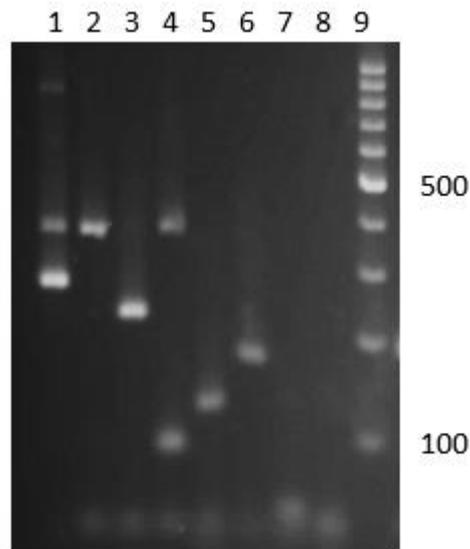


FIG. 11. Electroforesis en gel de agarosa 2,5% de los productos de PCR obtenidos para cada uno de los controles de 7 tipos flagelares de segunda fase. 1) *S. Anatum* (H:1,6); 2) *S. Typhimurium* (H:1,2); 3) *S. Livingstone* (H:l,w); 4) *S. Panama* (H:1,5); 5) *S. Branderup* (H:e,n,z₁₅); 6) *S. Bredeney* (H:1,7); 7) *S. Hadar* (H:e,n,x); 8) C (-); 9) GeneRuler 100-bp DNA ladder.

Como el primer Sense-R1mod se usa como forward para los tipos 1,2; 1,5; 1,6 y 1,7; es lógico que, en los tres últimos casos, al realizar la PCR múltiple se observen dos productos de amplificación.

Esto se verificó a nivel experimental realizando dos PCR diferentes a cada uno de los controles (Fig. 12). En la primera (Fig.12-A) solo se usaron los primers Sense-F1mod y Antisense-R1mod y para las 4 muestras se observó un producto de 387 pb, confirmando así los resultados del análisis de secuencias. En la segunda PCR (Fig. 12-B) se realizó la amplificación en presencia de los primers Sense-F1mod, Antisense-R1mod, Antisense-R5mod, Antisense-R6 y Antisense-R7. En todos los casos se obtuvo el producto de 387 pb, además de los productos específicos para los tipos 1,5, 1,6 y 1,7.

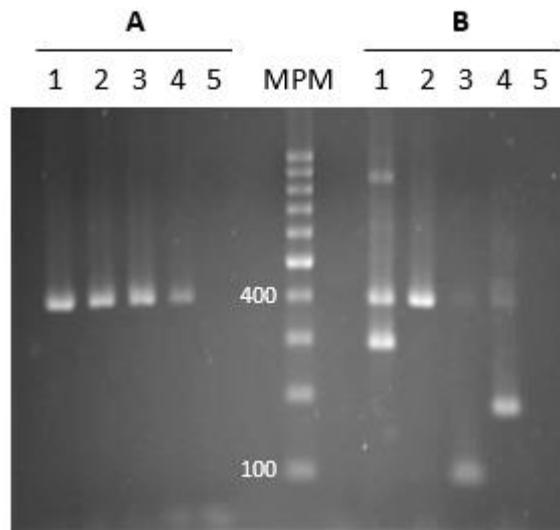


FIG. 12. Electroforesis en gel de agarosa 2,5% de los productos de PCR. **(A)** PCR con los primers Sense-F1mod y Antisense-R1mod. 1) *S. Anatum* (H:1,6), 2) *S. Typhimurium* (H:1,2), 3) *S. Panama* (H:1,5), 4) *S. Bredeney* (H:1,7), 5) Control Negativo. MPM: GeneRuler 100-bp DNA ladder. **(B)** PCR múltiple con los primers Sense-F1mod, Antisense-R1mod, Antisense-R5mod, Antisense-R6 y Antisense-R7. 1) *S. Anatum* (H:1,6), 2) *S. Typhimurium* (H:1,2), 3) *S. Panama* (H:1,5), 4) *S. Bredeney* (H:1,7), 5) Control Negativo.

Estos resultados indican que el producto de 387 pb es específico para todos los *fljB* que codifican para antígenos H del tipo 1 y que, por lo tanto, por más que ajustemos las condiciones de la PCR lo vamos a seguir obteniendo. En base a esto, tomaremos como positivo para 1,5, 1,6 y 1,7 aquellos casos donde se obtenga una banda del tamaño esperado para dichos tipos flagelares, independientemente de si presentan o no una segunda banda del tamaño del control 1,2. Se tomará como 1,2 aquellas cepas que presenten una única banda de 387 pb.

4.3. Serotipificación de la colección de cepas bolivianas por el método basado en 3 PCR múltiples

Se aplicó el método de PCR múltiple a 58 cepas de *Salmonella*: para cada cepa se hicieron las 3 PCR y luego se compararon los tamaños de los productos obtenidos (en caso de presentarlos) con los controles positivos para así determinar el tipo somático, flagelar de fase I y II de cada cepa. Con esta información y contrastándola contra el esquema de Kauffman White Le-Minor ¹ se pudo determinar el serovar de 38 de las 58 cepas. Los 20 aislamientos restantes no pudieron ser completamente caracterizados por no presentar productos de amplificación para al menos uno de los 3 antígenos, indicándose como indeterminados. Los resultados obtenidos para cada una de las cepas se presentan en la Tabla 4.

Este método basado en PCR permitió la identificación de 9 serovares diferentes dentro de la colección (Infantis, Enteritidis, Typhimurium, Saintpaul, Bredeney, Paratyphi B, Newport, Litchfield y Panama).

De los 20 aislamientos cuyo serovar no pudo ser determinado por esta metodología (marcados como indeterminado en la tabla 4), en 17 se obtuvo el grupo somático, pero no se logró identificar el tipo flagelar completo. En los 3 restantes, no se obtuvo amplificación para ninguno de los tipos somáticos.

Entre los “indeterminados”, 11 cepas presentan antígenos flagelares de fase I del complejo G, pero no amplifican ningún producto en la PCR flagelar de segunda fase y son distintos de Enteritidis (negativos para la PCR de sdf). Para completar la caracterización de estas cepas es necesario discriminar entre los factores que componen el complejo G y mediante el método aplicado esto no es posible.

Otros 6 aislamientos quedaron como indeterminados porque no presentan producto de amplificación para su antígeno flagelar de fase I y por este motivo no se pudo identificar su serovar. Uno de estos aislamientos (SBO-29) tampoco presenta producto para su antígeno flagelar de fase II.

Para los casos en que no detectamos productos de primera fase o que resultaron pertenecer al complejo G, lo que hicimos fue amplificar el gen *fliC* (que codifica para la flagelina de fase I) completo y secuenciarlo para completar la caracterización de estas cepas. Por otra parte, se realizó serología utilizando antisueros que cubren otros tipos antigénicos que no están contemplados en la PCR.

TABLA 4. Resultados de PCR múltiples

| Cepa | Resultados PCR | | | Predicción serovar |
|--------|----------------|--------|---------------------|--------------------|
| | Ag. O | Ag. H1 | Ag. H2 | |
| SBO-1 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-2 | 4 | i | 1,2 | Typhimurium |
| SBO-3 | 4 | G | - | indeterminado |
| SBO-4 | 9 | - | 1,5 | indeterminado |
| SBO-5 | 4 | G | - | indeterminado |
| SBO-6 | 4 | eh | 1,2 | Saintpaul |
| SBO-7 | 4 | i | 1,2 | Typhimurium |
| SBO-8 | 4 | eh | 1,2 | Saintpaul |
| SBO-9 | - | d | e,n,Z ₁₅ | indeterminado |
| SBO-10 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-11 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-12 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-13 | - | i | - | indeterminado |
| SBO-14 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-15 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-16 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-17 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-18 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-19 | 4 | lv | 1,7 | Bredeney |
| SBO-20 | 9 | - | 1,5 | indeterminado |
| SBO-21 | 9 | - | 1,5 | indeterminado |
| SBO-22 | 6,7 | G | - | indeterminado |
| SBO-23 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-24 | 6,7 | - | 1,5 | indeterminado |
| SBO-25 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-26 | 6,7 | G | - | indeterminado |
| SBO-27 | - | i | - | indeterminado |
| SBO-28 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-29 | 6,8 | - | - | indeterminado |
| SBO-30 | 9 | G, sdf | - | Enteritidis |
| SBO-31 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-32 | 4 | lv | 1,7 | Bredeney |
| SBO-33 | 4 | i | 1,2 | Typhimurium |
| SBO-34 | 4 | G | - | indeterminado |
| SBO-35 | 4 | i | 1,2 | Typhimurium |
| SBO-36 | 9 | G, sdf | - | Enteritidis |
| SBO-37 | 9 | G, sdf | - | Enteritidis |
| SBO-38 | 6,7 | G | - | indeterminado |
| SBO-39 | 4 | i | 1,2 | Typhimurium |
| SBO-40 | 6,7 | G | - | indeterminado |
| SBO-41 | 9 | G, sdf | - | Enteritidis |
| SBO-42 | 9 | lv | 1,5 | Panama |
| SBO-43 | 9 | - | 1,5 | indeterminado |
| SBO-44 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-45 | 4 | b | 1,2 | Paratyphi B |
| SBO-46 | 4 | G | - | indeterminado |
| SBO-47 | 3 | G | - | indeterminado |
| SBO-48 | 4 | G | - | indeterminado |
| SBO-49 | 4 | i | 1,2 | Typhimurium |
| SBO-50 | 4 | i | 1,2 | Typhimurium |
| SBO-51 | 6,8 | eh | 1,2 | Newport |
| SBO-52 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-53 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-56 | 3 | G | - | indeterminado |
| SBO-57 | 6,8 | lv | 1,2 | Litchfield |
| SBO-58 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-59 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-60 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |

Cuando no se obtuvo ningún producto de amplificación en las PCR, el resultado se indica como –

Los 3 aislamientos restantes, no presentan productos de amplificación en la PCR para determinación de grupo somático O y para dos de ellos tampoco pudimos identificar su tipo flagelar de fase II. Para caracterizar estas cepas utilizamos el método serológico convencional. Por otra parte, realizamos la amplificación y secuenciación de algunos de los genes incluidos en el esquema de tipificación por MLST para *S. enterica* ⁴³.

4.4. Amplificación y secuenciación del gen *fliC*

Se realizó la amplificación y secuenciación del gen *fliC* completo de las 11 cepas que dieron positivo para antígenos flagelares de fase I del complejo G, así como para aquellas para las que no obtuvimos producto de amplificación para el antígeno flagelar de fase I. En la Fig. 13 se muestran los resultados de la amplificación del gen *fliC* de algunas de estas cepas.

En todos los casos obtuvimos un producto de alrededor de 1500 pb, excepto para la cepa SBO-29 que presenta un *fliC* de tamaño menor que ronda los 1200 pb. Un *fliC* de ese tamaño podría indicar que esta cepa presenta un antígeno H1 del complejo z4 ¹⁴. Esto concuerda con un resultado negativo de la PCR para detectar tipos flagelares de fase I ya que ésta no incluye cebadores para detectar antígenos de ese tipo.

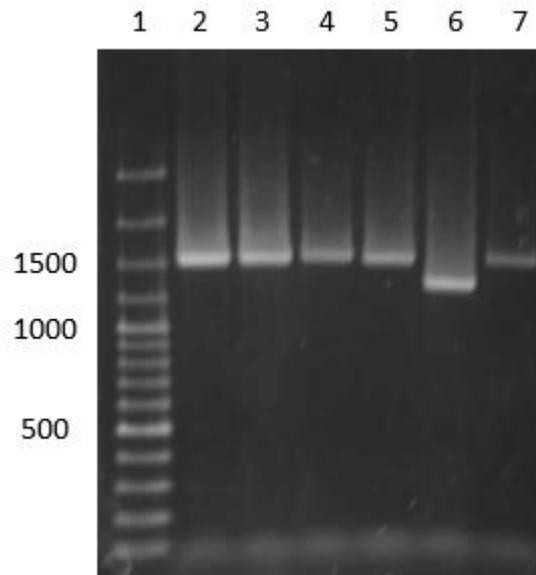


FIG. 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del gen *fliC*. 1) Marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus, 2) SBO-4, 3) SBO-20, 4) SBO-21, 5) SBO-24, 6) SBO-29, 7) SBO-43.

Además, realizamos la PCR *FliC in silico*, contra la base de datos de *Salmonella* (NCBI) para comprobar que los tamaños de los amplicones obtenidos estuvieran dentro de lo esperado. De esta manera pudimos verificar que la gran mayoría de los serovares presentan un *fliC* de alrededor de 1500 pb, excepto aquellos que montan antígenos flagelares del complejo z4, como Albany (8,20:z4,z24:–), Djakarta (48:z4,z24:–) y Cerro (6,14,18:z4,z23:[1,5]), entre otros, que presentan un gen *fliC* de 1289 pb para los dos primeros y 1277 pb para el último (Fig. 14).

>[CP019177.1](#) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Albany str. ATCC 51960, complete genome

```
product length = 1289
Forward primer 1      GATCATGGCACAAGTCATTA 20
Template       1992984 ..... 1993003

Reverse primer 1      CGGATTAACGCAGTAAAGAG 20
Template       1994272 ..... 1994253
```

>[CP008925.1](#) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Cerro strain 87, complete genome

```
product length = 1277
Forward primer 1      GATCATGGCACAAGTCATTA 20
Template       187481 ..... 187500

Reverse primer 1      CGGATTAACGCAGTAAAGAG 20
Template       188757 ..... 188738
```

>[CP019409.1](#) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Djakarta str. S-1087, complete genome

```
product length = 1289
Forward primer 1      GATCATGGCACAAGTCATTA 20
Template       2072490 ..... 2072471

Reverse primer 1      CGGATTAACGCAGTAAAGAG 20
Template       2071202 ..... 2071221
```

FIG. 14. Resultados de PCR *in silico* con los primers FliC5 y FliC6 para cepas con antígenos H1 del complejo z4 (Albany, Cerro y Djakarta). Se puede observar que los cebadores hibridan completamente con el DNA molde y que se obtienen amplicones de entre 1200 y 1300 pb.

Una vez que contamos con las secuencias, éstas fueron analizadas usando la herramienta informática BioEdit y luego se realizó un BLAST contra la base de datos de *Salmonella* (NCBI) para investigar su homología con otras secuencias de este gen y determinar el tipo flagelar de fase I que presenta cada una de las cepas estudiadas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.

Para SBO-29 no logramos obtener una secuencia de calidad aceptable y no se continuó con su estudio en esta parte del trabajo.

TABLA 5. Resultados de la secuenciación del gen *fliC*

| Cepa ^a | Tipo flagelar de fase I ^b | % de homología con cepas de referencia ^c | Predicción de serovar ^d | Fórmula antigénica en el esquema KW ^e |
|-------------------|--------------------------------------|---|------------------------------------|--|
| SBO-03 | f,g | 100% | Derby | <u>1</u> ,4,[5],12 : f,g : [1,2] |
| SBO-04 | l,z ₂₈ | 99% | Javiana | <u>1</u> ,9,12 : l,z ₂₈ : 1,5 |
| SBO-05 | f,g | 100% | Derby | <u>1</u> ,4,[5],12 : f,g : [1,2] |
| SBO-20 | l,z ₂₈ | 100% | Javiana | <u>1</u> ,9,12 : l,z ₂₈ : 1,5 |
| SBO-21 | l,z ₂₈ | 100% | Javiana | <u>1</u> ,9,12 : l,z ₂₈ : 1,5 |
| SBO-22 | m,t | 100% | Oranienburg | 6,7, <u>14</u> : m,t : - |
| SBO-24 | k | 99% | Thompson | 6,7, <u>14</u> : k : 1,5 |
| SBO-26 | m,t | 100% | Oranienburg | 6,7, <u>14</u> : m,t : - |
| SBO-34 | f,g,s | 100% | Agona | <u>1</u> ,4,[5],12 : f,g,s : - |
| SBO-38 | m,t | 100% | Oranienburg | 6,7, <u>14</u> : m,t : - |
| SBO-40 | m,t | 100% | Oranienburg | 6,7, <u>14</u> : m,t : - |
| SBO-43 | l,z ₂₈ | 99% | Javiana | <u>1</u> ,9,12 : l,z ₂₈ : 1,5 |
| SBO-46 | f,g,s | 99% | Agona | <u>1</u> ,4,[5],12 : f,g,s : - |
| SBO-47 | g,s,t | 99% | Senftenberg | 1,3,19 : g,[s],t : - |
| SBO-48 | f,g,s | 99% | Agona | <u>1</u> ,4,[5],12 : f,g,s : - |
| SBO-56 | g,s,t | 100% | Senftenberg | 1,3,19 : g,[s],t : - |

En la tabla se presentan los resultados del análisis de secuencias del gen *fliC*.

a- Se indica la identificación de la cepa, incluyendo las 16 cepas para las que se obtuvo una secuencia de buena calidad.

b- Se indica el tipo de antígeno H predicho en base al análisis de la secuencia de la región variable de su gen *fliC*.

c- Muestra el mayor % de homología obtenido entre nuestras secuencias y las secuencias del *fliC* de cepas de serovar conocido que se encuentran disponibles en la base de datos de la NCBI.

d- Indica el serovar predicho a partir de los resultados previos obtenidos por PCR y el antígeno H1 determinado por secuenciación.

e- Indica la fórmula antigénica planteada en el esquema de Kauffman-White-Le Minor para los serovares predichos.

En cada caso, al realizar los alineamientos contra la base de datos, nuestras secuencias presentaron porcentajes de homología elevados (de 99 o 100%) con cepas de un único serovar. La fórmula antigénica de estos serovares es compatible con los resultados obtenidos por PCR para nuestras cepas coincidiendo con tipos flagelares que no podían

discriminarse por el método de PCR y siendo compatible con los grupos somáticos detectados previamente.

El análisis de las secuencias confirmó que 11 de las cepas efectivamente presentaban antígenos flagelares de fase I que corresponden a distintas variantes dentro del complejo G, y permitió su completa caracterización. Dentro de éstas encontramos los serovares Derby, Agona, Oranienburg y Senftenberg, que presentan antígenos H1 de tipo f,g; f,g,s; m,t y g,s,t, respectivamente (Tabla 5).

Además, realizamos un alineamiento de las secuencias de las cepas del complejo flagelar G y observamos que las secuencias del gen *fliC* de las cepas que pertenecen a un mismo serotipo se encuentran muy conservadas, mientras que entre los distintos serovares se observa una mayor variabilidad. Existe una alta homología entre las secuencias del *fliC* de Agona, Senftenberg y Derby, las cuales montan antígenos G compuestos por factores similares (f,g,s, g,s,t y f,g, respectivamente). El *fliC* de cepas de serovar Oranienburg, no es tan similar al de los mencionados anteriormente. Esto es coherente ya que Oranienburg monta un antígeno H1 del tipo m,t y la región del gen que codifica para el factor “m” es la que muestra las diferencias más grandes con los *fliC* de los demás serovares del complejo G analizados.

Por otro lado, para las 5 cepas que no presentaron producto de amplificación en la PCR flagelar de primera fase, la secuencia de su gen *fliC* reveló que tienen antígenos H1 que no se encuentran cubiertos por la PCR. Una cepa (SBO-24) presentó una secuencia idéntica a la de serovar Thomson (antígeno flagelar k) y 4 cepas (SBO-4, 20, 21 y 43) presentaron una secuencia *fliC* idéntica a la de serovar Javiana (antígeno I,z₂₈).

Se puede decir entonces que existe coherencia entre los resultados obtenidos por ambos métodos y que éstos nos dan información complementaria. Las técnicas de PCR combinadas con la secuenciación del gen *fliC* permitieron la completa caracterización de un total de 54 cepas de 15 serovares diferentes, quedando aún por determinar el serovar de 4 de los aislamientos (SBO-9, 13, 27 y 29).

4.5. Serología

Se realizó serología clásica a un conjunto representativo de cepas de distintos serovares que fueron completamente identificados por las técnicas de PCR y secuenciación, para comparar los resultados obtenidos por los distintos métodos. Además, se incluyeron aquellas cepas cuyo perfil antigénico no pudo ser completado por los métodos moleculares.

Los ensayos de aglutinación fueron realizados con un set de antisueros que abarcan tanto los antígenos que se encuentran cubiertos por las PCR como algunos antígenos para los cuales no contamos con primers para amplificar.

Los resultados obtenidos con esta técnica se resumen en la Tabla 6. Se puede observar que todos los antígenos que fueron determinados por este método coinciden con los obtenidos mediante técnicas moleculares. Sin embargo, para algunas de las cepas pudimos detectar su tipo antigénico por PCR, pero no se logró la aglutinación con ninguno de los antisueros disponibles. Esto puede deberse a que, en estas cepas, la expresión de los antígenos es débil o que directamente no los están expresando, como puede ser el caso de los antígenos flagelares que se expresan de forma alternativa. En estos casos, sería necesario inhibir la fase que se está expresando para así inducir la expresión de la otra.

TABLA 6. Resultados de las pruebas serológicas

| Cepa | Resultados aglutinación | | | Predicción Serovar |
|--------|-------------------------|-------------|-------------|--------------------|
| | Antígeno O | Antígeno H1 | Antígeno H2 | |
| SBO-2 | 4 | i | - | Indeterminado |
| SBO-4 | 9 | l | - | Indeterminado |
| SBO-9 | - | d | - | Indeterminado |
| SBO-11 | 6,7 | r | 1,5 | Infantis |
| SBO-13 | - | - | - | Indeterminado |
| SBO-19 | 4 | l,v | 1,7 | Bredeney |
| SBO-24 | - | - | - | Indeterminado |
| SBO-27 | - | i | - | Indeterminado |
| SBO-29 | 8 | - | - | Indeterminado |
| SBO-30 | 9 | g,m | - | Enteritidis |
| SBO-42 | 9 | l,v | 1,5 | Panama |
| SBO-47 | 3,19 | g,s,t | - | Senftenberg |
| SBO-51 | 6,8 | eh | 1,2 | Newport |
| SBO-56 | 3,19 | g,s,t | - | Senftenberg |

Las cepas que no presentaron productos de amplificación en alguna de las PCR múltiples, tampoco aglutinaron con ninguno de los antisueros disponibles. Esto indicaría que presentan tipos antigénicos poco comunes y que no están cubiertos por ninguno de los dos métodos.

En cuanto a los aislamientos que presentan antígenos flagelares de tipo 1 del complejo G, el método serológico permitió la identificación de los distintos factores que conforman dicho antígeno, y, por lo tanto, la completa

caracterización de esas cepas, obteniéndose los mismos resultados que al realizar el análisis de la secuencia del gen *fliC*.

En resumen, el método serológico permitió confirmar los resultados obtenidos por PCR, pero presenta limitaciones a la hora de detectar algunos de los antígenos, posiblemente debido a problemas en su expresión. Por otra parte, aporta información valiosa a la hora de determinar los antígenos flagelares de primera fase del complejo G, permitiendo la caracterización de las cepas que los presentan y que quedaron indeterminadas por PCR. Estos resultados se correlacionan bien con los obtenidos por el análisis de secuencias del gen *fliC*.

4.6. Pruebas bioquímicas

Tras realizar un análisis de los posibles serovares a los cuales podrían pertenecer las cepas SBO-13 y SBO-27 basado en el esquema de Kauffman-White-Le Minor y asumiendo que un resultado negativo de las PCR y de la serología se debe a que el antígeno expresado por la cepa es uno que no está cubierto por estos métodos; decidimos realizar una serie de pruebas bioquímicas que nos permitirían discriminar entre subespecies, ya que era probable que estas cepas no pertenecieran a la subespecie *enterica* y que ese fuera el motivo por el cual no las estaríamos pudiendo identificar. Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas se resumen en la Tabla 7.

TABLA 7. Resultados de las pruebas bioquímicas

| Pruebas Bioquímicas | | SBO-13 | SBO-27 |
|---------------------|----------|--------|--------|
| Fenilalanina | | - | No |
| Descarboxilasas | Lisina | + | + |
| | Ornitina | + | + |
| | Arginina | - | - |
| Azúcares | Sorbitol | + | + |
| | Manitol | + | + |
| | Maltosa | + | + |
| | Malonato | + | + |
| | Dulcitol | - | - |
| | Salicina | - | - |
| Urea | | - | - |

Todas las pruebas dan un resultado compatible con el género *Salmonella*, pero no así para la subespecie enterica. En particular en la capacidad para producir ácido a partir de distintos azúcares, obtuvimos resultados negativos para la prueba de dulcitol y positivo para manitol. Esto indica que SBO-13 y SBO-27 podrían pertenecer tanto a *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae* (IIIb) o *Salmonella enterica* subesp. *arizonae* (IIIa). A partir de las pruebas realizadas no es posible distinguir entre ambas subespecies y no disponemos de las pruebas necesarias para diferenciarlas. Realizamos entonces una revisión del esquema de Kauffman-White-Le Minor para los posibles serovares a los cuales podrían pertenecer: serovares con antígeno H1:i y con antígenos O y H2 que no estuvieran cubiertos por el método de PCR ni de serología. A partir de esto determinamos que podrían tratarse de aislamientos de *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae*, ya que no existen serovares de la subespecie *arizonae* que presenten esas características. Estas cepas fueron incluidas para completar su caracterización por secuenciación de algunos genes de MLST ya que resulta interesante que provengan de muestras humanas de líquido cefalorraquídeo y restos endocervicales, siendo que estas subespecies se encuentran mayormente asociadas a aislamientos de muestras ambientales o animales de sangre fría.

4.7. MLST

Se incluyeron para el análisis algunos genes de MLST de las cuatro cepas que no pudieron ser caracterizadas por los demás métodos ensayados, así como 6 cepas que fueron identificadas como *Infantis* mediante PCR. Dentro de estas últimas, se eligieron aislamientos obtenidos de fuentes humanas y alimentarias y que pertenecen a distintos períodos de tiempo para ver si pertenecen todas al mismo ST y si este corresponde al ST mayoritario para *Infantis* (ST 32) o no.

TABLA 8. Resultados de MLST y predicción de serovares

| Cepa | Alelos | | | Predicción de Serovar |
|--------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|
| | <i>hemD</i> | <i>purE</i> | <i>sucA</i> | |
| SBO-9 | 309 | - | - | Nottingham |
| SBO-13 | 30 | 141 | - | Indeterm. (subesp IIIb) |
| SBO-17 | 22 | - | 21 | <i>Infantis</i> |
| SBO-27 | - | 141 | - | Indeterm. (subesp IIIb) |
| SBO-28 | 22 | - | 21 | <i>Infantis</i> |
| SBO-29 | 10 | - | - | Corvallis |
| SBO-44 | 22 | - | 21 | <i>Infantis</i> |
| SBO-52 | 22 | - | 21 | <i>Infantis</i> |
| SBO-53 | 22 | - | 21 | <i>Infantis</i> |
| SBO-58 | 22 | - | 21 | <i>Infantis</i> |

En la tabla se muestran los alelos obtenidos para los genes estudiados (*hemD*, *purE* y *sucA*) y la predicción de serovar lograda a partir de la información que aportaron los diferentes métodos ensayados para cada cepa.

Se amplificaron y secuenciaron los genes *hemD*, *purE* y/o *sucA* de las cepas mencionadas previamente, obteniéndose un número de alelo para

cada caso. Los resultados obtenidos para los genes de MLST que fueron secuenciados se presentan en la Tabla 8.

El alelo 309 para *hemD* se encuentra descrito únicamente en cepas de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Nottingham (16:d:e,n,z₁₅). Este resultado tiene sentido y concuerda con los resultados obtenidos por PCR y por serología para SBO-9, ya que no contamos con cebadores ni antisueros para detectar el antígeno O:16 y los antígenos flagelares de fase I y II que presentan las cepas de este serovar coinciden con los determinados por PCR para SBO-9.

Las cepas del serovar Nottingham encontradas en la EnteroBase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>) pertenecen a uno de dos ST, el 1640 o el 2658, que se diferencian únicamente en su alelo de *hisD*. Para completar la caracterización de SBO-9 y definir su ST, sería necesario secuenciar el resto de los genes, pero especialmente el *hisD* ya que sería el que aporta más información. Lamentablemente, la secuencia obtenida para este gen no tuvo la calidad necesaria para asignar un alelo y debe ser repetida.

Por otro lado, SBO-13 y SBO-27 presentan los alelos 30 y 141 para *hemD* y *purE*, respectivamente. Las cepas encontradas en la EnteroBase con estos alelos pertenecen a las subespecies *arizonae* o *diarizonae*, lo que concuerda con los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas. Existe

un ST (1256) que tiene estos alelos y que además su fórmula antigénica (48:i:z) coincide con los resultados obtenidos por PCR. Este ST está asociado principalmente a aislamientos humanos (16 de los 18 que se encuentran en la EnteroBase) aunque también incluye dos aislamientos de reptiles. Hasta el momento no existen reportes de aislamientos de este ST para Sudamérica, por lo que sería importante completar esta caracterización. Por otra parte, cuando intentamos amplificar el gen *dnaN* de SBO-13 y SBO-27 no logramos obtener productos de PCR. El alineamiento de los primers *dnaN* con las secuencias de cepas de este ST muestra que presentan diferencias nucleotídicas con respecto al primer reverse, que pueden explicar la falta de amplificación. Esto nos da otro motivo para pensar que SBO-13 y SBO-17 pueden efectivamente pertenecer al ST 1256. De cualquier manera, para determinar si nuestras cepas pertenecen a este ST, es necesario secuenciar los genes restantes y completar el perfil de MLST.

En el caso de las cepas que fueron identificadas como *Infantis*, los alelos obtenidos para los genes *hemD* y *sucA* coinciden con el perfil alélico del ST mayoritario para *Salmonella Infantis*, el ST 32. Sin embargo, existen otros ST minoritarios que también presentan dichos alelos y, por lo tanto, sería necesario realizar la secuenciación de los 5 genes restantes para poder realizar tal afirmación.

Finalmente, para el caso de SBO-29 solo contamos con información del gen *hemD*, para el cual presenta el alelo 10. Existen muchos serovares que presentan dicho alelo, y sería necesario realizar la secuenciación de más genes para hacer una predicción de serovar basándonos exclusivamente en el perfil de MLST. Sin embargo, esta información resulta útil a la hora de predecir el serotipo de esta cepa cuando la combinamos con los datos obtenidos por los demás métodos. A partir de las técnicas de PCR múltiple ensayadas, se pudo determinar que, por su tipo somático, puede pertenecer tanto al serogrupo C2 como al C3. Además, presenta antígenos flagelares que no se encuentran cubiertos dentro de estas PCR. Por otro lado, esta cepa presenta un gen *fliC* de un tamaño de aproximadamente 1300 pb, lo que indica que podría corresponder al antígeno H1 del complejo Z4. Por serología clásica se pudo determinar que su antígeno O es del tipo 8 y no 6,8, por lo que podemos afirmar que pertenece al serogrupo C3. No se produjo reacción de aglutinación con ninguno de los antisueros para antígenos flagelares disponibles y lamentablemente no logramos obtener una secuencia confiable del gen *fliC*.

Con esta información y haciendo una revisión del esquema de Kauffman-White-Le Minor, se pudo observar que existen únicamente dos serovares que reúnen estas condiciones (que pertenezcan al serogrupo C3, presenten un antígeno flagelar de fase I del complejo Z4 y un antígeno

flagelar de fase II que no está cubierto en la PCR múltiple o serología, o bien, sean monofásicos). Estos son los serovares Corvallis y Albany, de fórmula antigénica (8,20:z₄,z₂₃:[z₆]) y (8,20:z₄,z₂₄:-), respectivamente. Analizando la base de datos de MLST, encontramos que todas las cepas correspondientes al serovar Corvallis presentan el alelo hemD-10, mientras que las cepas de serovar Albany presentan otros alelos. Por lo tanto, se puede predecir de manera bastante confiable que SBO-29 pertenece al serovar Corvallis.

En la tabla 9 se presenta a modo de resumen la información aportada por los diferentes métodos ensayados y la correspondiente asignación de serovar para las cepas que no pudieron ser completamente caracterizadas mediante de los métodos de PCR.

Tabla 9. Resumen resultados de cepas no tipificables por PCR

| PCR | Sec. <i>FliC</i> | MLST parcial | Serología | N° de cepas* | Formula antigénica | Predicción serovar |
|--------------------------|-------------------|----------------------|--------------|----------------------------------|---|--------------------|
| 6,7:G:- | m,t | NR | NR | 4 (SBO-22, 26, 38, 40) | 6,7:m,t:- | Oranienburg |
| 9:-:1,5 | l,z ₂₈ | NR | 9:l:- | 4 (SBO-04, 20, 21, 43) | 9:l,z ₂₈ :1,5 | Javiana |
| 4:G:- | f,g,s | NR | NR | 3 (SBO-34, 46, 48) | 4:f,g,s:- | Agona |
| 4:G:- | f,g | NR | NR | 2 (SBO-03, 05) | 4:f,g:- | Derby |
| 3:G:- | g,s,t | NR | 3,19:g,s,t:- | 2 (SBO-47, 56) | 3,19:g,s,t:- | Senftenberg |
| 6,7:-:1,5 | k | NR | -:-:- | 1 (SBO-24) | 6,7:k:1,5 | Thompson |
| - :d:e,n,z ₁₅ | NR | hemD-309 | -:d:- | 1 (SBO-09) | 16:d:e,n,z ₁₅ | Nottingham |
| -:i:- | NR | hemD-30; purE-141 | -:i:- | 2 (SBO-13, 27) | -:i:- | Subesp. IIIb |
| 8:-:- | - | hemD-10 | 8:-:- | 1 (SBO-29) | 8:z ₄ ,z ₂₃ : [z ₆] | Corvallis |

NR: No se realizó el ensayo para esa cepa

* Se indica en negrita la cantidad de cepas que comparten las mismas características y entre paréntesis la identificación de las mismas

5. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La serotipificación de *Salmonella* aporta información de gran relevancia epidemiológica y desde su comienzo se ha hecho mediante pruebas serológicas que detectan antígenos de superficie, lo que determina el sistema de clasificación en serovariedades. Este sistema, sin embargo, no ofrece información sobre la virulencia, resistencia a antibióticos u origen filogenético de las cepas, por lo que es actualmente criticado y se propone que sea reemplazado por métodos moleculares como el MLST⁴³.

El método de PCR múltiple ensayado en este trabajo ³⁰⁻³² resulta muy útil a la hora de realizar la caracterización de aislamientos de *Salmonella enterica* ya que es rápido y confiable. En los casos en que no se logra identificar el serovar completamente, aporta información sobre alguno de sus antígenos, lo que nos permite acercarnos a la predicción de su serotipo. Creemos que este tipo de métodos resultan especialmente aplicables en laboratorios que cuentan con recursos limitados ya que su costo es menor al de la serología tradicional o la caracterización por MLST.

Existen otros métodos que aportan resultados similares como el descrito por Fitzgerald et. al ²⁷ donde detectan los grupos somáticos A, D, B, C1, C2, E y G, utilizando arreglos de sondas genéticas fluorescentes específicas para las regiones variables de los genes *abe*, *wzx* y *prt*. Sin

embargo, este método solo detecta determinantes del grupo somático y requiere del uso de sondas fluorescentes y de equipamiento de microscopía de fluorescencia.

También existen métodos combinados, como el descrito por Ranieri et. al.⁴⁴, donde realizan una PCR múltiple para identificar 7 serogrupos diferentes (B, D, C1, C2, E, G y K) y además, secuencian los genes *fliC* y *fljB* para determinar los antígenos flagelares de fase I y II, respectivamente. En este caso, se evitan falsos negativos debido a mutaciones dentro de la región variable de los genes *fliC* y *fljB* que podrían impedir que los primers hibriden completamente, como puede ocurrir en las PCR múltiples en las que basamos nuestro trabajo. Sin embargo, al ser necesario realizar la secuenciación de dos genes para cada cepa, es un método que requiere más tiempo y resulta más costoso y, por lo tanto, no es tan aplicable en laboratorios con pocos recursos.

Por otro lado, tenemos métodos basados en PCR múltiples que identifican marcadores genéticos serotipo-específicos como, por ejemplo, los descritos en los trabajos de Tennant et al.⁴⁵ y Al-Emran et al.³⁸. Estos métodos tienen un muy alto poder de discriminación, pero permiten detectar un número muy limitado de serovares, por lo que su aplicabilidad es más reducida, siendo de mayor utilidad en regiones donde los casos de salmonelosis se encuentran mayormente limitados a unos pocos serovares

conocidos. El método descrito por Al-Emran y colaboradores fue aplicado exitosamente en una colección de cepas obtenidas de hemocultivos en el África sub-sahariana, en donde la proporción de los casos debidos a *S. Typhi* y *S. Tyhphimurium* es muy alta y se detectaban unos pocos serovares minoritarios como Enteritidis o Dublin. Sin embargo, este método aplicado en la colección que analizamos en este trabajo no hubiera resultado exitoso, ya que la variedad de serotipos es mucho mayor.

Los métodos basados en PCR múltiples que utilizamos en este trabajo permitieron la completa caracterización de un 66% de las cepas estudiadas, pudiendo identificar 9 serovares diferentes, dentro de los cuales están los más prevalentes en Uruguay (*Typhimurium* y Enteritidis), así como otros serovares menos frecuentes (Infantis, Saintpaul, Bredeney, Panama, Newport, Litchfield y Paratyphi B). Para la colección de cepas analizada no se observaron falsos negativos ni reactividad cruzada, por lo que representa un método confiable. Sin embargo, presenta limitaciones en cuanto al número de serovariedades que permite caracterizar, en particular para aquellos serotipos que tienen antígenos flagelares de fase 1 del complejo G o que presentan antígenos O y H poco comunes.

La secuenciación del gen *fliC* nos permitió discriminar entre los serovares del grupo flagelar G, así como identificar 2 serovares adicionales para los que no contamos con primers en la PCR flagelar de fase I (antígenos k y

l,z28). En el trabajo de Bishop et al. ⁴¹ se plantea que en la mayoría de los casos estudiados, la secuenciación de este gen es suficiente para predecir de forma exitosa el serovar de un aislamiento de *Salmonella*. Para las 16 cepas en las que analizamos la secuencia del gen *fliC*, ésta aportó información extra que permitió completar con certeza la caracterización de serovares. Nuestros resultados apoyan lo descrito en el trabajo de Bishop y colaboradores, ya que en todos los casos el análisis de secuencia brinda la misma identificación a nivel de serovar que con el conjunto de los métodos.

Los resultados de MLST, si bien son preliminares, aportan información valiosa que, en conjunto con los resultados obtenidos por los demás métodos, permitió la caracterización de 4 cepas adicionales, completándose así la serotipificación de la colección de cepas bolivianas.

Se puede entonces concluir que los métodos moleculares ensayados son consistentes entre sí y que aportan información complementaria, que en su conjunto permitió la caracterización de un total de 58 cepas de *Salmonella enterica* de diversos orígenes. En particular, los métodos basados en PCR resultan muy útiles en la identificación de gran cantidad de serovares, son rápidos, confiables y reproducibles, además de resultar menos costosos que la serotipificación clásica. Sin embargo, ninguno de los métodos ensayados en este trabajo es, por sí solo, completamente eficiente.

Dentro de la colección de cepas bolivianas se identificaron 56 cepas de la subespecie *enterica*, que representan 17 serovares diferentes, y dos de la subespecie IIIb, siendo estas últimas, causa de infecciones sistémicas en humanos, lo cual es muy poco común.

Nuestros resultados sugieren que la variedad de serotipos en Bolivia es mayor que la que detectamos en Uruguay y que algunos serotipos muy prevalentes en Bolivia no circulan con frecuencia en nuestro país. Este es el caso de serovar Infantis que representa $\frac{1}{3}$ de los aislamientos de la colección boliviana. Por otra parte, algunas serovariedades muy prevalentes en Uruguay como Enteritidis y Typhimurium, aparecen minoritariamente en la colección boliviana.

6. PERSPECTIVAS

Resta completar el análisis de MLST del conjunto de cepas, que se encuentra en curso.

Además, nos planteamos diseñar nuevos primers que permitan la identificación de un mayor número de serotipos de importancia clínica para complementar los métodos aquí evaluados. También nos proponemos evaluar métodos basados en PCR en tiempo real.

Por otra parte, nos planteamos profundizar en el estudio de las cepas SBO-13 y SBO-27, ya que resultan especialmente interesantes por tratarse de aislamientos de infecciones invasivas en seres humanos. En primer lugar, nos proponemos obtener la secuencia genómica completa de ambas cepas, para evaluar si presentan características diferenciales con relación a otras de la misma subespecie aisladas de muestras ambientales. Además, realizaremos una evaluación fenotípica, en cuanto a su capacidad para invadir y persistir en células epiteliales humanas en cultivo.

El serovar Infantis, que resultó muy prevalente en la colección de cepas estudiada, abre también nuevas líneas de trabajo. Este serotipo ha aumentado su prevalencia en los últimos años en muchas regiones del mundo incluyendo varios países sudamericanos. Este aumento se relaciona a la diseminación de algunos clones con especiales capacidades

epidémicas ⁴⁶. Nos proponemos avanzar en la caracterización de esta capacidad en serovar Infantis en relación con otras serovariedades que se diseminan epidémicamente en Uruguay como son Enteritidis y Typhimurium.

7. REFERENCIAS

1. Grimont, P. & Weill, F.-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO Collab. Cent. Ref. Res. Salmonella* 1–167 (2008).
2. Guibourdenche, M. *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* **161**, 26–29 (2010).
3. Issenhuth-Jeanjean, S. *et al.* Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* **165**, 526–530 (2014).
4. Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D. & Farmer, J. J. Clonal Nature of *Salmonella typhi* and Its Genetic Relatedness to Other *Salmonellae* as Shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis, and Proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **27**, 313–320 (1989).
5. Nelson, K., Whittam, T. S., Selander, R. K. & Selander, R. K. Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **88**, 6667–6671 (1991).
6. Nelson, K. & Selander, R. K. Evolutionary Genetics of the Proline Permease Gene (*utP*) and the Control Region of the Proline Utilization Operon in Populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **174**, 6886–6895 (1992).
7. Boyd, E. F., Nelson, K., Wang, F., Whittam, T. S. & Selander, R. K. dehydrogenase (*mdh*). **91**, 1280–1284 (1994).
8. McQuiston, J. R. *et al.* Molecular Phylogeny of the *Salmonellae*: Relationships among *Salmonella* Species and Subspecies Determined from Four Housekeeping Genes and Evidence of Lateral Gene Transfer Events □ †. **190**, 7060–7067 (2008).
9. Shi, C., Singh, P., Ranieri, M. L., Wiedmann, M. & Moreno Switt, A. I. Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. *Crit. Rev. Microbiol.* **7828**, 309–325 (2013).
10. John Dekker and Karen Frank. *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. *Clin Lab Med.* **8**, 583–592 (2015).
11. Uzzau, S. *et al.* Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* **125**, 229–255 (2000).
12. Havelaar, A. H. *et al.* World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* **12**, 1–23 (2015).
13. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Medical microbiology*. (Elsevier/Saunders, 2013).
14. McQuiston, J. R. *et al.* Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1923–32 (2004).
15. Reyes, R. E., Saad, H. R., Galicia, C. S., Herrera, M. O. & Jiménez, V. R. C. Mecanismos involucrados en la variabilidad del antígeno O de bacterias gram negativas. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **51**, 32–43 (2009).

16. Bergan, T. *Methods in microbiology. Volume 15.* (Academic, 1984).
17. Reeves, P. R. Variation in O-antigens , niche-specific selection and bacterial populations. **100**, 509–516 (2006).
18. Liu, B. *et al.* Structural diversity in Salmonella O antigens and its genetic basis. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 56–89 (2014).
19. Reeves, P. Chapter 13 Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide. in 281–317 (1994). doi:10.1016/S0167-7306(08)60416-0
20. Samuel, G. & Reeves, P. Biosynthesis of O-antigens: Genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr. Res.* **338**, 2503–2519 (2003).
21. Chaban, B., Hughes, H. V. & Beeby, M. Seminars in Cell & Developmental Biology The flagellum in bacterial pathogens : For motility and a whole lot more. **46**, 91–103 (2015).
22. Rossez, Y., Wolfson, E. B., Holmes, A., Gally, D. L. & Holden, N. J. Bacterial Flagella : Twist and Stick , or Dodge across the Kingdoms. 1–15 (2015). doi:10.1371/journal.ppat.1004483
23. Microbiology, B. Flagella and bacterial pathogenicity. (2013). doi:10.1002/jobm.201100335
24. Smith, N. H. & Selander, R. K. Molecular genetic basis for complex flagellar antigen expression in a triphasic serovar of Salmonella. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 956–960 (1991).
25. Bonifield, H. R. & Hughes, K. T. Flagellar Phase Variation in Salmonella enterica Is Mediated by a Posttranscriptional Control Mechanism. **185**, 3567–3574 (2003).
26. Silverman, M., Zieg, J., Hilmen, M. & Simon, M. Phase variation in Salmonella : Genetic analysis of a recombinational switch. **76**, 391–395 (1979).
27. Fitzgerald, C. *et al.* Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common Salmonella Serogroups. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3323–3334 (2007).
28. Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C. & Helmuth, R. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of Salmonella PCR : towards an International Standard Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of Salmonella PCR : towards an International Standard. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 290–296 (2003).
29. Zahraei-Salehi, T., Mahzoniae, M. R. & Ashrafi, A. Amplification of invA gene of Salmonella by polymerase chain reaction (PCR) as a specific method for detection of Salmonellae. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran* **61**, 195–199 (2006).
30. Echeita, M. A., Herrera, S., Garaizar, J. & Usera, M. A. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common Salmonella second-phase flagellar antigens. *Res. Microbiol.* **153**, 107–113 (2002).
31. Herrera-León, S. *et al.* Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of Salmonella spp. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2581–2586 (2004).
32. Herrera-León, S. *et al.* Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of Salmonella serotypes. *Res. Microbiol.* **158**, 122–127 (2007).

33. McQuiston, J. R., Waters, R. J., Dinsmore, B. A., Mikoleit, M. L. & Fields, P. I. Molecular determination of H antigens of Salmonella by use of a microsphere-based liquid array. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 565–573 (2011).
34. Ranieri, M. L., Shi, C., Switt, I. M. & Bakker, H. C. Den. Comparison of Typing Methods with a New Procedure Based on Sequence Characterization for Salmonella Serovar Prediction. **51**, 1786–1797 (2013).
35. Agron, P. G. *et al.* Identification by Subtractive Hybridization of Sequences Specific for Salmonella enterica Serovar Enteritidis Identification by Subtractive Hybridization of Sequences Specific for Salmonella enterica Serovar Enteritidis. **67**, 4984–4991 (2001).
36. Malorny, B., Bunge, C., Guerra, B., Prietz, S. & Helmuth, R. Molecular characterisation of Salmonella strains by an oligonucleotide multiprobe microarray. *Mol. Cell. Probes* **21**, 56–65 (2007).
37. Arrach, N. *et al.* Salmonella serovar identification using PCR-based detection of gene presence and absence. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2581–2589 (2008).
38. Al-Emran, H. M. *et al.* Validation and Identification of Invasive Salmonella Serotypes in Sub-Saharan Africa by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Clin. Infect. Dis.* **62**, s80–s82 (2016).
39. Naresh, V. & Reeves, P. R. Identification and Sequence of rfbS and rfbE, Which Determine Antigenic Specificity of Group A and Group D Salmonellae. *J. Bacteriol.* **171**, 5694–5701 (1989).
40. Hong, Y., Cunneen, M. M. & Reeves, P. R. The Wzx translocases for Salmonella enterica O-antigen processing have unexpected serotype specificity. *Mol. Microbiol.* **84**, 620–630 (2012).
41. Bishop, C. *et al.* Combined genomarkers approach to Salmonella characterization reveals that nucleotide sequence differences in the phase 1 flagellin gene fliC are markers for variation within serotypes. *J. Med. Microbiol.* **61**, 1517–1524 (2012).
42. Vázquez, J. a & Berrón, S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**, 113–120 (2004).
43. Achtman, M. *et al.* Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in Salmonella enterica. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
44. Ranieri, M. L., Shi, C., Moreno Switt, A. I., Den Bakker, H. C. & Wiedmann, M. Comparison of typing methods with a new procedure based on sequence characterization for Salmonella serovar prediction. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1786–1797 (2013).
45. Tennant, S. M. *et al.* Identification by PCR of non-typhoidal Salmonella enterica serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, 1–9 (2010).
46. Antunes, P., Mourão, J., Campos, J. & Peixe, L. Salmonellosis: The role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, 110–121 (2016).